

Trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas



**Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba**



Estudio de Compuestos Anfifílicos y su Utilización en Tecnología Farmacéutica

Santiago Daniel Palma

BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUIMICAS

Signatura R-T

Topográfica 615.1

..... P

Nº. inventario 9200

Agencia

Donación del autor

Precio

Expediente

Ord.º Provisión

Utilización

Región

Fecha de Ingreso 15/12/03

| | | | |
|--|--|--|--|
|  | | | |
|--|--|--|--|

Director de Tesis: Dr. Daniel Allemandi

Comisión de Tesis: Dr. Rubén Manzo

Dr. Bruno Maggio

Dra. Miriam Strumia

A mi esposa Mariela
A mi hijo Santiago
A mis viejos Daniel y Maria Silvia
A mis hermanas Fernanda y Daniela
.....desde lo más profundo del corazón

Agradecimientos:

Al Dr. Daniel Allemandi, a Daniel, por transmitir mucho más que conocimientos científicos. Principalmente por sus valores humanos. Por la amistad.

Al Dr. Rubén Manzo, por recibirme en su grupo de trabajo y estar siempre dispuesto y entusiasta ante cualquier consulta. Por sus ideas y la calidez de su trato.

A los Dres. Bruno Maggio y Miriam Strumia por sus apreciaciones y asesoramiento con respecto a este trabajo de tesis.

A Juan y Alvaro, sinceramente, sin palabras.

A mis compañeritos / as de laboratorio, Fabiana, Maria Eugenia, Verónica, Daniela, Carolina, Andrea, Silvia, José, Ana Paula, por hacer del laboratorio un muy buen lugar, por los mates y las bromas, por estar, y fundamentalmente por aguantarme, sin duda una tarea nada fácil.

Al departamento de Farmacia en pleno, docentes y no docentes, porque siempre me sentí como en casa.

A Pierandrea Lo Nostro y a Laura Fratoni, socios con los derivados de la vitamina C.

A las diferentes instituciones y programas que me brindaron el soporte económico todos estos años: CONICET, SECyT-UNC, Fundación Antorchas.

En forma muy especial a Mariela, mi esposa, inmensa y única. Mi compañera inseparable. Por todo el tiempo que le quite para lograr este objetivo.

A mi hijito, por ser sentido y razón de todo.

A mi viejo, por su apoyo incondicional de siempre, por enseñarme a mirar siempre hacia adelante. Por ser una gran persona.

A mi vieja, por todos aquellos detalles que yo mas que nadie aprendí a disfrutar. Por levantarse cada día pensando en sus hijos.

Al Licenciado Daniel Palma, por enseñarme a disfrutar de la química.

A la Farmacéutica Maria Silvia Badra, porque con su amor por la farmacia me hizo acuñar la profesión más hermosa de todas.

A mis hermanas, Maria Fernanda y Daniela, por el guiño cómplice de siempre.

A mis amigos de siempre, porque toda la vida me apoyaron desde la mágica inocencia de los que te quieren bien.

A mis parientes políticos, mis suegros y cuñados, por el apoyo y comprensión de siempre.

Prólogo

El desarrollo científico alcanzado en los últimos tiempos en el área de la farmacotecnia y la tecnología farmacéutica, hace atractiva la realización de estudios dirigidos a optimizar las variables involucradas en el diseño de las diferentes formas farmacéuticas, en las cuales además de una droga de comprobada actividad terapéutica se incorporan al sistema una importante cantidad de sustancias químicas, denominadas genéricamente "excipientes". La combinación adecuada de drogas y excipientes permiten optimizar la formulación en relación a distintas propiedades que van desde la simple estabilización fisicoquímica del sistema hasta el mejoramiento de algunas propiedades biofarmacéuticas del medicamento.

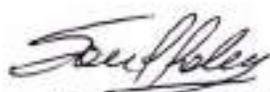
Es por ello que la investigación tendiente a obtener y caracterizar compuestos con potencial aplicación como excipientes de un sistema portador de drogas adquiere gran importancia.

En la presente tesis, se estudió un grupo de compuestos (alquil ésteres del ácido ascórbico) que no habían sido descriptos como agentes tensioactivos y que presentaron

incluso a la luz de los resultados, algunas propiedades tales como, la formación de coageles, de relevancia y potencialidad para el desarrollo de sistemas portadores de drogas para diferentes vías de administración.

La redacción de este trabajo se organizó en 5 capítulos. Un capítulo introductorio, otro dedicado a la obtención de los derivados, y a continuación una breve descripción de las diferentes propiedades básicas de agregación medidas en los sistemas en estudio. Un capítulo sobre la formación de estructuras mesofásicas de interés (coageles), y un capítulo final dedicado a las propiedades de relevancia farmacéutica. Se agregan además dos anexos complementarios.

Los resultados que se presentan en los diferentes capítulos y las publicaciones realizadas a partir de los estudios realizados, son una muestra de la fertilidad de la temática. Por otra parte las perspectivas que derivan de los resultados obtenidos hacen promisorio la continuidad de los estudios sobre los alquil derivados del ácido ascórbico.



Santiago Daniel Palma

Objetivos Generales

Los objetivos generales de este trabajo de Tesis pueden resumirse en los siguientes tres puntos:

1. Obtener y caracterizar como agentes tensioactivos alquil ésteres del ácido ascórbico (vitamina C).
2. Estudiar las propiedades de estos derivados en cuanto a:
 - a) Comportamiento en dispersiones acuosas.
 - b) Fenómenos de autoagregación.
 - c) Estructuras supramoleculares.
3. Evaluar las potenciales aplicaciones de los derivados en tecnología farmacéutica.

Abreviaturas

- ΔT_c : Descenso del punto crioscópico.
- a_0 : área de la cabeza polar del surfactante.
- Asc: Ácido ascórbico (vitamina C)
- Asc₁₀: 6-O-ascorbil decanoato
- Asc₁₁: 6-O-ascorbil undecanoato
- Asc₁₂: 6-O-ascorbil dodecanoato
- Asc₁₄: 6-O-ascorbil tetradecanoato
- Asc₁₆: 6-O-ascorbil hexadecanoato (palmitato de ascorbilo)
- Asc₁₆Na: Palmitato de ascorbilo sal sódica
- Asc₈: 6-O-ascorbil octanoato
- Asc_n: Ascorbil derivados, donde n es el número de átomos de carbono del éster.
- AscNa: Ascorbato de sodio
- AT: Agente tensioactivo.
- BHL: Balance hidrofílico-lipofílico
- CE: Comunidad europea
- CgC: Coageles cargados.
- CMC: Concentración micelar crítica.
- DL₅₀: Dosis letal 50
- DSC: Differential scanning calorimetry (calorimetría diferencial de barrido)
- EO: Etilenóxido.
- FF: Forma farmacéutica.
- FFsS: formas farmacéuticas sólidas
- GI: Gastrointestinal
- Gli: Glicerina
- HPLC: cromatografía líquida de alta performance
- IM: Intramuscular
- IR: Infrarrojo
- IV: Intravenosa
- K_p: Krafft Point
- l_H: Largo de la cadena hidrocarbonada

p.a: Principio activo

P_C: Parámetro crítico de empaquetamiento.

PDB: Potenciometría diferencial de barrido

PEG400: Polietilenglicol 400.

PEO: Polietilenoóxido.

Pg: Propilenglicol.

PM: Peso molecular

Rf: Relación de frente (TLC)

RMN: Resonancia magnética nuclear

SC: Subcutánea

SM: Tistemas micelares

SPD: Sistema portador de drogas

T°: Temperatura

TG: Termogravimetría

TLC: Cromatografía en capa delgada (Thin Layer chromatography)

TMC: Temperatura micelar crítica

Uv-Vis: Espectroscopia ultravioleta visible

V_H: Volumen de la cadena hidrocarbonada

V_M: Volumen molar aparente.

| | Páginas |
|---|----------------|
| PROLOGO Y OBJETIVOS GENERALES | i-iii |
| ANEXO I: ABREVIATURAS | iv-v |
| CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. Tensioactivos | 7-12 |
| 2. Utilización en Tecnología Farmacéutica | 13 |
| 3. Una Nueva Familia de Surfactantes | 13-14 |
| CAPITULO 2: OBTENCIÓN DE LOS DERIVADOS | 15 |
| 1. Introducción | 15-19 |
| 2. Obtención de los Derivados | 18-22 |
| 3. Propiedades Fisicoquímicas de $Asc_{16}Na$ | 22-28 |
| 4. Conclusiones Generales del Capítulo | 28 |
| CAPITULO 3: PROPIEDADES DE AGREGACIÓN | 29 |
| 1. Introducción | 29-41 |
| 2. Parte Experimental | 42-52 |
| 3. Resumen de los Resultados Obtenidos | 52-55 |
| 4. Conclusiones | 55-56 |
| CAPITULO 4: COAGELES | 57 |
| 1. Introducción General | 57-60 |
| 2. Transiciones de Fase | 60-70 |
| 3. Efecto de las Moléculas de agua y de la Concentración de Asc_n en las Transiciones de fase | 70-83 |
| 4. Efecto de Cosolventes | 83-86 |
| 5. Reología | 87-97 |
| 6. Conclusiones | 98 |
| CAPITULO 5: PROPIEDADES DE RELEVANCIA FARMACEUTICA | 99 |
| 1. Introducción General | 99-103 |
| 2. Objetivos | 103-104 |
| 3. Solubilización de Drogas Poco Solubles | 105-113 |
| 4. Coageles Cargados | 113-126 |
| CONCLUSIONES | 127 |
| PERSPECTIVAS | 128-129 |
| ANEXO II: METODOLOGÍAS ANALÍTICAS | 130 |
| 1. Métodos Térmicos | 130-137 |
| 2. Conductimetría | 138-139 |
| 3. Isotermas de Compresión | 140-142 |
| 4. Microscopía Electrónica | 142-145 |
| 5. Difracción de Rayos X | 146-148 |
| 6. Determinaciones de Solubilidad y Solubilización | 148-150 |
| 7. Tensión Superficial | 150-153 |
| 8. PDB | 153-154 |
| BIBLIOGRAFÍA | 155-165 |
| PUBLICACIONES | 166-167 |

Capítulo 1 **Introducción**

En los últimos años se ha evidenciado que solamente el desarrollo de nuevas drogas (síntesis) no es suficiente para lograr un progreso importante en la efectividad de la farmacoterapia.

El comportamiento "in vitro" de ciertas formas farmacéuticas (FF) puede no correlacionarse con los resultados observados "in vivo". Distintos factores pueden ser responsables de este comportamiento, entre los cuales se pueden citar:

- a) Concentración insuficiente de droga en el sitio de acción debido a una pobre absorción, distribución no específica o rápido metabolismo y/o eliminación (por ejemplo péptidos y proteínas).
- b) Propiedades físicoquímicas de la droga que dificultan la formulación. Por ejemplo, una baja solubilidad del principio activo puede ser determinante a la hora de formular inyectables en soluciones acuosas.
- c) Alta fluctuación de los niveles plasmáticos de la droga debido a una biodisponibilidad errática después de una administración peroral.

Debido a esto es una interesante estrategia el desarrollo de nuevos **sistemas portadores de drogas** (SPD). Se denomina así a las diversas alternativas posibles para “transportar” la droga (principio activo) hasta su sitio de acción.

En los últimos años la cantidad y calidad de publicaciones referidas a este tópico han ido en vertiginoso aumento. No obstante, cabe destacar que no todos los sistemas portadores que se estudian y que aparentan ser exitosos, tienen su punto culminante en el desarrollo de un medicamento.

Como **atributos deseables** de un sistema portador de drogas se pueden citar:

Tabla 1.1: Atributos ideales de un SPD para vía oral

1. Posibilidad de variar la velocidad de liberación de drogas para poder adecuar el sistema a la farmacocinética particular.(flexibilidad)
 2. Posibilidad de mantener un control preciso de la velocidad de liberación que se observa para cada droga (precisión)
 3. Baja sensibilidad del sistema ante las variables fisiológicas como: (robustez)
 - Motilidad y vaciado gástrico, pH, volumen de los fluidos GI.
 - Presencia de enzimas
 - Alimentación.
 - Condición y actividad física del individuo.
 - Variabilidad interindividual.
 - Variables patológicas.
 4. Que las formulaciones sean fisicoquímicamente estables.
 5. Que la estabilidad de la droga sea mantenida o aumentada.
 6. Que el sistema responsable de la modulación de la liberación del p.a aporte poca masa.
 7. Aplicable a un amplio rango y variedad de drogas.
 8. En la medida de lo posible que el costo sea razonable.
-

Por otra parte, es necesario tener en cuenta algunas consideraciones relacionadas a la factibilidad de diseño de un nuevo SPD:

a) Capacidad de carga del sistema:

En general cuando se diseña un nuevo SPD se busca tener la misma dosis de p.a que en los sistemas convencionales, salvo en los casos que el cambio de vehículo mejore la biodisponibilidad y haga posible la disminución de la cantidad de fármaco a utilizar. Es por ello que determinar la capacidad o efectividad de carga de un sistema portador es fundamental para su evaluación como potencial alternativa para la vehiculización de drogas.

b) Posibilidad del sistema de dirigir el p.a a un sitio específico:

Cuando un SPD logra que la droga llegue al sitio de acción sin pasos previos por otros órganos o tejidos, se puede disminuir la metabolización así como aumentar posiblemente el efecto del fármaco a igual dosis administrada.

c) Interacción del portador con los sistemas biológicos:

Si el SPD solo busca mejorar la vehiculización, los excipientes auxiliares deben interaccionar lo mínimo posible con el entorno biológico, pero si el sistema tiende a mejorar o modificar la liberación de las drogas, probablemente los excipientes tendrán un rol central para lograr el efecto deseado.

d) Toxicidad aguda y crónica:

Ausencia de toxicidad aguda y crónica de todos los componentes a los fines de garantizar la seguridad en el uso de la formulación.

e) Cambio de escala para la producción de la forma farmacéutica:

Este punto es pocas veces considerado en algunas publicaciones donde se describen sistemas que se consideran de potencial gran impacto en la industria farmacéutica. Como cualquier producto, un medicamento, puede presentar problemas a la hora de rediseñar los procesos de manufactura a escala industrial.

f) Estabilidad fisicoquímica del sistema y de la droga durante su almacenamiento:

Tanto la droga, como el sistema en su totalidad, deben ser estables durante un plazo preestablecido que sea acorde con la potencial aplicación como producto industrial.

g) Costos:

La naturaleza de un SPD necesariamente debe tener un compromiso entre la utilidad de la innovación tecnológica y los costos del sistema.

Entre las alternativas para los SPD se encuentran los sistemas dispersos, entre los cuales se pueden incluir los estudiados en este trabajo de tesis.

Sistemas dispersos

El conocimiento de los fenómenos interfaciales y la familiarización con las características de sistemas de tamaño coloidal es fundamental para entender en profundidad las propiedades de los 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 lo atómico o molecular hasta tamaños medidos en milímetros.

Es común entonces clasificar los sistemas dispersos según el tamaño promedio de las partículas que los componen. En general se realiza una división en tres subsistemas diferentes: a) dispersiones moleculares, b) dispersiones coloidales y c) dispersiones gruesas. Los tamaños de estos sistemas y algunas propiedades de los mismos son mostrados en la tabla 1.2.

Tabla 1.2

| Dispersión | Rango de tamaño de partícula | Características del sistema | Ejemplos |
|------------|------------------------------|---|--|
| Molecular | < de 1.0 nm | Partículas invisibles al microscopio electrónico, pueden pasar a través de ultrafiltros y membranas semipermeables. | Moléculas de oxígeno, iones ordinarios, soluciones de glucosa |
| Coloidal | 1.0 a 0.5 μm | Visible al microscopio electrónico. Pueden pasar a través de filtro de papel pero no por membranas semipermeables. | Sistemas micelares, polímeros naturales y sintéticos. |
| Gruesa | >de 0.5 μm | Partículas visibles al microscopio óptico, no pueden pasar a través de filtros de papel o membranas semipermeables. | La mayoría de las emulsiones y suspensiones de uso farmacéutico, glóbulos rojos. |

Fuente: Martín, 1993

Los límites de tamaño son generalmente arbitrarios, básicamente no se pueden encontrar límites claros entre una dispersión molecular y una coloidal o entre esta última y una gruesa.

Algunos sistemas no pueden ser categorizados fácilmente y quizás se los deba ubicar en una categoría de sistemas complejos. Ejemplo de esto son los sistemas de emulsiones múltiples (agua-aceite-agua, en donde pequeñas gotas de agua son dispersadas en grandes gotas de aceite que son a su vez dispersadas en una fase continua acuosa) y suspensiones donde las partículas están dispersas en una base emulsionada.

Por otra parte, los sistemas dispersos donde el tamaño de partícula de la fase interna es muy pequeño (menos de $1\mu\text{m}$) son llamados sistemas **coloidales**.

Es común clasificar las dispersiones de tamaño coloidal en liofílicas o liofóbicas según tengan afinidad o no con el solvente. Los sistemas liofílicos son muchos más estables que los liofóbicos. Además de lo descrito las dispersiones pueden ser clasificadas como moleculares o micelares. En las dispersiones moleculares, como soluciones de proteínas o polímeros, la fase dispersa está compuesta por simples macromoléculas,

mientras que en los sistemas micelares (asociación) la fase dispersa comprende muchas moléculas asociadas formando un agregado (supramolecular)..

La figura 1.1 esquematiza los tipos más comunes de sistemas dispersos, reflejando de manera simple algunas diferencias de tamaño y forma.

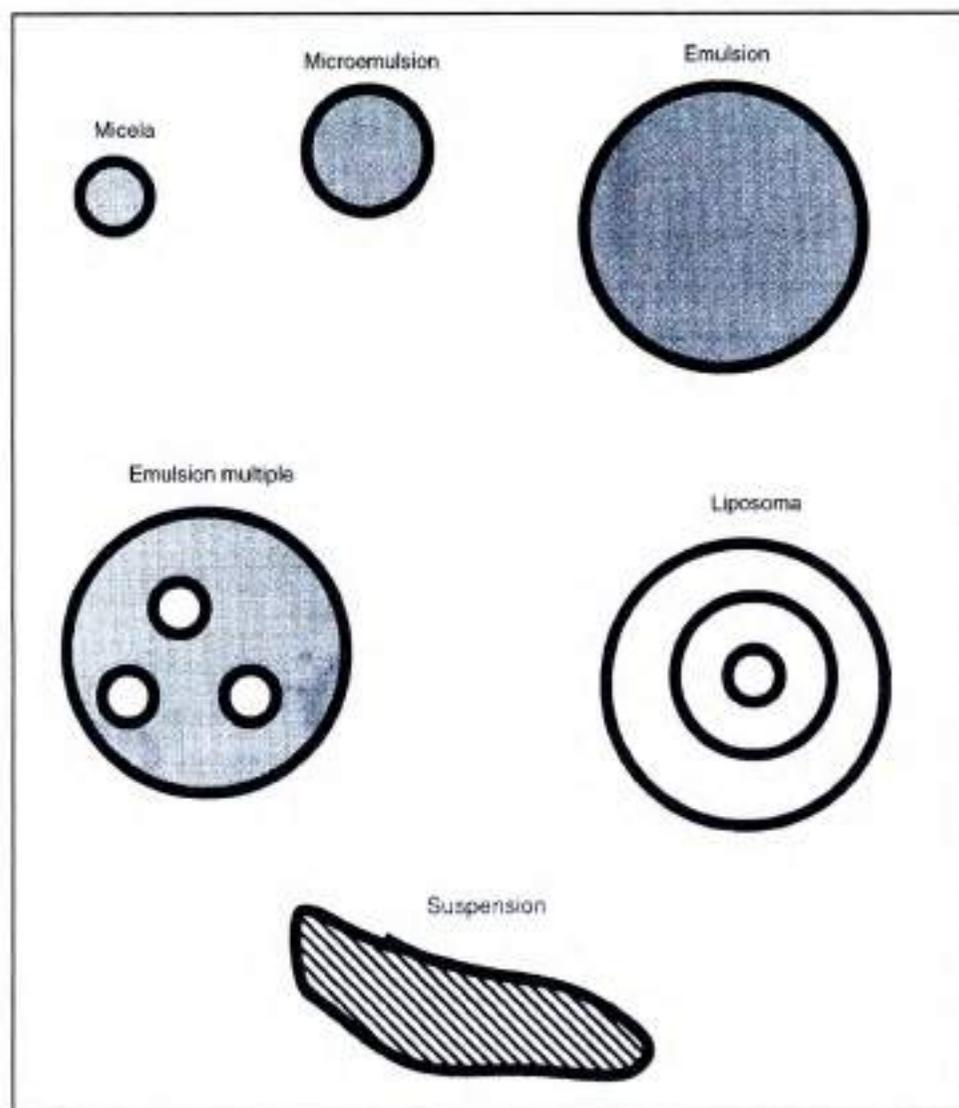


Figura 1.1: Esquema de los tipos más comunes de sistemas dispersos.

Los sistemas dispersos, en general son termodinámicamente inestables, especialmente las dispersiones gruesas. Entre las estrategias más utilizadas tendientes a estabilizar estos sistemas se encuentra la incorporación de agentes tensioactivos, los cuales disminuyen la tensión superficial entre las fases a ser dispersadas.

De esta forma los agentes tensioactivos son sustancias utilizadas en un gran número de FF y sus características de toxicidad, capacidad solubilizante y compatibilidad con otros componentes de la fórmula deben ser tenidos en cuenta.

1. Tensioactivos.

1.1 Definición

Las moléculas que se ubican en las interfases y que pueden cambiar las propiedades de las mismas son denominadas **agentes tensioactivos (AT)** o simplemente **tensioactivos**. Un término muy utilizado para nombrar estos compuestos es la palabra **surfactante**, la cual no aparece en muchos diccionarios. Esto no es solamente porque es un término técnico, sino principalmente por que es una contracción de la frase en inglés **surface active agent**.

Otra expresión alternativa es anfifilo, palabra que sugiere que estas moléculas tienen cierta afinidad tanto por solventes o medios polares como apolares. Este comportamiento es consecuencia de la estructura química de estos compuestos, que poseen una parte de su estructura de naturaleza polar y otra de naturaleza apolar. Ver figura 1.2

Las membranas celulares están compuestas principalmente por moléculas anfifílicas autoagregadas en bicapas donde los grupos hidrofílicos están en la parte exterior de la membrana, mientras que las porciones hidrofóbicas se orientan hacia el interior.

El uso doméstico es una importante aplicación de estos compuestos, de todas maneras, las aplicaciones industriales son inmensas, e incluyen productos textiles, procesos minerales, bioremediación, pinturas, pesticidas, plásticos y formulaciones farmacéuticas.

Esto hace del uso de surfactantes una problemática mundial de dimensiones importantes, a punto tal que por ejemplo la Comunidad Europea (CE) posee un comité de expertos en el área que se reúne periódicamente para resolver y legislar sobre problemas relacionados al uso de surfactantes en su territorio.

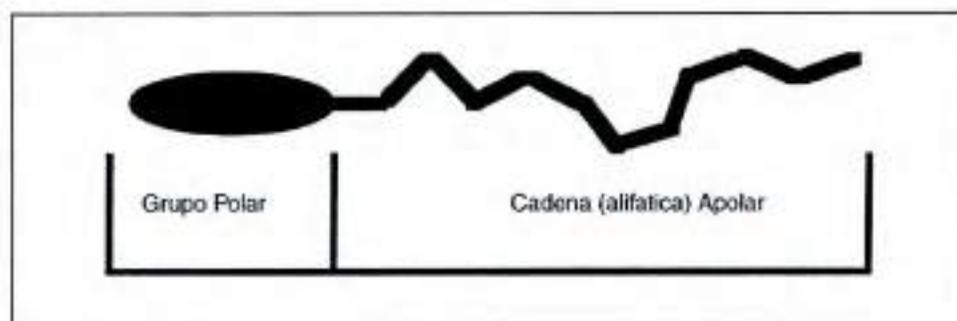


Figura 1.2: Modelo esquemático de una molécula anfifílica.

Dependiendo del número y naturaleza de los grupos polares y apolares, el surfactante puede tener un efecto hidrofílico o hidrofóbico, o también puede poseer características finales razonablemente balanceadas entre ambos perfiles. Por ejemplo, los alcoholes, aminas y ácidos de cadena larga, son compuestos anfifílicos cuyas características cambian a medida que se incrementa la cadena alifática; de una situación predominantemente hidrofílica a una hidrofóbica. Por lo tanto, el alcohol etílico es miscible en agua en todas las proporciones, mientras que en el otro extremo, el alcohol cetílico puede ser considerado una sustancia hidrofóbica e insoluble en agua.

Las moléculas de naturaleza intermedia, tienen la propiedad de que sus grupos polares son afines al entorno acuoso del solvente (agua), mientras que las partes apolares tienen poca afinidad por el solvente, lo cual produce que el compuesto se ubique en las interfases.

1.2 Propiedades

Un ejemplo clásico es la situación de los ácidos grasos en interfases aire/agua o aceite/agua. Se puede observar que en la interfase aire/agua las cadenas lipofílicas están en forma vertical hacia la fase aire, mientras que en la interfase aceite/agua se encuentran sobre la fase aceite. Debido a la orientación en la interfase aceite/agua, las moléculas de surfactante forman un "puente" entre las dos fases, cambiando obviamente las propiedades de la interfase (por ejemplo se pueden observar cambios en la tensión interfacial). Como se dijo anteriormente la calidad y cantidad de grupos hidrofílicos o lipofílicos determinan como se ubicarán las moléculas en la zona de contacto entre las fases.

Si la molécula es demasiado hidrofílica permanecerá en el cuerpo de la fase acuosa y no modificará de manera marcada la interfase. Del mismo modo, si la molécula del surfactante es demasiado lipofílica, se disuelve completamente en la fase oleosa sin tener por lo tanto una ingerencia importante en la interfase.

1.3 Balance hidrofílico-lipofílico (BHL)

Griffin en el año 1949 definió una escala arbitraria de valores que sirven para medir el balance hidrofílico lipofílico (BHL) de surfactantes (Hiemenz, 1986). Por ejemplo los Spans[®], ésteres de sorbitan, son lipofílicos y tienen un BHL entre 1.8 y 8.6. Los Tweens[®], polioxietilen derivados de los Spans[®], son hidrofílicos y tienen un alto valor de BHL (9.6 – 16.7).

Por ejemplo, el BHL de un número importante de ésteres relacionados al gliceril monoestearato, puede ser calculado utilizando la siguiente fórmula

$$\text{BHL} = 20 (1 - S/A)$$

Donde S es el número de saponificación del éster y A el índice de acidez del ácido graso involucrado. En el caso del polioxietilen sorbitan monolaureato (Tween[®] 20) para el cual S = 45.5 y A = 276 el BHL es:

$$\text{BHL} = 20 (1 - 45.5/276) = 16.7$$

Para aquellos materiales donde no es posible calcular un buen índice de saponificación (ceras, derivados de la lanolina), se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{BHL} = \frac{E + P}{5}$$

Donde E es el porcentaje en peso de las cadenas oxietileno y P el porcentaje en peso de los grupos alcoholes polihídricos (por ejemplo glicerol, sorbitol) en la molécula. Finalmente, cuando la porción hidrofílica del surfactante consiste solamente en grupos oxietilenos, la ecuación se convierte en:

$$\text{BHL} = E/5$$

Donde E es nuevamente el peso porcentual de los grupos etilenóxidos.

De todas maneras para surfactantes iónicos, compuestos con grupos propilenóxido, nitrógeno, etc. y para muchos emulsificantes de origen natural, puede ser usado el método original de Griffin de preparación y observación de una serie de emulsiones.

Los valores de algunos anfifilos comúnmente usados son mostrados en la tabla 1.3.

Tabla 1.3: algunos surfactantes y sus BHL

| Surfactante | BHL |
|--|------|
| Ácido oleico | 1 |
| Monoestearato de glicerilo | 3.8 |
| Monooleato de sorbitan (Span 80) | 4.3 |
| Monolaureato de sorbitan (Span 20) | 8.6 |
| Oleato de trietanolamina | 12 |
| Polioxietileno monooleato de sorbitan (Tween 80) | 15 |
| Polioxietileno monolaureato de sorbitan (Tween 20) | 16.7 |
| Oleato de sodio | 18.0 |
| Lauril sulfato de sodio | 40 |

Se calcularon los valores BHL de varios surfactantes separando las contribuciones de cada parte de la molécula, asignando un *número de grupo* (N_G).

La sumatoria de los respectivos N_G para un surfactante en particular permite calcular su BHL siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{BHL} = \Sigma (N_G \text{ hidrofílicos}) - \Sigma (N_G \text{ lipofílicos}) + 7$$

Algunos N_G son mostrados en la tabla 1.4. Usando los datos de esta tabla se puede calcular el BHL del lauril sulfato de sodio:

$$\text{BHL} = 38.7 - (0.475 \times 12) + 7 = 40.0$$

Este resultado concuerda con el de la tabla 1.3.

Tabla 1.4: N_G para grupos polares y apolares

| Grupos hidrofílicos | N_G |
|-----------------------------------|---------|
| -SO ₄ Na ⁺ | 38.7 |
| -COO ⁻ Na ⁺ | 19.1 |
| Ester (anillo sorbitan) | 6.8 |
| Ester (libre) | 2.4 |
| Hidroxilo (libre) | 1.9 |
| Hidroxilo (anillo sorbitan) | 0.5 |
| Grupos lipofílicos | |
| -CH- | } 0.475 |
| -CH ₂ - | |
| -CH ₃ | |
| =CH- | |

1.4 Tipos de tensioactivos.

Como ya se ha descrito, los AT son aquellas moléculas que se ubican en las diferentes interfases, esto es posible gracias a su estructura química, donde se observa la presencia de una porción de naturaleza polar (hidrofílica) y otra apolar (hidrofóbica). En general la parte apolar es una o dos cadenas alquílicas, mientras que la porción polar es de naturaleza mucho más variable.

Generalmente los AT utilizados en formulaciones farmacéuticas se clasifican en función de (o en base a) su estructura química. Básicamente se tiene en cuenta la naturaleza de su porción polar ya que la parte apolar esta generalmente formada por grupos alquilo o arilo. Los grupos polares pueden ser: a) aniónicos, b) catiónicos, c) anfotéricos, y d) no iónicos, estos últimos son muy utilizados en el diseño de formulaciones farmacéuticas.

Tensioactivos aniónicos:

Los más usados en este grupo son aquellos que contienen grupos carboxilato, sulfonato y sulfato. Aquellos que contienen el grupo carboxilato son los denominados jabones, los cuales se preparan generalmente por saponificación de glicéridos naturales de ácidos grasos en soluciones alcalinas. Los cationes más comunes que se asocian a estos

jabones son: sodio, potasio, amonio, trietanolamina, mientras que el largo de cadena de los ácidos grasos va de 12 a 18 átomos de carbono.

Tensioactivos catiónicos:

Muchos AT catiónicos de cadena larga, como las sales de amonio cuaternario, son utilizados comúnmente como tensioactivos disueltos en agua, pero su uso en preparaciones farmacéuticas se restringe generalmente a la de conservadores antimicrobianos y no a la de agentes tensioactivos, debido a que los cationes se absorben muy fácilmente en estructuras de la membrana celular en forma inespecífica provocando por tanto lisis celular, lo mismo que los agentes aniónicos, pero en este caso en menor grado. Por este mecanismo actúan destruyendo bacterias y hongos.

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.

Tensioactivos no iónicos:

Representan el grupo de AT más utilizados en sistemas farmacéuticos debido a sus ventajas en cuanto a compatibilidad, estabilidad y toxicidad. Además es común dividirlos en aquellos que son relativamente insolubles en agua y aquellos que son totalmente solubles.

El primer grupo está compuesto principalmente por los ácidos grasos de cadena larga y sus derivados insolubles en agua. Estos incluyen: 1) alcoholes grasos como los lauril, cetil (16 átomos de carbono) y estearil alcoholes; 2) ésteres del glicerilo como los monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos naturales y 3) ésteres de ácidos grasos de alcoholes grasos y otros alcoholes como propilenglicol, polietilenglicol, sorbitan, sacarosa y colesterol.

Para aumentar la hidrosolubilidad de estos y para formar el segundo grupo, se añaden grupos polioxietilenos mediante una unión éter con uno de sus grupos alcohólicos.

2. Utilización de surfactantes en tecnología farmacéutica.

Los AT conforman uno de los grupos más importantes de excipientes auxiliares utilizados en diferentes formas farmacéuticas (Wade and Weller, 1994). Los AT tienen la propiedad de ubicarse en las interfases (líquido-líquido, líquido-sólido, líquido-gas) o formar diferentes tipos de agregados supramoleculares en solución, de allí su gran utilidad en tecnología farmacéutica.

El avance en el desarrollo de sistemas conteniendo AT ha consolidado varias áreas bien definidas (Banker and Rodees, 1990), así a los sistemas clásicos:

- Sistemas micelares o coloides de asociación (asociaciones supramoleculares de AT).
- Suspensiones (AT en interfase sólido-líquido).
- Emulsiones (AT en interfase líquido-líquido).

se han incorporado nuevos sistemas constituidos por:

- Liposomas (vesículas lamelares de AT (fosfolípidos)).
- Niosomas (vesículas lamelares de AT no iónicos).
- Microemulsiones (AT en interfase líquido-líquido).

Por otra parte, estos compuestos tienen aplicaciones bien definidas en formas farmacéuticas sólidas como comprimidos, cápsulas y supositorios, con el fin de mejorar la disolución de principios activos poco solubles e hidrofóbicos, a través de un aumento de la humectabilidad de estos compuestos en medio acuoso.

3. Una nueva familia de surfactantes

En la presente tesis se trabajó con una nueva serie de compuestos derivados del ácido ascórbico (vitamina C). El prototipo fue el palmitato de ascorbilo, 6-O-hexadecanoato de ascorbilo (Asc_{16}), figura 1.3.

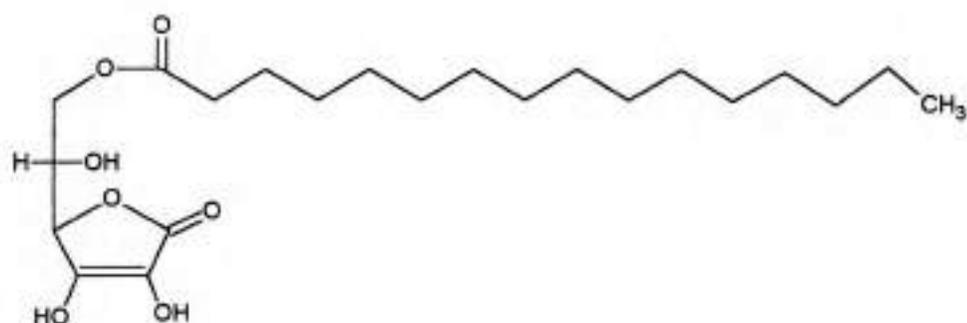


Figura 1.3: 6-O-hexadecanoato de ascorbilo (Asc_{16})

Este compuesto fue sintetizado con el objeto de aumentar la lipofilidad de la vitamina C y extender sus propiedades antioxidantes a sistemas lipídicos (Wade and Weller, 1994). Si bien la estructura de la molécula presenta una porción polar (ácido ascórbico) y una porción apolar (cadena alifática), la baja solubilidad del compuesto limita sus propiedades tensioactivas.

Los ésteres del ácido ascórbico (salvo el de cadena más corta, octanoato de ascorbilo) son insolubles en agua a temperatura ambiente. Cuando se los calienta por encima de una temperatura específica para cada derivado, la solubilidad aumenta hasta alcanzar la concentración micelar crítica. El enfriamiento del sistema no trae aparejado la precipitación del derivado sino la formación de las estructuras supramoleculares con características de cristal líquido denominadas **coageles** (Köhler y cols., 1988).

Los coageles son estructuras supramoleculares que forman ciertos agentes tensioactivos y que no han sido descriptas, ni estudiadas en sistemas farmacéuticos.

El estudio de estas estructuras y su potencial aplicación en SPD, es la temática principal de este trabajo.

Asimismo se explora la obtención de derivados más solubles (sales) a los fines de evaluar la utilidad de estos compuestos en FF líquidas.

Capítulo 2 **Obtención de los derivados**

1. Introducción.

Como se mencionó anteriormente, se seleccionaron como compuestos a estudiar, algunos derivados del ácido ascórbico, esterificados en posición C6, con cadenas alquílicas.

En la figura 2.1 se muestra la estructura química del palmitato de ascorbilo (Asc_{16}). Este compuesto fue elegido como prototipo. Como se verá más adelante, haciendo uso de las propiedades ácido base de Asc_{16} se obtuvo en nuestro laboratorio la sal sódica de este derivado ($Asc_{16}Na$).

En la figura 2.2 se presenta un esquema donde se puede apreciar la estructura química de los otros derivados estudiados que fueron obtenidos en colaboración con el grupo de trabajo del Dr. Pierandrea Lo Nostro, de la Universidad de Firenze, Italia.

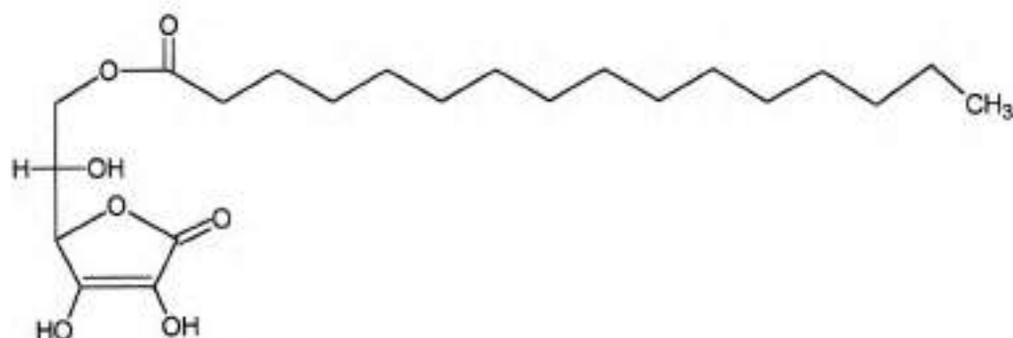
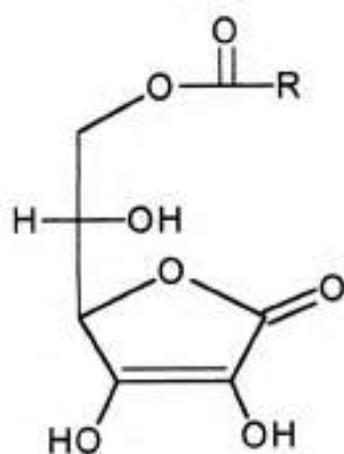


Figura 2.1: Palmitato de ascorbilo (Asc_{16})



$$R = (CH_2)_x - CH_3$$

| x | Asc_n | n | Abreviatura |
|----|---------|----|-------------|
| 6 | Asc | 8 | Asc_8 |
| 8 | Asc | 10 | Asc_{10} |
| 9 | Asc | 11 | Asc_{11} |
| 10 | Asc | 12 | Asc_{12} |
| 12 | Asc | 14 | Asc_{14} |
| 14 | Asc | 16 | Asc_{16} |

Figura 2.2: Ascorbil derivados (Asc_n)

1.1 Asc_n

El más representativo de esta serie de compuestos es el Palmitato de Ascorbilo (Asc_{16}). Este derivado fue preparado con la finalidad de aprovechar las propiedades antioxidantes del ácido ascórbico en sistemas lipídicos (Lo Nostro, 1997). El Asc_{16} se utiliza solo o en combinación con Vitamina E como estabilizante (antioxidante) para aceites en productos farmacéuticos y alimenticios; y es esencialmente no tóxico y no irritante (Wade and Weller, 1994). 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 las dosis letales 50 son:

DL₅₀ (ratón – oral): 25g / kg

DL₅₀ (rata – oral): 10g / kg

Aunque hipotéticamente podrían ser atribuidas propiedades tensioactivas a esta molécula debido a la presencia de un grupo polar y otro apolar en su estructura química, su utilización como tal no ha sido explorada.

De todas maneras, su baja solubilidad en agua limita la capacidad de formar agregados supramoleculares (ej: micelas). Este compuesto fue originalmente tomado como prototipo sobre el cual realizar modificaciones estructurales para aumentar su hidrofiliidad.

Por este motivo y teniendo en cuenta que los Asc_n tienen la capacidad de formar sales, de acuerdo al siguiente esquema (figura 2.3):

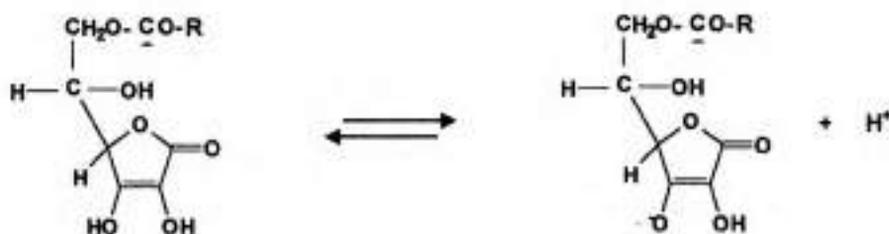


Figura 2.3: Esquema de disociación ácido-base.

Se realizaron las siguientes derivatizaciones:

a) **Obtención de sales del Asc₁₆:** Se obtuvieron sales de Na, K, NH₄⁺ y trietanolamina, pero solo la primera de este grupo fue utilizada posteriormente, (Asc₁₆Na). La sal sódica de Asc₁₆, fue obtenida en estado sólido por dos vías diferentes y caracterizada (ver próximas secciones).

Las primeras determinaciones de solubilidad para este compuesto arrojaron resultados interesantes. Asc₁₆Na presentaba un cambio abrupto de solubilidad dependiendo de las pequeñas variaciones de la temperatura ambiente.

La explicación para este fenómeno se basa en la baja solubilidad de algunos surfactantes, la cual impide alcanzar las concentraciones críticas de agregación. Cuando

la temperatura aumenta, la solubilidad hace lo propio hasta un punto donde la solubilidad del AT alcanza la CMC. Este punto es llamado **Temperatura Micelar Crítica (TMC) o Krafft Point (Kp)**.

De este modo, se determinó experimentalmente este fenómeno, observándose una TMC para Asc₁₆Na de 26,5 °C.

Por otra parte como era de esperar, la estabilidad de Asc₁₆Na, es mucho menor que la forma ácida. En este contexto, la estrategia para obtener derivados más solubles debió ser orientada hacia la obtención de derivados de cadena más corta. (Palma y cols., 2002^b)

b) Síntesis de derivados de cadena más corta.

Para obtener los derivados de la cadena más corta se decidió comenzar una serie de estudios multidisciplinarios con el Departamento de Química, de la Universidad de Firenze, Italia, más precisamente en el grupo de trabajo del Dr. Pierandrea Lo Nostro. Este tesista visitó en el año 2001, el grupo mencionado, comenzando una serie de trabajos en común que tuvieron su punto de partida en la síntesis de los Asc_n: Asc₈, Asc₁₀, Asc₁₂ y Asc₁₄ (Capuzzi y cols., 1997).

c) Síntesis de Asc₁₁

Posteriormente se comenzaron a estudiar las propiedades de los derivados, esto se describe con precisión en los capítulos 3 y 4.

Asc₁₁ fue sintetizado a los fines de evaluar con más detalle el comportamiento de agregación y reológico de los derivados, ya que se observaron estructuras diferentes para derivados de cadena corta ($n \leq 10$) comparativamente a los derivados de mayor PM ($n \geq 12$) (Palma y cols., 2002^c; capítulo 4, *Coageles*).

2. Obtención de los Derivados

2.1 Obtención de Asc₁₆-Na

La sal sódica del hexadecanoato de ascorbilo fue obtenida por dos vías diferentes:

Precipitación en etanol: Una cantidad exactamente pesada de Asc₁₆ es disuelta en etanol bajo constante burbujeo con N₂. Posteriormente se agrega una solución acuosa de

bicarbonato de sodio (NaHCO_3) en una cantidad estequiométrica. Precipita entonces Asc_{16}Na como un sólido blanco, el cual es filtrado y secado hasta peso constante.

Liofilización: En este caso se suspende una cantidad exactamente pesada de Asc_{16} en agua, para luego agregar, bajo constante agitación magnética, una cantidad equimolecular de NaHCO_3 . Posteriormente se eleva la temperatura por encima de la TMC ($26,5\text{ }^\circ\text{C}$), obteniéndose una solución clara y homogénea. Esta solución es congelada y posteriormente liofilizada.

En ambos casos el sólido obtenido se coloca en envases color ámbar y los mismos son sellados en atmósfera de N_2 .

2.2 Síntesis de 6-O-alkil derivados de ácido ascórbico (derivados de cadena mas corta)

Los 6-O-ascorbil derivados (ésteres) pueden ser obtenidos por reacción de un ácido carboxílico (ácido graso) sobre el grupo hidroxilo primario ligado al C6 del ácido ascórbico.

La reacción necesita de catálisis ácida con ácido sulfúrico concentrado. Los datos de la literatura indican que, en las condiciones empleadas, los hidroxilos secundarios en posición C5 no sufren esterificación.

Fueron sintetizados los derivados del ácido ascórbico con ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico y ácido tetradecanoico, siguiendo un único proceso sintético.

2.2.1 Síntesis:

En un balón de dos litros se colocan 300 ml de H_2SO_4 concentrado al 96%. El oxígeno disuelto se elimina burbujeando N_2 bajo agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se agrega con cuidado, 75 milimoles del ácido ascórbico y 75 milimoles del ácido carboxílico. Sobre el balón se coloca un tubo de CaCl_2 , y la solución se mantiene bajo agitación por 16 horas en atmósfera inerte.

Transcurrido este lapso de tiempo, se obtiene un líquido marrón que se coloca en un beaker de 2 litros en un baño de hielo. Rápidamente se forma una suspensión

blanquecina que se filtra y posteriormente se procede a hacer una extracción con éter etílico al menos tres veces.

Una vez terminada la extracción, la fase orgánica se lava con agua destilada para eliminar el exceso de ácido y todas las sustancias solubles en agua. Posteriormente se deseca con sulfato de sodio anhidro. Luego se filtra para eliminar el sulfato y se evapora el solvente a presión reducida obteniendo un sólido blanco-amarillo.

Este sólido es redisolto en éter y tratado con carbón activado. La suspensión es ahora filtrada a presión atmosférica y el solvente eliminado a presión reducida.

El sólido obtenido se recristaliza en éter etílico y éter de petróleo.

El rendimiento promedio de las diferentes síntesis fue de 66%.

Tabla 2.1: ejemplo de las cantidades utilizadas para la síntesis de los Asc_n

| Reactivos | Peso (g) |
|-------------------|----------|
| Ácido octanoico | 10.8 |
| Ácido decanoico | 12.9 |
| Ácido dodecanoico | 15.0 |
| Ácido ascórbico | 13.21 |

2.2.2 Caracterización de los derivados obtenidos

2.2.2.1 Puntos de fusión de Asc_n (recristalizados) (tabla 2.2)

| n | Pto. Fusión (°C) |
|-------|------------------|
| 8 | 87.0 – 88.0 |
| 10 | 96.0 – 98.0 |
| 12 | 105.5 – 106.5 |
| 14 | 108.0 – 109.0 |
| 16 | 113.0 – 114.0 |
| 16-Na | Desc. 134-136 |

2.2.2.2 TLC (cromatografía en placa fina)

Solvente de desarrollo: 20 cm³ acetato de etilo + 3 gotas de ácido acético.

R_f del Ascorbil octanoato (Asc8) = 6.5 (mancha simple).

R_f del Ascorbil decanoato (Asc10) = 6.5 (mancha simple).

R_f del Ascorbil dodecanoato (Asc12) = 6.2 (mancha simple).

R_f del Ascorbil tetradecanoato (Asc14) = 6.1 (mancha simple).

2.2.2.3 Análisis elemental

| | Teórico | Experimental |
|-------------------------|---------|--------------|
| Asc₈ | | |
| C | 55.62 | 55.38 |
| H | 7.34 | 7.30 |
| O | 37.04 | 37.32 |
| Asc₁₀ | | |
| C | 58.17 | 57.52 |
| H | 7.93 | 7.84 |
| O | 33.90 | 34.64 |
| Asc₁₂ | | |
| C | 60.32 | 60.15 |
| H | 8.44 | 8.52 |
| O | 31.24 | 31.33 |

2.2.2.4 RMN (δ , ppm, DMSO-d₆):

0.854 (triplete, CH₃); 1.23 (-CH₂-de la cadena alifática); 1.53 (triplete, CH₂); 2.31 (triplete, CH₂); 4.04 -4.06 (multiplete, O-CH₂-CH); 4.67 (simplete, CH); 8.40 (C₂-OH); 11,11 (C₃-OH).

2.2.2.5 Uv/Vis.: (λ_{max} , nm, CH₃-CN); 236 (λ_{max} , nm, CH₃-CH₂-OH); 265**2.2.2.6 IR** (KBr, cm⁻¹): 3400-300, 2918, 2849, 1742, 1690, 1472, 1292, 1179, 1115.

3. Propiedades fisicoquímicas de $Asc_{16}Na$

Debido a que $Asc_{16}Na$ es un derivado de Asc_{16} que no ha sido descrito, se consideró interesante determinar diferentes propiedades fisicoquímicas que nos permitiera conocer algunos factores que pueden ser relevantes a la hora de utilizar estos compuestos como tensioactivos. Los resultados obtenidos podrían ser extrapolados a otros derivados con diferente largo de cadena.

De esta forma, se consideró innecesario realizar estos ensayos al resto de los derivados, ya que se presumió más importante su caracterización como agentes tensioactivos y su aplicabilidad en tecnología farmacéutica.

3.1 Características Ácido-base (Potenciometría diferencial de barrido, PDB)

La PDB es una metodología analítica desarrollada en nuestro grupo de investigación (Manzo and Luna, 1986). Las características de la técnica son especificadas en el anexo 2, *metodologías analíticas*.

La determinación por potenciometría diferencial de barrido (PDB) se realizó sobre una muestra sólida de $Asc_{16}Na$ (3,69 mg) e indica (figura 2.4) que la muestra corresponde a un compuesto básico sin impurezas ácidas corroborando la estructura química de la sal. Por otra parte la determinación cuantitativa dió como resultado un 92 % de grupos titulables, resultado que es consistente con la posible existencia de un solvato. Esta hipótesis se sustenta también en los resultados obtenidos aplicando las técnicas de análisis térmico (ver punto 3.4).

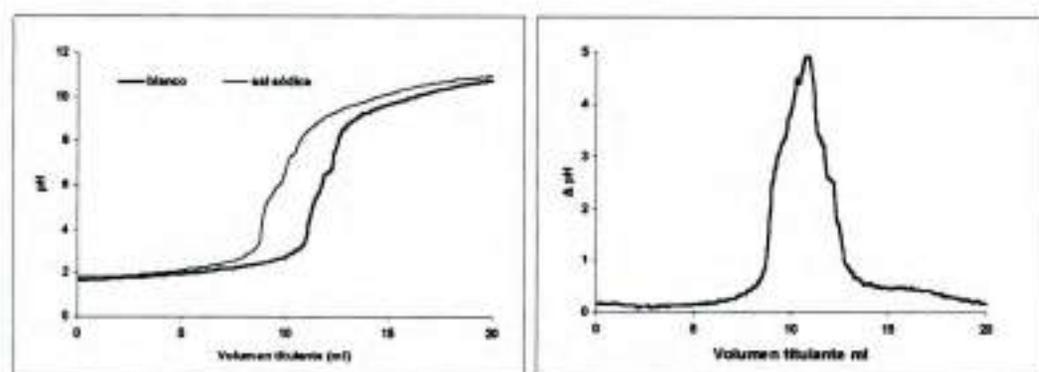


Figura 2.4: Titulación por PDB de $Asc_{16}Na$.

3.2 Solubilidad de Asc₁₆ en función del pH

Se determinó la solubilidad de Asc₁₆ en función del pH. Se observa un perfil característico para un ácido débil muy poco soluble en agua ($pK_a = 4.17$) que por reacción ácido-base genera una sal de mayor solubilidad.

Esta determinación es importante para poder entender que los derivados en forma de ácido tienen un comportamiento dependiente del pH del medio. Esto es fundamental para poder establecer criterios en este aspecto a la hora de evaluar las potenciales aplicaciones en formulaciones farmacéuticas.

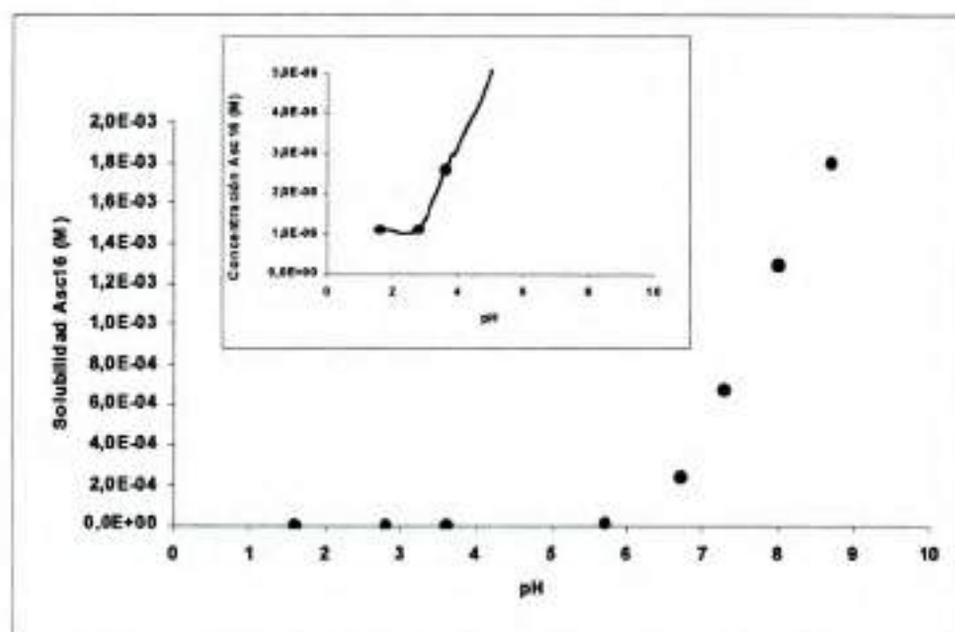


Figura 2.5: Solubilidad de Asc₁₆ en función del pH. El gráfico pequeño representa la misma determinación pero a diferente escala.

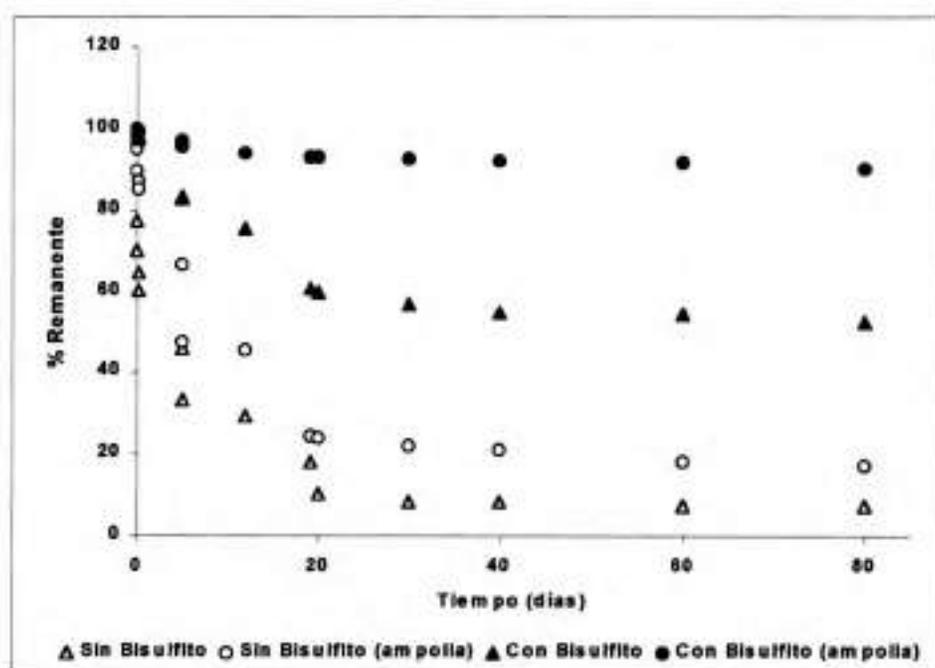
3.3 Estabilidad de Asc₁₆Na

3.3.1 Degradación de Asc₁₆Na

Soluciones de Asc₁₆Na (1%; 0,021 M) fueron colocadas en ampollas herméticas y envases no herméticos. Como conservante se agregó bisulfito de sodio en una concentración de 2,3 mM. A diferentes tiempos se tomaron mediciones espectrofotométricas a 265 nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

Las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

En la figura 2.6 a) se observan los resultados obtenidos, para los sistemas con y sin bisulfito, tanto en envases herméticos (ampollas) como en aquellos que no los son. Por otra parte en la figura 2.6 b) se describe la cinética de degradación de Asc₁₆Na en presencia de bisulfito de sodio.



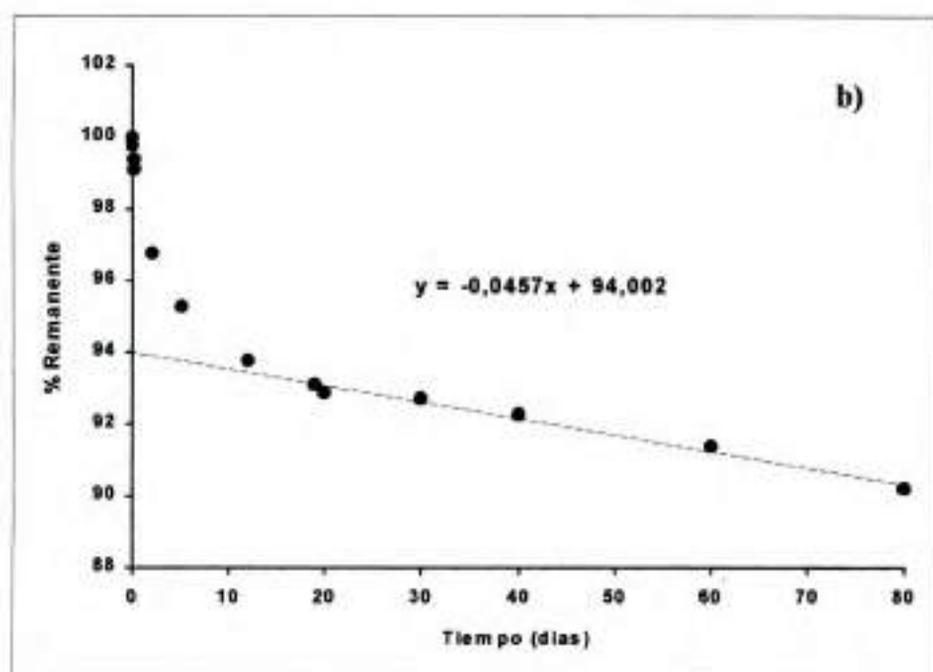


Figura 2.6: a) degradación de Asc₁₆Na en diferentes condiciones, b) cinética de degradación de Asc₁₆Na en presencia de bisulfito de sodio.

Como era de esperar el comportamiento de Asc₁₆Na es similar al de la sal sódica del ácido ascórbico (AscNa). La cinética de degradación de la vitamina C está estrechamente ligada al pH. A medida que el pH aumenta, la estabilidad disminuye de manera marcada. Vale decir, el hecho de salificar el palmitato de ascorbilo disminuye notablemente su estabilidad. De todos modos, el agregado de un agente antioxidante (bisulfito de sodio) aumenta la estabilidad de las soluciones como se ve en la figura 2.6 (a,b). Después de un tiempo relativamente corto donde se verifica una degradación inicial con una cinética de primer orden, la velocidad de degradación se vuelve relativamente constante. Mas allá de los primeros 20 días, las correlación entre la concentración de Asc₁₆Na versus tiempo tiene una constante de orden cero (0,045%/día) y un intercepto de 94%, lo cual indica una rápida degradación inicial.

3.4 Análisis Térmico (Asc₁₆Na)

Los estudios a través de análisis térmico fueron realizados con dos objetivos principales: a) comparar los perfiles de Asc₁₆ y Asc₁₆Na, para confirmar la obtención de

la sal sódica en ausencia de impurezas ácidas y b) corroborar la posible existencia de un solvato de acuerdo a lo obtenido por PDB (ver punto 3.1).

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la termogravimetría (TG) fueron realizadas bajo atmósfera de nitrógeno, utilizando portamuestras (pans) de aluminio cerrados (no herméticos). La rampa de calentamiento fue de 10°C/min.

Se utilizó el siguiente equipamiento: DSC 2920 Modulated y TGA 2950 HI-RES, ambos de TA instruments.

En el análisis térmico (DSC-TG) de Asc₁₆Na obtenido por precipitación se observó, al comienzo de la corrida (aproximadamente 40°C), una pérdida de peso correspondiente a la fórmula Asc₁₆Na.C₂H₅OH (ver figura 2.7), por otra parte, para el compuesto obtenido por liofilización desde una solución acuosa se observó una pérdida de peso que se corresponde con la formación de un hidrato (1:1) (ver figura 2.8). Cabe destacar que por esta misma metodología pudo observarse que las muestras de Asc₁₆Na no presentan la endoterma correspondiente a la fusión de Asc₁₆ (113°C), confirmando la pureza de la sal. Todas las muestras fueron almacenadas bajo atmósfera de nitrógeno mostrando una estabilidad satisfactoria.

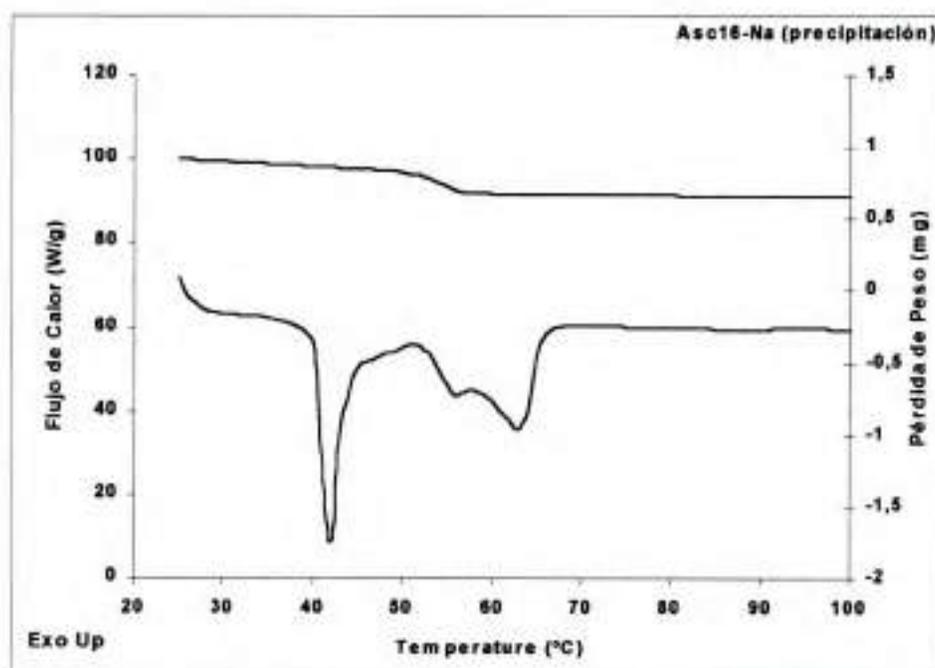


Figura 2.7: DSC y TG de Asc₁₆Na obtenida por precipitación.

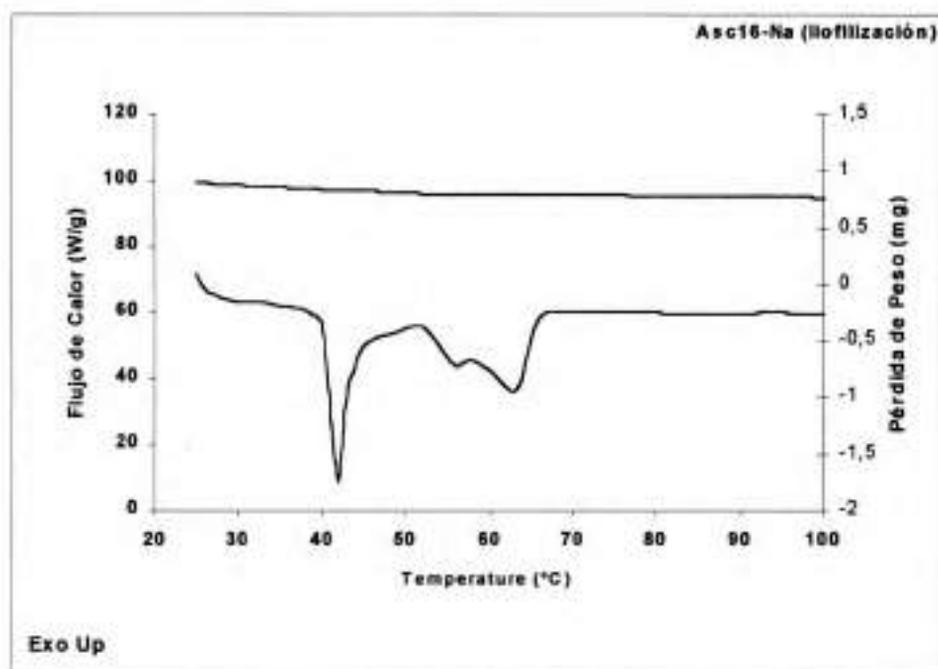


Figura 2.8: DSC y TG de Asc₁₆Na obtenida por liofilización.

3.5 Isoterma de compresión

Las áreas moleculares y los comportamientos de fase de monocapas insolubles de Asc₁₆ y Asc₁₈ fueron determinadas y reportadas en la literatura (Lo Nostro y cols., 1997; Capuzzi y cols., 1996^a)

Obtener estos datos cobran importancia a la hora de predecir los posibles arreglos estructurales que los compuestos anfífilicos pueden tener, y esto está estrechamente relacionado con la geometría de la molécula. Un análisis más exhaustivo de esto se hace en el capítulo 4, *Coageles*. Se decidió entonces evaluar a través de una isoterma de compresión el comportamiento de una monocapa de Asc₁₆Na en la interfase agua-aire. De la extrapolación de la tangente en la región más condensada de la isoterma se obtiene el área por molécula de Asc₁₆Na (21,5 Å²/molécula). Como ya se mencionó, este dato adquiere utilidad en caso de intentar predecir las geometrías potenciales que podrían tener los agregados de Asc₁₆Na.

Para la isoterma de compresión se preparó una solución de la sal sódica en cloroformo-metanol (1-1) y se dispersó sobre la superficie de agua bidestilada (termostaticada a 21 ± 0,5°C) usando una microjeringa. La instrumentación y la metodología utilizada están descritas en bibliografía (Perillo y cols., 1994). Este experimento se realizó en el

departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC, en el laboratorio del Dr. Bruno Maggio).

La descripción teórica de la técnica se encuentra en el anexo II, *metodologías analíticas*, y la isoterma es observada en la figura 2.9.

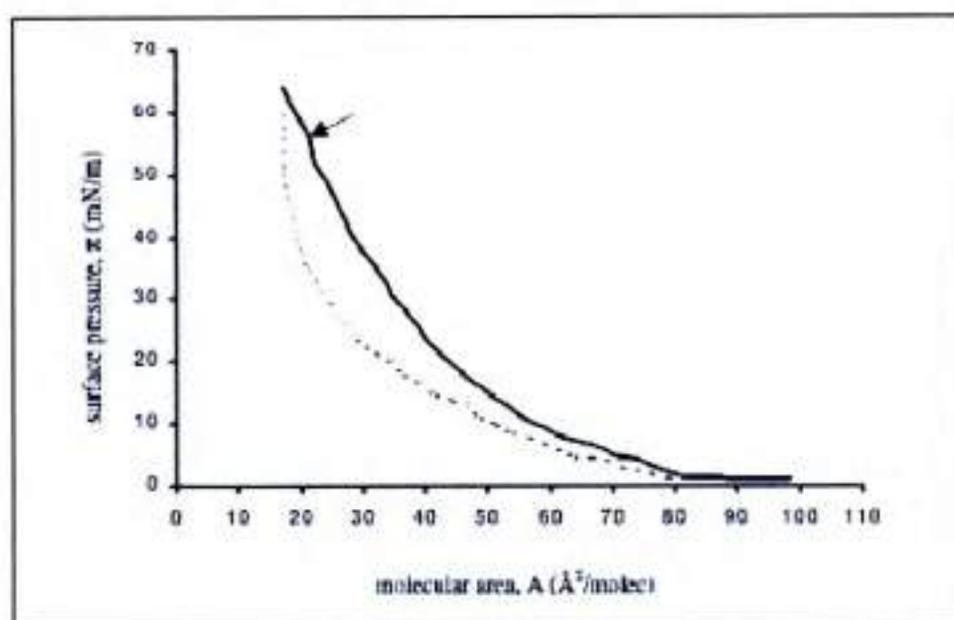


Figura 2.9: Isoterma de compresión para Asc₁₆Na (21 ± 0,5°C). Línea completa: compresión; Línea de puntos (descompresión). (Palma y cols., 2002^b)

4. Conclusiones generales del capítulo

La estrategia de sintetizar sales de Asc_n puede ser una alternativa viable para obtener derivados más solubles y factibles de ser manipulados a T° ambiente desde el punto de vista farmacéutico (dispersiones micelares).

Asc₁₆Na mostró una TMC de 26.5 °C. Esta disminución de *K_p* permitió obtener dispersiones micelares de este compuesto a T° < 30°C.

Sin embargo la sal sódica de Asc₁₆ es mucho menos estable que la forma ácida. Esta característica haría casi imposible la formulación de este sistema sin el agregado de un agente estabilizante (bisulfito de sodio).

En función de lo expuesto, se estableció la necesidad de obtener nuevos derivados de cadena más corta, con la consecuente variación de su TMC y la posibilidad de utilizarlos en forma de ácido.

Capítulo 3

Propiedades de agregación

1. Introducción

Las propiedades de los AT hacen posible su agregación supramolecular dependiendo de diversos factores entre los que se pueden contar, el medio, la concentración, la temperatura, entre otros. Poder determinar estas propiedades y relacionarlas con las potenciales aplicaciones de estas moléculas es sin duda uno de los principales objetivos del estudio de nuevos derivados con potencial actividad surfactante.

En las interfases (líquido-líquido), para un sistema en equilibrio, la concentración relativa en cada fase (acuosa – oleosa) puede depender del balance entre los grupos hidrofóbicos e hidrofílicos que posee la molécula. Es obvio que el estado de mínima energía sería aquel en donde el surfactante se ubique en las interfases de tal manera que los grupos polares permanezcan en la fase acuosa y las cadenas hidrofóbicas en la fase oleosa. Cuando la concentración AT es alta existen una gran cantidad de moléculas

adyacentes en la interfase que en esencia se ubican en forma paralela una de otra, sin embargo, el ordenamiento y agregación de estas moléculas, tanto en interfases como en medios acuosos, son procesos complejos.

Uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta cuando se estudian las propiedades de los compuestos anfifílicos, además de la habilidad que poseen de ubicarse en la interfase, es la tendencia a *autoagregarse*. Cuando los surfactantes se empaquetan juntos en la interfase para formar monocapas, no actúan independientemente. En efecto, es un sistema altamente dinámico, con moléculas que difunden desde y hacia la interfase en una escala rápida de tiempo, existiendo una interacción entre diferentes moléculas vecinas.

Así como los surfactantes se ubican en las interfases, pueden también autoagregarse en agua produciendo una importante variedad de estructuras, siempre y cuando se supere un rango específico de concentraciones. Estas estructuras incluyen, micelas (que pueden tener diferentes formas: esferas, discos y cilindros), vesículas, liposomas, bicapas, etc. A altas concentraciones, algunos surfactantes forman eventualmente una fase homogénea conocida como mesofase o cristal líquido. En estas mesofases las moléculas de los surfactantes se autoensamblan dentro de varias geometrías posibles, pero dos de ellas son las más comunes, las lamelas, que consisten en estructuras paralelas formadas por bicapas de surfactante y la fase hexagonal, donde agregados cilíndricos o esféricos se empaquetan hexagonalmente unos a otros.

Las estructuras supramoleculares son dinámicas por naturaleza. Las moléculas de surfactante están constantemente "entrando" y "saliendo" de los diferentes sistemas en una escala de tiempo que puede ser tan rápida como microsegundos.

En segundo lugar y claramente relacionado con lo anterior, las diferencias de energía entre los distintos tipos de agregados son bastante pequeñas. La consecuencia directa de esto es que un agregado puede transformarse rápidamente en otro tipo de estructura simplemente por un pequeño cambio en las condiciones, tales como, temperatura, concentración, pH o fuerza iónica. Incluso cuando una fase oleosa es incorporada al sistema como tercer componente, puede producirse espontáneamente la formación de una microemulsión (O/W o W/O). Este fenómeno es actualmente utilizado en sistemas farmacéuticos.

Otro fenómeno importante a considerar cuando se habla de las propiedades de agregación de surfactantes es el *efecto hidrofóbico*. La energía libre estándar (ΔG°) para la transferencia de una molécula hidrocarbonada desde una fase oleosa a una fase acuosa es positiva y de un valor absoluto relativamente alto, reflejando su baja afinidad por el medio acuoso. Un comportamiento similar puede esperarse para las cadenas hidrocarbonadas de los surfactantes. En la figura 3.1 puede observarse el efecto sobre los ΔG° debido a la transferencia de alcanos, alcoholes y ácidos de alcanos desde una fase no acuosa a una acuosa. Las rectas del gráfico indican la relación que se muestra en la tabla 3.1 entre el ΔG° de transferencia de fase y el largo de la cadena alquímica.

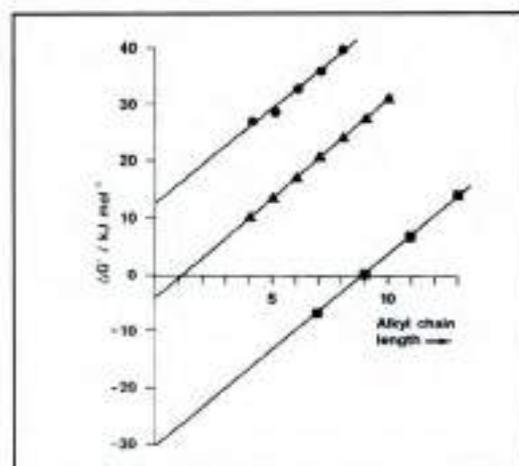


Figura 3.1: Variación de la energía libre para la transferencia de alcanos, alcoholes y ácidos de alcanos desde una fase no acuosa a una acuosa en función del largo de la cadena alquímica. ● n-alcanos, ▲ n-alcoholes, ■ n-alcanos ácidos (Gelbart y cols., 1994).

Tabla 3.1: ΔG° de transferencia de fase.

| Compuestos | $\Delta G^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$ | Referencia |
|-------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| n- alcanos | $12.9 + 3.30n$ | McAulife, 1966 |
| n- alcoholes | $-3.72 + 3.44n$ | Kinoshita y cols., 1958 |
| n- alcanos ácidos | $-30.1 + 3.37n$ | Goodman, 1858 |

El incremento negativo del intercepto (a $n=0$) refleja el incremento de polaridad (hidrofilicidad) de las cabezas polares de los compuestos $-H$, $-OH$, y $-COOH$. Cada grupo metileno agrega una cantidad constante de hidrofobicidad a la molécula, lo cual se ve reflejado en el valor constante de la pendiente (3.4 KJ mol^{-1}).

Para los propósitos de este capítulo, el valor citado de 3.4 KJ mol^{-1} puede relacionarse de una manera muy simple. Se puede considerar la transferencia del grupo $-\text{CH}_2$ desde el entorno hidrofóbico a uno acuoso como la creación de una interfase adicional agua/fase hidrocarbonada. Por cierto el ΔG° de esta interfase puede ser asumido como la tensión interfacial entre el n-alcano líquido y el agua, que tiene un valor aproximado a 50 mNm^{-1} o mJ m^{-2} . La cadena hidrocarbonada del alcano se extiende aproximadamente 0.125 nm por cada CH_2 y además el valor del volumen molar de un grupo metileno aislado en un alcano líquido es de aproximadamente 16 cm^3 . Por otra parte la interfase agua/fase hidrocarbonada adicional por metileno puede estimarse en 0.20 nm^2 .

De este modo el $\Delta G^\circ/\text{mol}$ requerido para crear esta área puede calcularse de la siguiente manera:

$$0.20 \times 10^{-18} \times 50 \times 10^{-3} \times 6 \times 10^{23} \text{ J mol}^{-1}$$

El valor obtenido es 6 KJ mol^{-1} , el cual es mayor al discutido previamente de $3,14 \text{ KJ mol}^{-1}$ pero tiene el mismo orden de magnitud.

Independientemente de todo lo descrito, quizás el proceso más estudiado al menos desde el punto de vista de las aplicaciones farmacéuticas de los surfactantes, es el fenómeno de **micelización** el cual se describirá a continuación.

1.1 Concentración Micelar Crítica (CMC)

1.1.1 Concepto Básicos

Cuando un AT se encuentra en un medio líquido acuoso a baja concentración, este se encuentra como una entidad separada (monómero) y con un tamaño sub-coloidal.

A medida que la concentración aumenta, las moléculas se ubican en la interfase. A determinada concentración, el exceso de surfactante produce una autoagregación dando lugar a la formación de agregados supramoleculares, cuyas formas y dimensiones dependen del tipo de surfactante. Los agregados más sencillos, que pueden estar comprendidos por 50 monómeros, son comúnmente denominados micelas. Un esquema de estas entidades se observa en la figura 3.2.

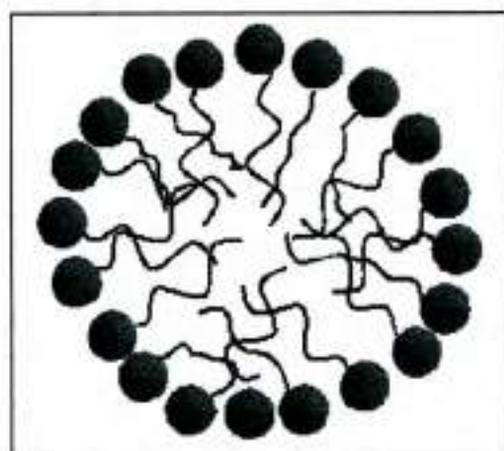


Figura 3.2: Esquematación de una micela.

En forma general se puede decir que un tamaño promedio de una de estas entidades sería 50 Å. La concentración o el rango de concentración de monómeros a partir del cual comienza la formación de agregados se denomina de manera general *Concentración Micelar Crítica (CMC)*. El número de monómeros que integran una micela es conocido como *Número de Agregación*.

El fenómeno de agregación en micelas puede describirse de la siguiente manera. Antes de la CMC, los monómeros del anfífilo se ubican en las interfases, principalmente en aquella aire-agua, y en el seno del solvente. Cuando tanto las interfases y la fase bulk se encuentran saturadas, se alcanza la CMC, por lo tanto superada esta concentración los monómeros que se incorporan al sistema se agregan en forma micelar, disminuyendo por ende la energía libre del sistema. Vale destacar, por ejemplo, que la tensión superficial del sistema permanece esencialmente constante después de la CMC, lo que confirma el hecho que las interfases se encuentran saturadas.

Es importante aclarar que cuando la fase dispersante del sistema es agua, las cadenas o porciones apolares del anfífilo se ubican hacia el interior del agregado supramolecular, formando en efecto un *entorno hidrofóbico*. Alrededor de este *entorno* se encuentran las porciones polares del sistema que están en contacto con la parte acuosa, formando una fase continua. Del mismo modo, la agregación de los compuestos anfífilicos puede ocurrir en sistemas de baja polaridad, con la orientación de los agregados de manera inversa. Este fenómeno se esquematiza en la figura 3.3.

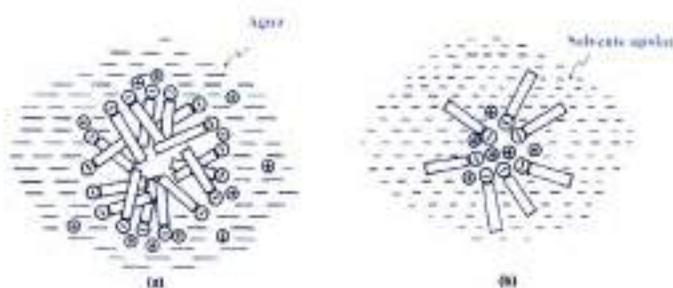


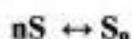
Figura 3.3: Orientación de las moléculas del AT según el medio.

Las micelas pueden formarse a concentraciones relativamente bajas de surfactante. A altas concentraciones se forman agregados de diversa forma y tamaño, que pueden coexistir con micelas esféricas.

1.1.2 Modelos Clásicos en la Formación Micelar

En la literatura, existen dos modelos primarios que explican la formación de micelas, ambos han ganado aceptación y utilidad con el correr del tiempo. Las dos aproximaciones son *a) modelo de acción de masas*, en donde la interrelación entre las micelas y las especies monoméricas es considerada una clase de equilibrio químico, y *b) el modelo de separación de fases*, en donde las micelas son consideradas como una nueva fase que se forma en el sistema por encima de la CMC. En ambos casos las aproximaciones de la termodinámica clásica son usadas para describir el proceso de micelización en su conjunto.

En el modelo de acción de masas, se asume que existe un equilibrio entre el surfactante monomérico y los agregados supramoleculares. Por ejemplo para el caso de surfactantes no iónicos, el equilibrio monómero-micela puede escribirse como:



con la correspondiente constante de equilibrio, K_m

$$K_m = [S_n] / [S]^n$$

donde los corchetes indican la concentración molar y n es el número de monómeros en la micela (**número de agregación**).

Una posibilidad alternativa de explicar los fenómenos de micelización, es pensar en términos de una separación de fases, en donde en la CMC, la concentración de surfactante como monómero, permanece constante (de manera similar a un límite de solubilidad, K_{ps}), mientras que las nuevas moléculas incorporadas al sistema contribuyen a la formación de micelas.

La utilización de una u otra teoría puede dar lugar a interpretaciones muy similares.

1.1.3 Métodos para la Determinación de la CMC

En principio cualquier propiedad física ilustrada en la figura 3.4 podría ser útil en la determinación de la CMC, pero en la práctica algunas de ellas son más utilizadas, en general porque son de más sencilla aplicación en la mayoría de los casos y porque los datos obtenidos son más reproducibles.

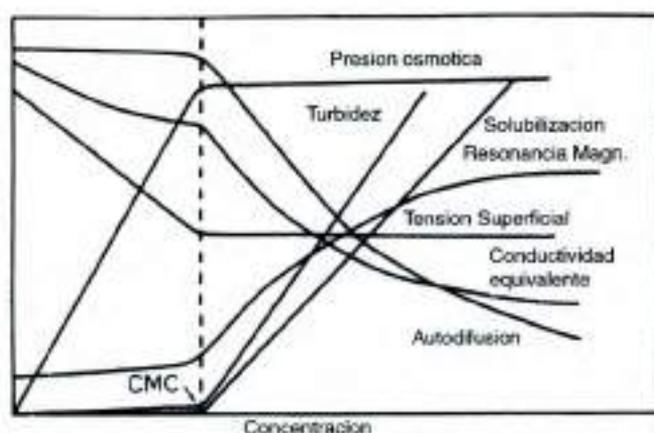


Figura 3.4: Variación de las propiedades del sistema en función de la concentración de AT

A continuación se describirán algunos de los métodos más utilizados en la determinación de la CMC, de todas maneras en el anexo II, *metodologías analíticas*, se hará una descripción de aquellos métodos utilizados en el desarrollo experimental de esta tesis.

Tensión superficial: Este es un método muy interesante porque no necesita de una escala absoluta definida, además de ser bastante sensible y reproducible. La metodología más común es la del anillo de DuNouy (ver Anexo II, *metodologías analíticas*). Los resultados comúnmente obtenidos son esquematizados en la figura 3.5,

donde la curva a) se observa generalmente en surfactantes puros, y presenta una disminución de la tensión superficial hasta un punto donde permanece relativamente constante; del corte de estas dos curvas se puede obtener el valor de la CMC. En las curvas b) y c) se esquematizan los resultados que se obtienen en caso de soluciones de surfactantes que contienen impurezas, el primer caso, sería el de una impureza de naturaleza tal que tiene un efecto sobre la disminución de la tensión superficial más marcado que el propio surfactante en estudio, mientras que la segunda curva es el efecto contrario, vale decir, una solución del surfactante donde la impureza tiene un efecto sobre la disminución de la tensión superficial menos importante, que la del surfactante.

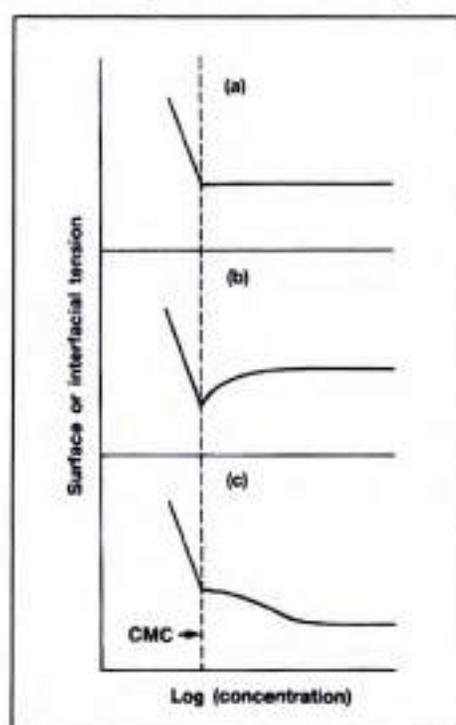


Figura 3.5: Variación de la tensión superficial en función de la concentración de tensioactivo.

Esta metodología está descrita para la determinación de la CMC de polisorbato 20 en soluciones acuosas (Mittal, 1972), y para surfactantes no-iónicos de cadena más larga (Schott, 1969), entre otros.

Conductividad: Este método es bastante sencillo y fácil de implementar. Es aplicable a surfactantes iónicos, donde a concentraciones inferiores a la CMC, se observa una curva de pendiente más pronunciada que a concentraciones superiores a la CMC, de esta

manera, del corte de ambas curvas se puede extrapolar la CMC. Esto es debido que los monómeros del compuesto anfifílico son mucho más eficientes como “transportadores” de la carga de la molécula que las propias micelas, es por ello que se observa el fenómeno antes descrito. La precisión de los resultados de CMC obtenidos por conductividad es alta, aunque la sensibilidad del método disminuye marcadamente cuando existe en el sistema un exceso de electrolitos.

Algunos ejemplos de la utilización de esta metodología son: la determinación de la CMC del picrato de dodecilalmonio, en donde se utiliza la conductimetría para estudiar las propiedades de agregación de un compuesto nuevo que se propone como surfactante. (Tomasic y cols, 2000)

Por otra parte, se ha observado que la conductimetría puede aplicarse a sistemas mixtos donde los surfactantes se combinan con alcoholes (Castedo y cols, 1997; Kaneshina y cols, 1981)

Este método puede utilizarse cuando se presenta el surfactante en sistemas farmacéuticos, combinado con drogas y se quiere estudiar como estas afectan los parámetros de agregación. (Hirata, 1997).

También cabe destacar que está descrito en bibliografía la utilización de la conductimetría en la determinación de la CMC de sales biliares, como un ejemplo del alcance que ofrece la metodología. (Volonte y cols, 1989).

Existen además publicaciones en donde se comparan diversos métodos para determinar CMC, los resultados obtenidos muestran que la conductimetría permite obtener resultados similares a otras metodologías mucho más complejas, sin necesidad de utilizar sustancias de referencias, o calibraciones engorrosas (Correia y cols, 1995).

Light Scattering: La variación con la concentración de la intensidad de la luz dispersada, desde una solución de un AT muestra un cambio abrupto en la cercanía de la CMC. Por este motivo, la metodología provee un resultado estimativo de la CMC. Una ventaja sería que el light scattering ofrece además, bajo ciertas condiciones, idea del tamaño y la forma de los agregados. No obstante, estos experimentos requieren de cuidadosa filtración de las soluciones para remover partículas extrañas que de estar presentes interferirían marcadamente con la determinación, principalmente para surfactantes de muy baja concentración micelar crítica.

Solubilización: Las micelas de surfactantes proveen de un microambiente ideal en donde pueden ser solubilizadas sustancias hidrofóbicas (este proceso será descrito con más detalle en el capítulo 5, *propiedades de relevancia farmacéutica*).

En forma general se utiliza una metodología analítica apropiada para cada fármaco (UV-Vis, HPLC, etc) y de esta manera determinar la concentración a partir de la cual comienza la formación micelar.

Este método de determinación de CMC presenta el inconveniente de que las moléculas solubilizadas pueden alterar las propiedades de agregación, y por lo tanto alterar la medición.

Autodifusión: En este caso el principio es muy similar al descrito para la conductividad. Si el surfactante existe en forma radiomarcada, el coeficiente de autodifusión puede utilizarse para determinar la CMC. En virtud de la imposibilidad de utilizar la conductividad para no electrolitos este método puede ser una buena alternativa.

1.1.4 Factores que afectan la CMC

Influencia del grupo hidrofóbico: Cuando se trata de un surfactante con una sola cadena alquímica la variación de la CMC es lineal. A medida que aumenta el PM (agregado de CH_2), se observa una disminución de la CMC. No obstante esta relación puede ser variable para cadenas alquímicas cortas ($n \leq 8$), debido a la influencia relativa del grupo polar.

Efecto del pH en la CMC: Cuando las moléculas de surfactantes poseen grupos ionizables como $-\text{NH}_2$, o $-\text{COOH}$, el grado de ionización puede ser influenciado por el pH. Como regla general se puede decir que a pHs en donde el grupo está disociado, la CMC puede ser más alta; por el contrario cuando el grupo polar no está cargado la CMC puede bajar.

Efecto de los electrolitos en la CMC: El efecto de los electrolitos en la CMC, es marcado en el caso de surfactantes iónicos. En solución, cuando se incrementa la fuerza iónica, las fuerzas electrostáticas de repulsión entre los grupos polares en las micelas son considerablemente reducidas, en consecuencia, estas estructuras se forman con

mayor facilidad. En otras palabras, la CMC puede ser reducida por adición de electrolitos.

Para surfactantes no-iónicos la situación es mucho más compleja. Aquellos electrolitos que son capaces de producir el fenómeno de "salting out" reducen la CMC. Un ejemplo de este fenómeno se observa en un artículo (Shick, 1962) en donde se evalúa la influencia KCl, NaBr y NaBO₃ y se comprueba que, como regla general, los iones hidratados pequeños son más efectivos reduciendo la CMC.

Todo esto puede ser explicado también desde la teoría de la doble capa eléctrica.

Efecto de las variables intensivas: En algunas aplicaciones de los surfactantes, la temperatura y la presión pueden alcanzar valores relativamente altos. Esta última es una variable que dejaremos de lado en virtud de que no tiene importancia práctica en sistemas farmacéuticos.

El efecto de la temperatura podría definirse como inverso al de los electrolitos, porque para surfactantes no iónicos la situación es muy simple mientras que, para surfactantes iónicos, la situación se torna más compleja.

Para surfactantes no iónicos basados en cadenas de polietilenóxidos (PEO), la CMC decrece con el incremento de la temperatura con motivo de la disminución de la hidrofobicidad de la cadena apolar (Becher, 1967).

Como principales factores responsables de este comportamiento se pueden citar:

- Cambio de la estructura del agua alrededor de los grupos EO.
- Cambios en los puentes hidrógenos de los grupos EO, y
- Cambios en la conformación de las cadenas de EO.

Por el contrario, el efecto de la temperatura en la CMC de los surfactantes iónicos es bastante más complejo. Usualmente la CMC tiene un mínimo y los datos para muchos surfactantes aniónicos y catiónicos pueden reducirse a una simple curva parábola simétrica (La Mesa, 1990)

1.2 Temperatura Micelar Crítica (TMC)

Otra propiedad muy importante de los agentes surfactantes y eje principal de este trabajo de tesis es la *Temperatura Micelar Crítica (TMC) o Krafft Point (K_p)*. Para muchos solutos en agua, el incremento de la temperatura usualmente produce un aumento gradual de la solubilidad. Al final del siglo XIX, se pudo comprobar que los surfactantes pueden tener en algunos casos un comportamiento anómalo en este aspecto (Krafft P, 1899). Los surfactantes que presentan esta particularidad tienen una temperatura a la cual la solubilidad aumenta repentinamente. Este fenómeno ha sido insuficientemente descrito en sistemas farmacéuticos.

1.2.1 Conceptos básicos

En términos generales se describe la TMC como el rango de temperatura donde la solubilidad del surfactante alcanza la CMC. Antes del K_p la solubilidad del compuesto anfifílico es insuficiente para formar agregados supramoleculares. Cuando la temperatura es incrementada, la solubilidad aumenta lentamente, hasta la temperatura crítica en donde se observa un incremento marcado de la solubilidad, que es causado por la formación de micelas (Martin, 1993).

Solamente ciertos surfactantes iónicos y no iónicos presentan este fenómeno (Shott, 1969).

Este comportamiento está también relacionado con las propiedades físicas del sistema. Algunos surfactantes forman cristales hidratados (cristales líquidos), cuyas propiedades están relacionadas con las características de los ácidos grasos esterificados. De este modo, la fusión de estos sustituyentes está cuantitativamente relacionada con la TMC del tensioactivo.

La energía involucrada en la formación del cristal hidratado es un parámetro importante en el K_p . Consecuentemente, surfactantes con altas TMC tienen grupos iónicos como cabeza polar o cabezas polares altamente compactas y largas cadenas hidrocarbonadas. Estos arreglos estructurales aumentan la interacción intermolecular. Contrariamente, bajos K_p pueden ser atribuidos a la introducción de ramificaciones en las cadenas apolares o grupos polares relativamente voluminosos (Clint, 1992).

1.2.2 Métodos para determinar la TMC

El K_p ha sido descrito en diferentes sistemas y puede ser determinado por diferentes metodologías.

Por ejemplo, las soluciones de tetracaína, un anestésico local de naturaleza anfifílica, poseen propiedades coloidales que son determinadas mediante el uso de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Una de las propiedades estudiadas es el K_p y se describe la entalpía de fusión del cristal hidratado (Kaneshina y cols., 1993). La misma metodología es utilizada para una serie de anestésicos, en donde se describe el fenómeno de Krafft (Matsuki y cols., 1996).

La conductimetría es otra metodología descrita para la determinación de TMC (Hirata y cols., 1996). Valiéndose de esta última técnica se ha reportado que la presión atmosférica es un factor importante en el valor de K_p de surfactantes iónicos (Nishikido y cols., 1982).

Si bien la mayoría de los trabajos publicados describiendo este fenómeno hacen referencia a surfactantes iónicos, se ha informado que algunos surfactantes del tipo zwitteriónico presentan fenómeno de Krafft (Tsuji and Mino, 1978).

1.3 Formación de Coagel

Cuando los tensioactivos que presentan esta propiedad son colocados en agua a temperaturas inferiores a la TMC se encuentran como una suspensión, sin embargo cuando aumenta la temperatura por encima del K_p forman agregados dependiendo de sus posibilidades geométricas. **El retorno del sistema a una temperatura menor a la TMC no trae aparejado la precipitación del tensioactivo.** Aparentemente el sistema no tendría posibilidades cinéticas de perder la estructura formada y por lo tanto revierte al sistema denominado **coagel**. (Kohler y cols., 1988).

Este fenómeno es conocido para algunos surfactantes (Mantsch y cols., 1984) pero ha sido insuficientemente descrito y se desconocen aplicaciones en sistemas farmacéuticos.

Esta situación puede ser visualizada macroscópicamente en fotografías que se incluyen en el capítulo 4, *coageles*.

2. Parte Experimental

2.1 Determinación de la Concentración Micelar Crítica (CMC)

Como se ha descrito anteriormente existen diferentes metodologías para determinar la CMC. Para el presente trabajo se han seleccionado los métodos de conductimetría y tensión superficial. Asimismo, los valores de CMC para distintos derivados fueron obtenidos como datos secundarios de la medición de otras propiedades, como por ejemplo, la solubilización de drogas poco solubles o la medición de un derivado insoluble en agua.

2.1.1 Conductimetría

Esta metodología, posible de ser aplicada en el caso de surfactantes iónicos, es una manera simple de obtener valores de CMC. Consiste en medir la conductividad de una solución a concentraciones crecientes surfactante. La conductividad como una propiedad coligativa aumenta linealmente a medida que aumenta la cantidad de surfactante. Cuando a cierta concentración los monómeros comienzan a agregarse se observa un cambio de pendiente en virtud del cambio de la relación carga / masa, debido a la incorporación de monómeros (especies cargadas) en las micelas (agregados supramoleculares). De este modo, se observa habitualmente un gráfico con dos curvas de pendientes diferentes a concentraciones sub y supramicelares. De la intersección de estas curvas se puede obtener el valor de CMC. Es muy importante tener en cuenta ciertas consideraciones: a) que la CMC es un rango de concentraciones y b) que las distintas metodologías pueden diferir ligeramente en los resultados de acuerdo a la propiedad que midan.

En nuestro trabajo se determinaron las CMC de los derivados más solubles en agua, es decir, Asc8, Asc10 y Asc16-Na. Para derivados de mayor PM ($n \geq 12$), el método presentó problemas técnicos debido a la alta temperatura de trabajo ($T^\circ > TMC$; $T^\circ > 45^\circ\text{C}$)

2.1.1.1 Metodología y materiales utilizados

Los distintos valores de CMC fueron obtenidos por dilución continua utilizando una bureta automática Metrohn Dosimat 665, y un conductímetro Metrohn 712 con una

constante de celda de 0,942/cm. Todos los experimentos fueron realizados por cuadruplicado. Los resultados obtenidos son observados en las figuras 3.6, 3.7 y 3.8 y resumidos en la tabla 3.2 donde se coloca también la temperatura utilizada (siempre por encima de la TMC) en cada determinación. El agua utilizada fue MQ.

2.1.1.2 Resultados obtenidos

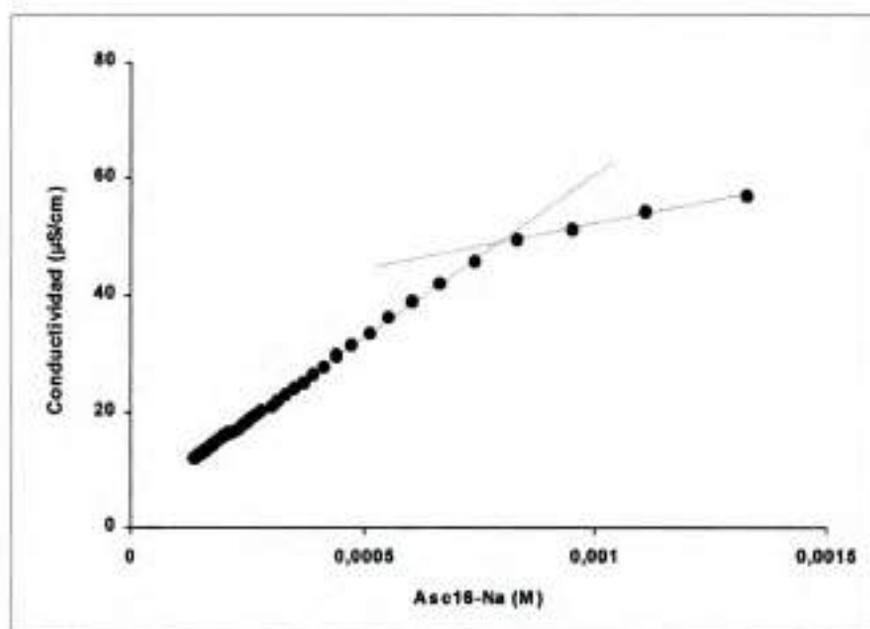


Figura 3.6: Determinación de CMC de Asc_{16}Na por conductividad.

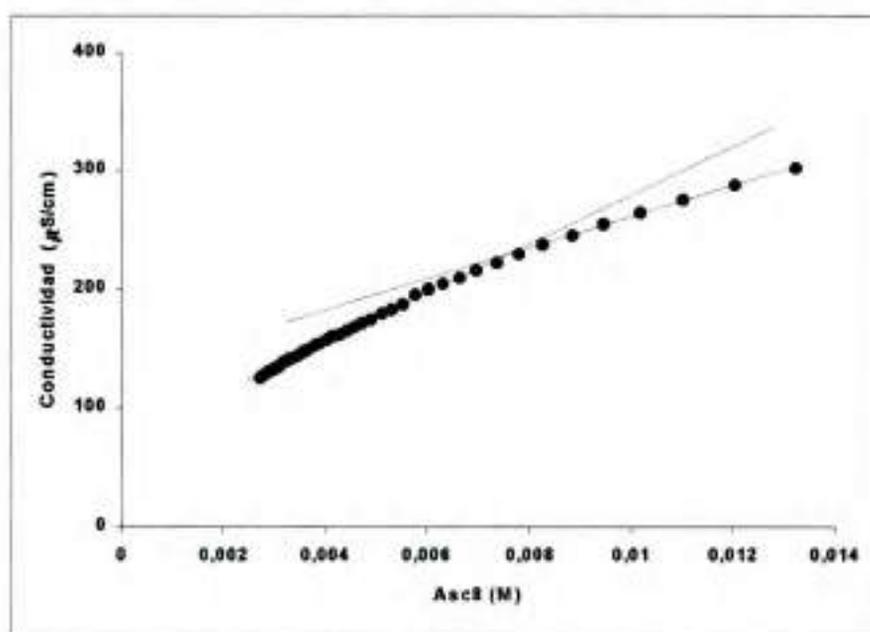


Figura 3.7: Determinación de CMC de Asc_8 por conductividad.

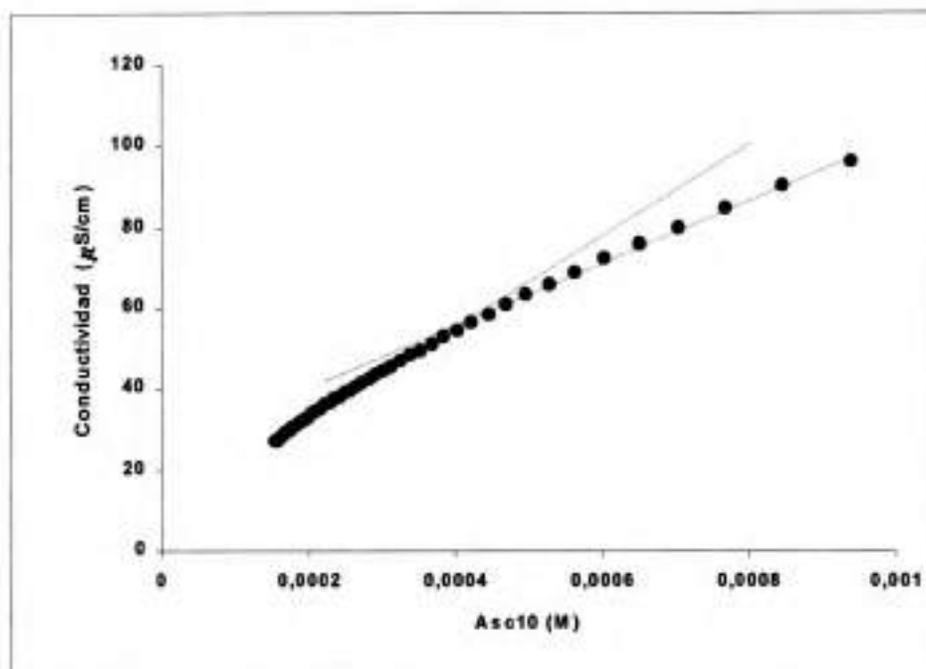


Figura 3.8: Determinación de CMC de Asc_{10} por conductividad

2.1.2 CMC por Tensión Superficial

La medición de la tensión superficial es realizada con un tensiómetro. El aparato sumerge un sensor, que puede ser de diferentes formas, en la fase bulk, para luego medir por intermedio de una balanza, la fuerza necesaria para “despegar” el sensor de la superficie. En el anexo II, *metodologías analíticas*, se describe con más detalle esta técnica.

2.1.2.1 Metodología y materiales utilizados

Se utilizó como sensor el anillo de DuNouy. Este método utiliza la interacción de un anillo de platino con la superficie a ser testeada. (ver anexo II, *metodologías analíticas*). El software del aparato informa un máximo de tensión superficial promedio, sin despegar el anillo de la superficie.

Esta determinación se llevó a cabo con un tensiómetro marca KSV modelo Sigma 70. Se realizaron determinaciones sobre Asc_{16}Na y Asc_{10} . Se partió de soluciones

concentradas de cada uno de los derivados, midiendo la tensión superficial, de la solución de partida y posteriormente se diluyó agregando agua MQ.

2.1.2.2 Resultados obtenidos

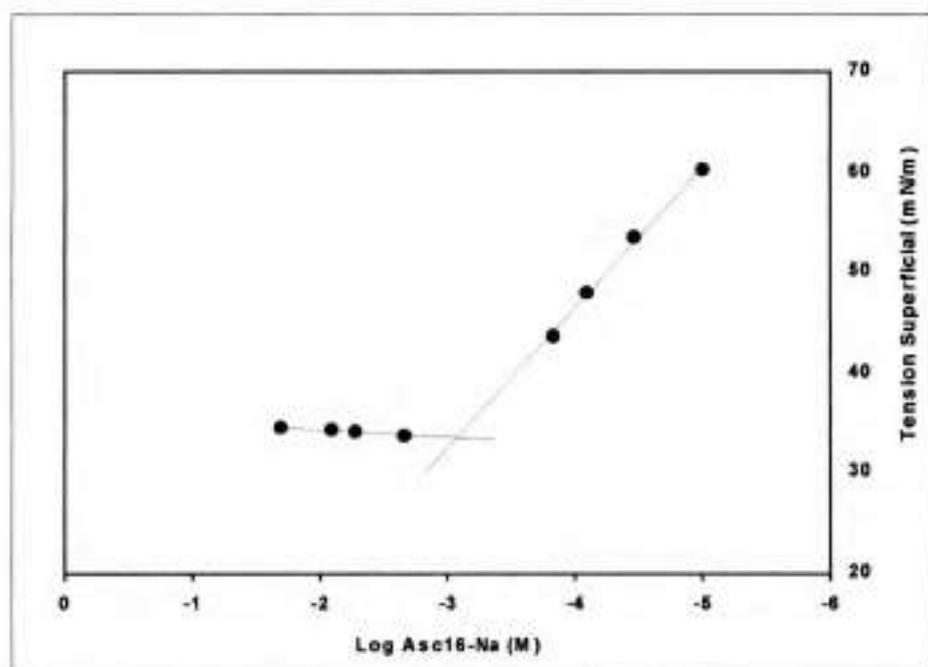


Figura 3.9: Determinación de CMC de Asc₁₆Na por tensión superficial.

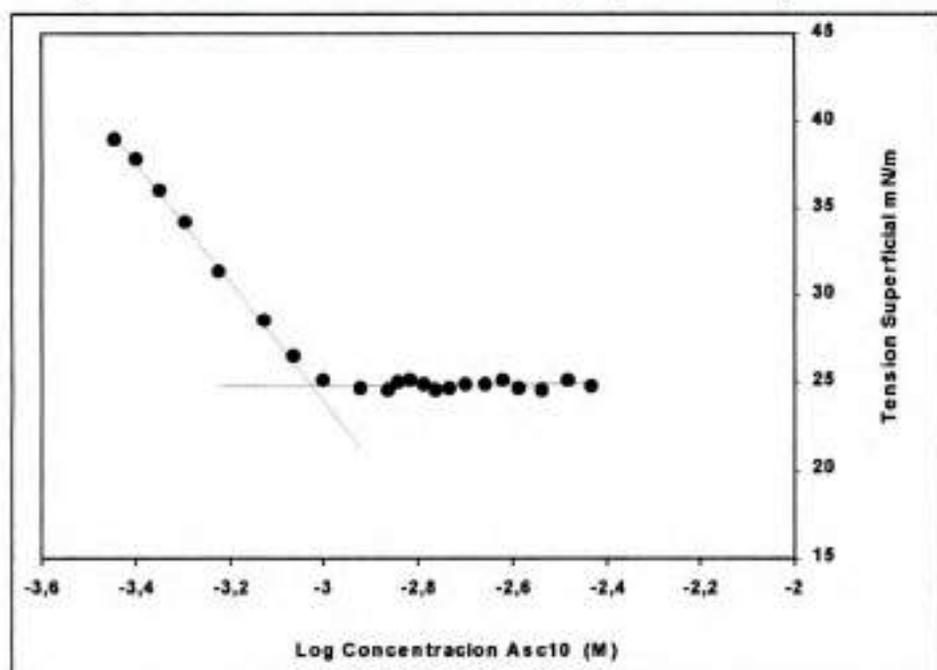


Figura 3.10: Determinación de CMC de Asc₁₀ por Tensión Superficial

2.2 Determinación de Temperatura Micelar Crítica (TMC)

Si bien en bibliografía no hay descritas tantas metodologías como en el caso de la CMC, existen algunas que pueden ser aplicadas y reproducidas sin problemas en los sistemas en estudio.

2.2.1 Conductimetría

Esta metodología también fue aplicada a la determinación de TMC. Como se ha mencionado anteriormente, antes del K_p , la solubilidad de los surfactantes es insuficiente para poder agregarse. Por lo tanto cuando se mide la conductividad de una suspensión del Asc_n , el valor obtenido está dado en forma mayoritaria por la mínima cantidad de monómero disuelto en el medio. Cuando se comienza a aumentar la temperatura, se verifica un aumento gradual de la conductividad. Este aumento lineal es interrumpido bruscamente en la zona de la TMC, por un salto de conductividad debido al aumento de moléculas en solución, este punto puede ser por lo tanto detectado y medido sin problemas.

2.2.1.1 Metodología y materiales utilizados

La determinación de TMC fue realizada para todos los derivados, incluyendo Asc_{16-Na} y Asc_{11} . Se prepararon suspensiones con una concentración del 0.5 % P/V y se registró la conductividad utilizando un aparato marca Radiometer versus la temperatura la cual se controló con un aparato marca CAT MCS 66 el cual permite medir la temperatura en la muestra y tener la posibilidad de regular la rampa de calentamiento. Esto último se hizo a una velocidad de $1^\circ\text{C}/5'$. Todas las determinaciones fueron realizadas por cuadruplicado. El agua utilizada fue MQ.

2.2.2 Calorimetría diferencial de Barrido (DSC)

Otra metodología que se aplicó a la determinación de la TMC fue DSC. De esta manera lo que se hace es determinar la temperatura de transición entre el coagel y la fase micelar (o gel, ver capítulo 4, *coageles*). Esto se observa en general como un pico endotérmico en el gráfico de flujo de calor vs. temperatura. Si bien esta metodología nos

da otros datos importantes como por ejemplo la entropía y entalpía de la transición, en este capítulo solo nos detendremos en el dato puntual de TMC.

2.2.2.1 Metodología y materiales utilizados

La TMC mediante DSC fue calculada utilizando un equipo marca TA instruments, modelo DSC 2920, utilizando portamuestras de aluminio cerrados, pero no herméticos. La corrida fue realizada en atmósfera inerte (N_2) y con una rampa de calentamiento de $1^\circ/\text{min}$.

Se prepararon suspensiones de los Asc_n a una concentración de 10% P/V, se calentó por encima de la TMC y cuando se obtuvo la dispersión se colocaron $10 \mu\text{l}$ en el porta muestra, sellándolo y dejándolo a T° ambiente durante 1 hora, a excepción de Asc_8 que se mantuvo a $7-8^\circ\text{C}$ por el mismo lapso de tiempo. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

2.2.3 Resultados obtenidos por Conductimetría y DSC

Tanto la DSC como la conductimetría arrojaron resultados muy similares por lo cual y a los fines de simplificar el análisis de los datos obtenidos se presentan los resultados en gráficos donde se superpone la determinación por ambas técnicas.

Es importante aclarar que la determinación de la TMC tiene algunas consideraciones experimentales a la hora de asignar un valor concreto a esta propiedad. En el caso de la conductimetría se consideró el punto de intersección de las dos curvas de distinta pendiente (ver figuras 3.11, 3.12, 3.13, 3.14 y 3.15), pero teniendo en cuenta que la TMC puede ser considerada como un rango de temperatura, se podría haber determinado también el delta de temperatura en el cual la conductividad aumenta bruscamente, o bien un punto intermedio. Por otra parte cuando uno observa los termogramas (DSC) tiene la opción de considerar el mínimo de la endoterma, o bien el comienzo de la misma (onset). Considerar una u otra opción fue arbitrario y se ve reflejado en la tabla 3.2 (página 55).

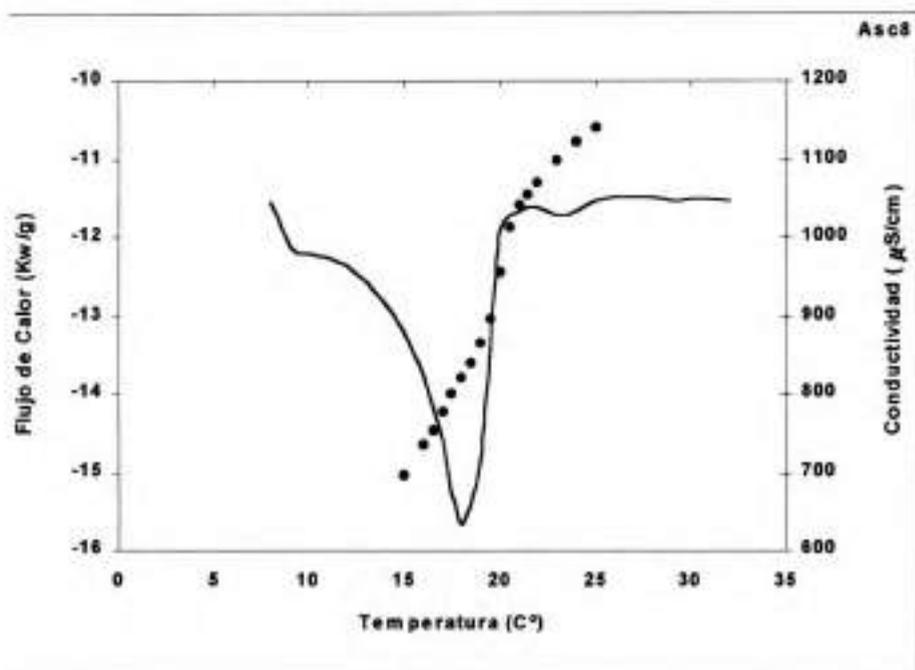


Figura 3.11: Determinación de TMC de Asc₈ por conductividad y DSC

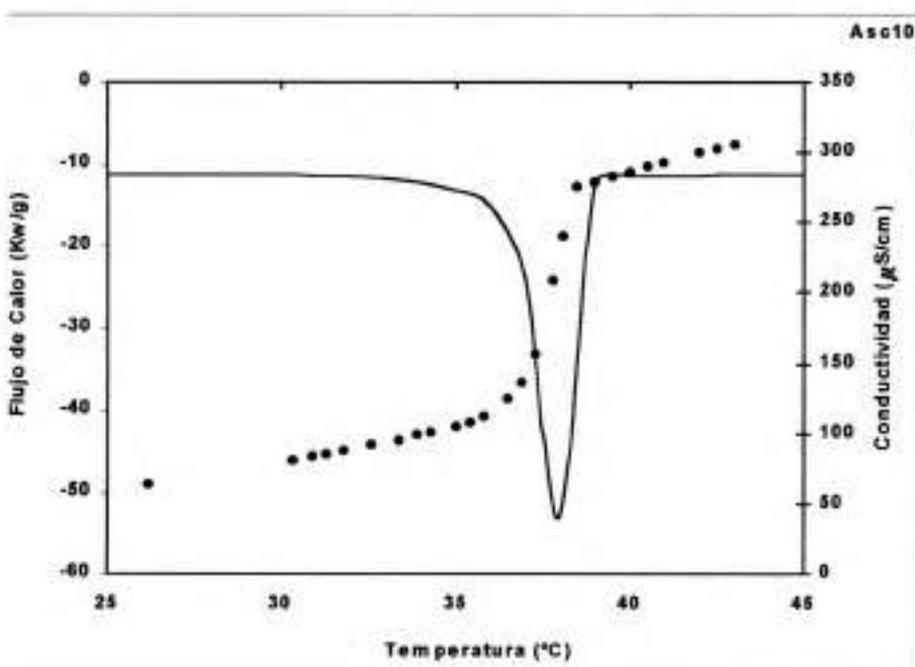


Figura 3.12: Determinación de TMC de Asc₁₀ por conductividad y DSC

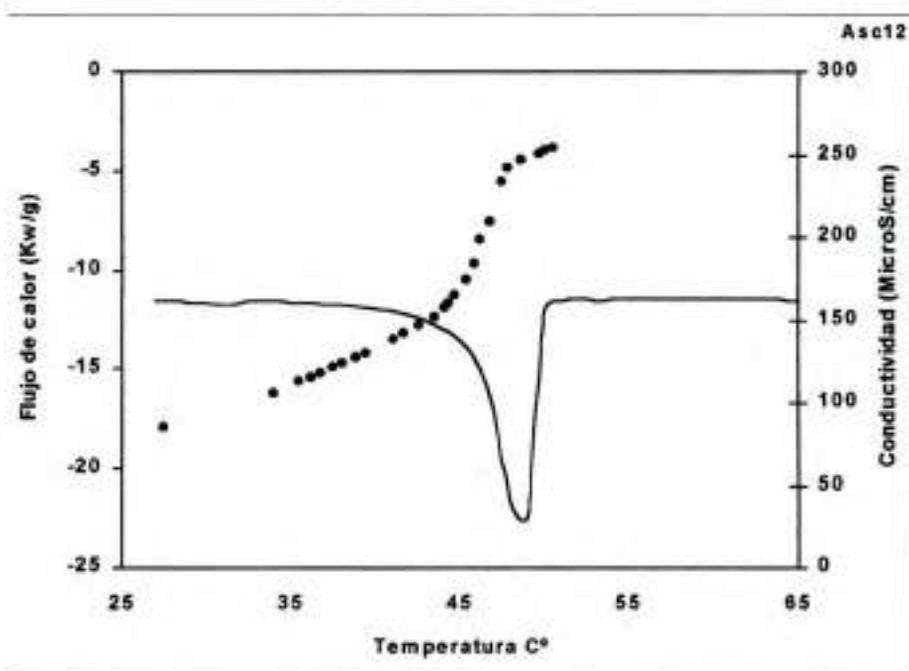


Figura 3.13: Determinación de TMC de Asc₁₂ por conductividad y DSC

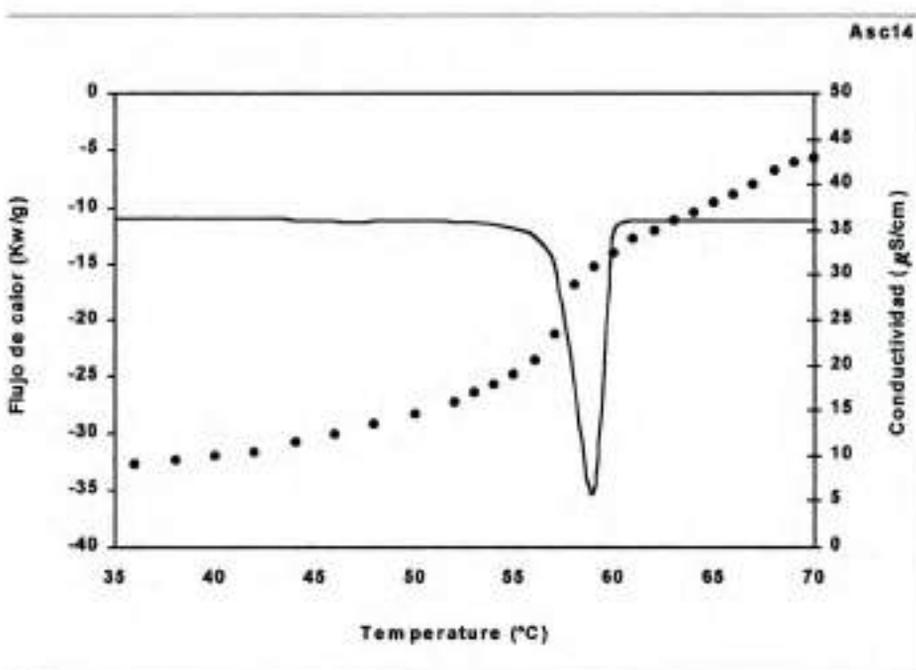


Figura 3.14: Determinación de TMC de Asc₁₄ por conductividad y DSC.

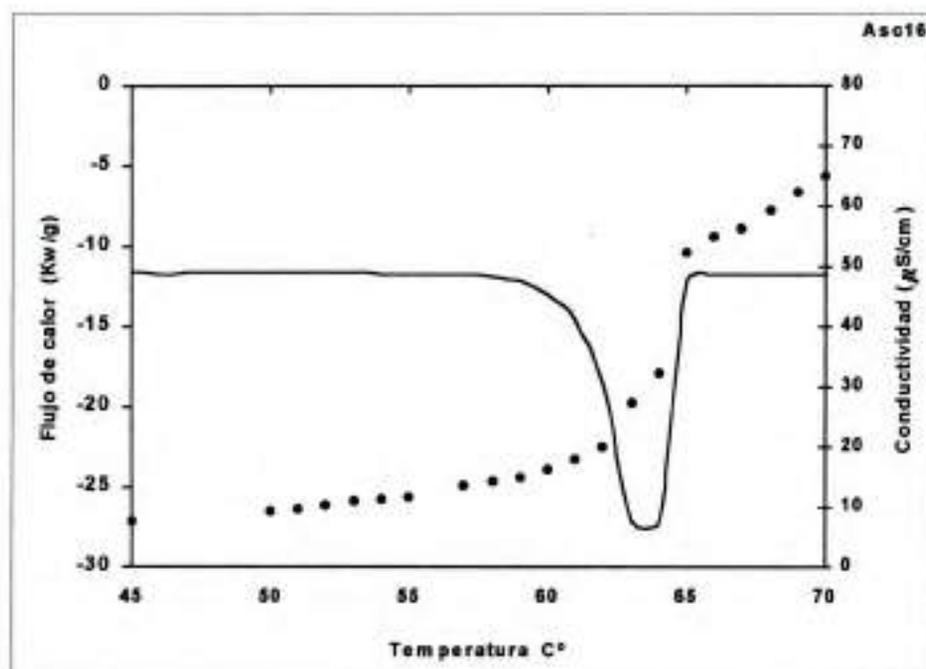


Figura 3.15: Determinación de TMC de Asc₁₆ por conductividad y DSC

2.2.4 Solubilidad de Asc₁₀

Como se ha descrito anteriormente la TMC o el Krafft Point puede ser interpretado como la temperatura a la cual la solubilidad de un agente surfactante alcanza la CMC, vale decir que se aplicaría prácticamente a aquellos surfactantes poco solubles, que no alcanzan a agregarse a temperaturas bajas.

Para describir este fenómeno en estos términos se procedió a medir la solubilidad de Asc₁₀ en función de la temperatura, de esta manera se comprobó que es posible determinar por esta metodología no solo la TMC sino también la CMC extrapolando el cruce de las dos curvas en el eje de la concentración.

Es importante destacar que si bien es una determinación sumamente útil no se pudo realizar con todos los derivados en virtud de la enorme cantidad de muestra necesaria para determinar la solubilidad, principalmente en aquellos puntos, en los cuales la temperatura es muy cercana a la TMC. Por otra parte la determinación de puntos a temperaturas de 3-4°C por encima de la temperatura crítica es prácticamente inviable en virtud del importante aumento de solubilidad registrado.

2.2.4.1 Metodología y materiales utilizados

Para determinar la solubilidad de Asc_{10} en función de la temperatura se procedió a colocar un exceso del derivado en tubos de cerrado hermético conteniendo agua MQ. Las muestras (suspensiones) por triplicado fueron colocadas en una gradilla a la temperatura inicial y se dejó alcanzar el equilibrio de solubilidad durante 6 hs. Pasado este tiempo se procedió a filtrar las muestras y medir en espectrofotómetro a 265 nm. Esta metodología se repitió para todas las temperaturas elegidas y se graficaron los resultados de dos maneras diferentes como puede observarse en figuras 3.16 y 3.17.

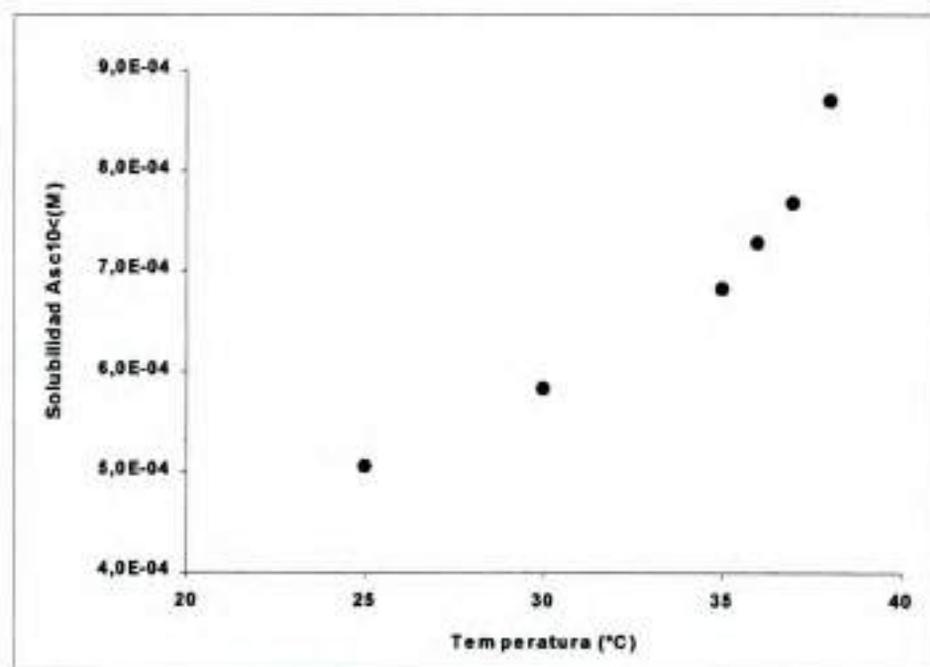


Figura 3.16: Solubilidad de Asc_{10} en función de la temperatura.

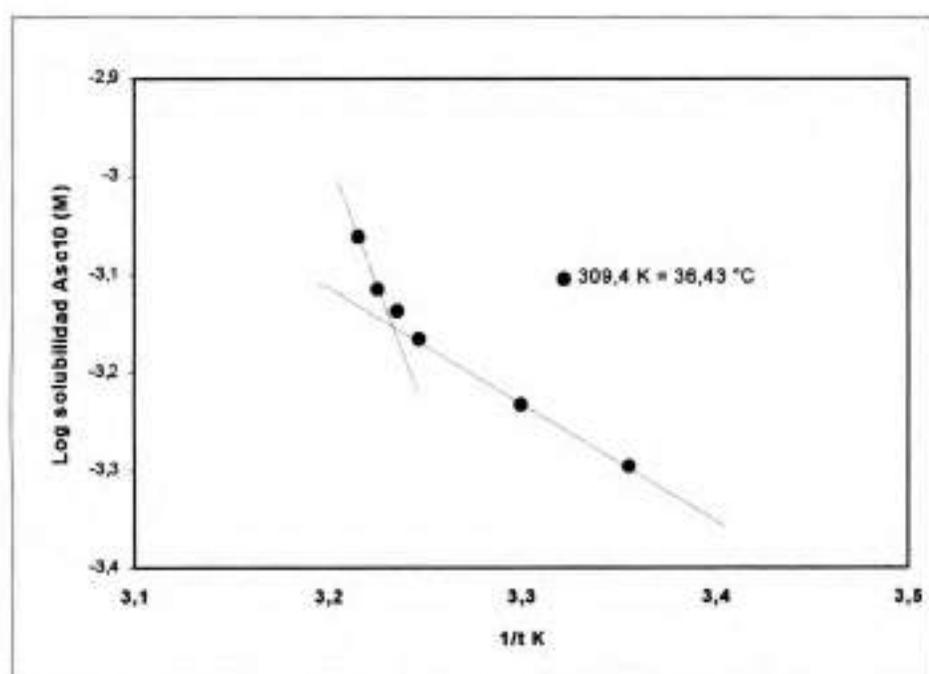


Figura 3.17: Determinación de TMC de Asc₁₀ por solubilidad

3. Resumen de los resultados obtenidos

En la tabla 3.2 se pueden visualizar los resultados obtenidos en las diferentes determinaciones de CMC y TMC.

3.1 CMC

En este punto es preciso rescatar la importancia de conocer los valores de CMC de los Asc_n. En cualquier medición posterior tanto de índole fisicoquímica como en aquellas determinaciones actualmente en curso (*ver perspectivas*, página 128) donde se estudia el uso de los derivados en sistemas farmacéuticos, se necesita conocer la concentración a partir de la cual el sistema se encuentra agregado.

De todas maneras los datos obtenidos deben analizarse detenidamente en virtud de dos consideraciones importantes: a) la CMC de los derivados se obtuvo en agua pura, cualquier variación de la fase bulk debe ser correspondida con una nueva determinación en ese nuevo medio, b) la obtención de la CMC para derivados de cadena más larga se consideró innecesaria, por un lado porque al haber un aumento de la TMC, la CMC se

tendría que determinar a temperaturas más altas (poco apropiado), y por otro lado porque con el hecho de disponer las CMCs de los derivados de cadena más corta se puede predecir que, para aquellos de cadena más larga la CMC será inferior, y esto ya es un dato muy relevante principalmente cuando se necesita plantear una situación experimental con los Asc_n de los cuales no se dispone de la CMC.

3.2 TMC

Como se ha comentado previamente la determinación de la TMC fue importante para la consecución experimental de este trabajo de tesis. Si bien los datos se analizan en detalle (pero de otra perspectiva) en el capítulo 4, es conveniente destacar algunos puntos relevantes: a) como se observa en la figura 3.18 existe una relación directamente proporcional entre el aumento de la TMC y el aumento del largo de la cadena de los derivados. Los resultados obtenidos fueron similares independientemente de la metodología utilizada. Si se compara las TMCs con los puntos de fusión de los ácidos grasos constituyentes del Asc_n correspondiente, se superponen. *Esto es consistente con la hipótesis de que el K_P es el punto de fusión de la cadena hidrocarbonada hidratada.*

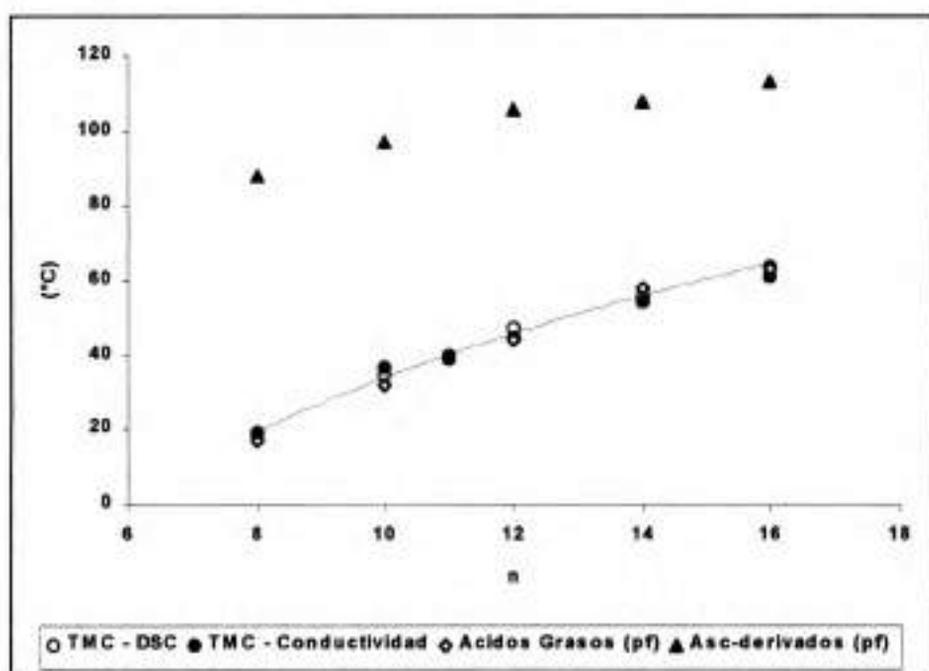


Figura 3.18: TMC de los Asc_n por Conductividad y DSC, puntos de fusión de los Asc_n y punto de fusión de los ácidos grasos.

b) es importante también destacar que en cualquiera de las metodologías utilizadas (DSC o Conductividad) se puede interpretar la TMC de dos maneras diferentes y nosotros hemos tomado una de ellas de manera totalmente arbitraria. En el caso de la conductividad como se observa en las figuras 3.11, 3.12, 3.13, 3.14 y 3.15, se pueden verificar tres rectas de pendientes diferentes, el primer tramo esta dado por el cambio de conductividad que se registra a medida que la temperatura aumenta por aumento de la movilidad de las especies cargadas y por incremento de la solubilidad del Asc_n , posteriormente cuando se alcanza la TMC se verifica un cambio de pendiente generalmente brusco, por el incremento marcado de la cantidad de especies en solución (o solución micelar), para luego observarse un tercer cambio de pendiente cuando todo el derivado que estaba en suspensión pasa a la dispersión micelar y desde ese punto la conductividad varia solo por efecto de la temperatura. Por este motivo se debía definir cual era el punto a tomar en cuenta para determinar el K_p . Teniendo en cuenta principalmente la reproducibilidad observada en los diferentes experimentos con el mismo derivado a la misma concentración de partida (suspensión), se tomó como punto de referencia el de intersección de las curvas del primer y segundo tramo.

Por otra parte para los gráficos de DSC se planteaba un dilema similar, es decir, tomar el comienzo de la endoterma o el valor del mínimo del pico observado. Se consideró en este caso que el valor del pico debería ser el que se tomará como K_p pero en este caso se informa también el onset correspondiente. Esta decisión de tomar uno u otro punto se realizó analizando *a posteriori* en forma global los resultados.

Cabe destacar por cierto que la TMC es un **rango** de temperatura.

Tabla 3.2: Resumen de los datos de propiedades de agregación para Asc_n

| | CMC ¹ | CMC ² | TMC ³ | TMC ⁴ | TMC ⁵ | TMC ⁶ |
|----------|------------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Concentración (M) | | Temperatura (°C) | | | |
| Asc8 | 6,1 x 10 ⁻³ | 6,0 x 10 ⁻³ | 19,3 | 18,5 | 16,8 | - |
| Asc10 | 7,7 x 10 ⁻⁴ | 9,3 x 10 ⁻⁴ | 36,8 | 34,5 | 34,0 | 36,4 |
| Asc12 | - | - | 44,5 | 47,3 | 46,4 | - |
| Asc14 | - | - | 54,2 | 56,0 | 55,0 | - |
| Asc16 | - | - | 61,3 | 63,8 | 59,2 | - |
| Asc16-Na | 7,9 x 10 ⁻⁴ | 8,5 x 10 ⁻⁴ | 26,5 | - | - | - |

¹ CMC por conductimetría según gráficos (3.6, 3.7, 3.8)

² CMC por tensión superficial según gráficos (3.9, 3.10)

³ TMC por conductimetría según gráficos (3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15)

⁴ TMC por DSC (determinado por el pico de la transición) según gráficos (3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15)

⁵ TMC por DSC (determinado en el "onset" de la transición) según gráficos (3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15)

⁶ TMC por solubilidad según gráficos (3.16, 3.17)

4. Conclusiones

La determinación de las propiedades de agregación es sin lugar a dudas el primer paso para la evaluación de las propiedades de un compuesto químico que se propone como agente surfactante.

Se determinó la CMC en agua para los compuestos de TMC más baja, Asc₁₆Na, Asc₈ y Asc₁₀. Para los derivados de cadena más larga se consideró innecesario realizar estas determinaciones. Los resultados permitieron establecer parámetros para posteriores ensayos, como por ejemplo los estudios de solubilización de drogas donde a) se verificó la capacidad de carga en las micelas, b) se pudo reafirmar los datos de CMC obtenidos (porque la solubilidad aparente de drogas aumentó a partir de la CMC) y c) en cierta forma inferir que, en función de lo que se desprende del punto b) las drogas probadas no

modifican las CMC de los derivados en cuestión. Esto se puede ver en detalle en el capítulo 5, *propiedades de relevancia farmacéutica*.

Por otra parte se determinaron las TMCs para todos los derivados en estudio al menos por dos técnicas diferentes (DSC y Conductividad). Los resultados fueron importantes para determinar las potencialidades de uso de cada derivado (sistemas inyectables, sistemas semisólidos) y además como guía para posteriores estudios tendientes a interpretar la naturaleza del dato de la TMC y de que manera se puede modificar este parámetro en caso de ser necesario.

Por otra parte en este tramo del trabajo de tesis se obtuvieron los coageles de los Asc_n que posteriormente fueron sometidos a diversos estudios.

Capítulo 4

Coageles

1. Introducción general

A temperatura ambiente la solubilidad en agua de los Asc_n es baja, a excepción del derivado de cadena más corta, Asc_8 (Palma y cols., 2002^{a-c})

Como es de esperar, la solubilidad aumenta con la temperatura, dependiendo del largo de la cadena hidrocarbonada. Por otra parte, estos derivados forman dispersiones claras a concentraciones superiores a la CMC y a temperaturas mayores a la TMC (Palma y cols., 2002^c).

Después de enfriar estas dispersiones, se observa la aparición de un sistema semisólido, descrito en algunos casos como un coágulo opaco. Esta fase es típicamente definida como una mesofase semicristalina, un cristal pobremente hidratado o más usualmente como “coagel” (Cg) (Köhler y cols., 1988)

La formación de **Cgs** es característica en muchos surfactantes. Esto ha sido observado para moléculas anfifílicas catiónicas, como por ejemplo sales de alquilamonio. Los coageles se forman también con especies aniónicas como los alquil sulfatos o carboxilatos y los monoglicéridos (Kodama y cols., 1981)

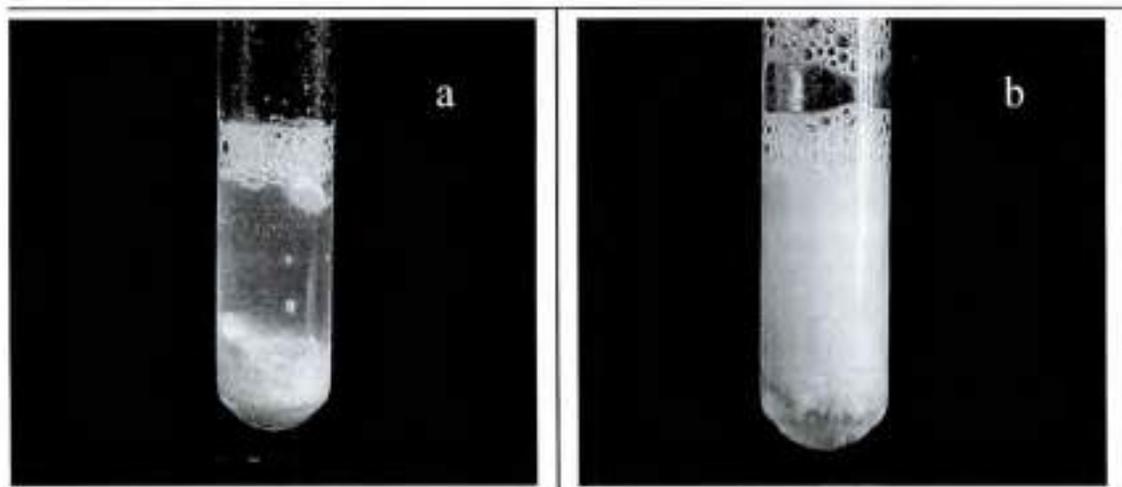
En la siguiente secuencia de fotos, figura 4.1 y tabla 4.1, se puede ver el fenómeno de formación de estas mesofases de modo macroscópico para Asc_{10} .

Estas mesofases usualmente aparecen de color blanco, este es el caso de los coageles de Asc_n . Su estructura microscópica muestra un empaquetamiento cerrado de capas lamelares que producen patrones característicos de difracción de rayos X, como así también birrefringencia óptica.

En la fase coagel, las cadenas hidrocarbonadas tienen una movilidad limitada, y una distancia interlamelar de aproximadamente 10\AA . Una pequeña cantidad de agua fuertemente unida y estructurada separa las bicapas lamelares (Tsuchiya y cols., 1994).

Experimentalmente se observaron diferencias entre los distintos derivados tanto en la apariencia macroscópica de los coageles, como así también en la transición que ocurría a temperaturas superiores al Krafft Point.

Por este motivo se resolvió avanzar en la dilucidación de aquellas estructuras involucradas en estas transiciones, lo cual puede tener importancia en algunas propiedades de relevancia farmacéutica



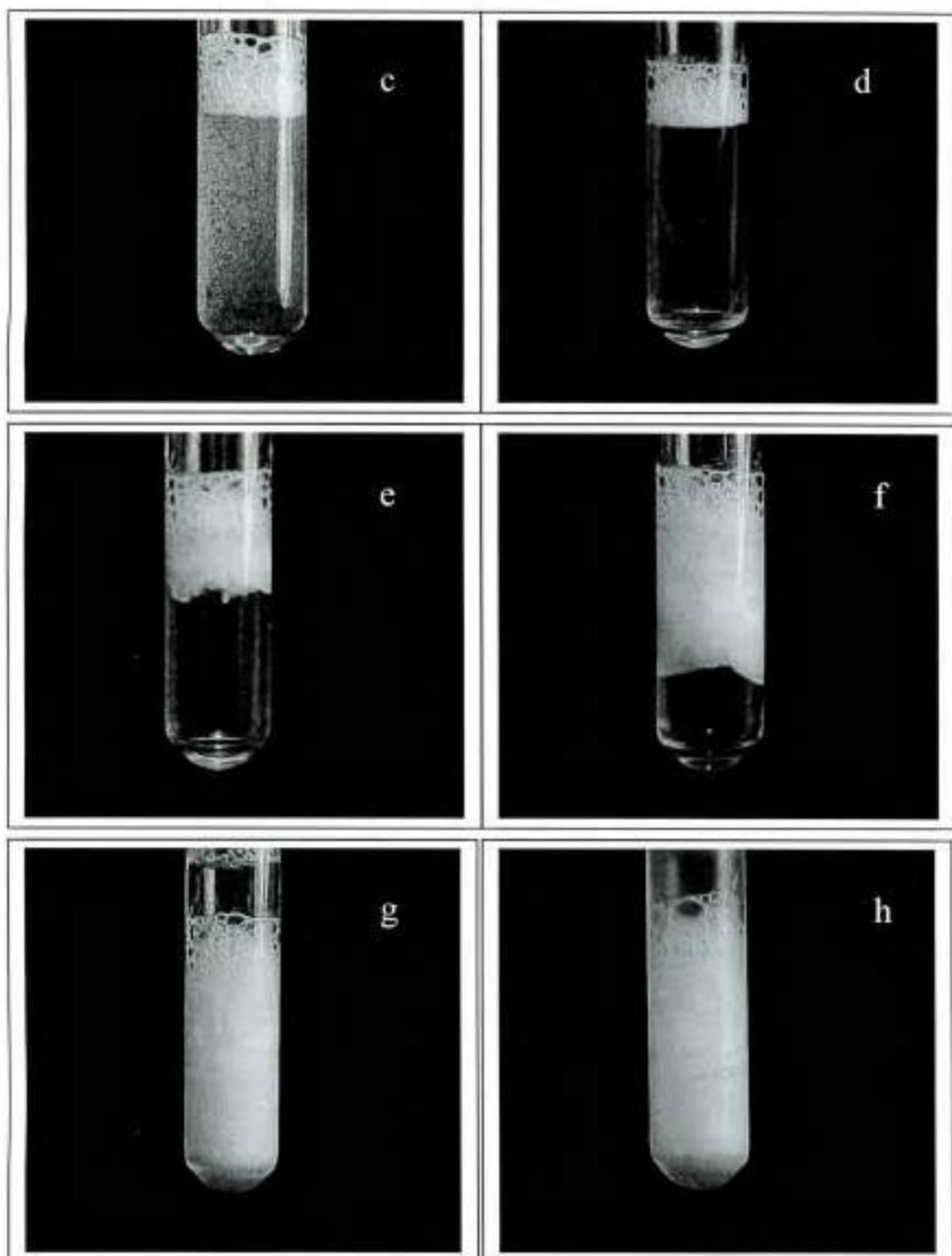


Figura 4.1: Fotografías obtenidas para describir macroscópicamente la formación de coageles (Asc_{10}).

Tabla 4.1: Descripción de las fotografías de la figura 4.1.

| Temperatura | Observaciones |
|--------------------------------------|---|
| a) inferior a 30 °C | Se observa una suspensión de Asc ₁₀ . A esta temperatura (inferior a su TMC) el derivado es insoluble. |
| b) \cong 36-37 °C | Se observa en la parte inferior del tubo la formación de la dispersión micelar. |
| c) \cong 40 °C | No se observa exceso de sólido. Se forma una dispersión transparente. |
| d) \cong 40 °C | La desaparición de las burbujas provenientes de la agitación permite observar con mas nitidez el efecto. |
| e) \cong 35 °C | Se comienza a observar la aparición de la mesofase de color blanco. |
| f) \cong 30 °C | = punto anterior. |
| g) menos de 30°C | Se puede observar la totalidad del sistema en forma de coagel. |
| h) menos de 30°C (dos horas después) | Se puede observar el coagel consolidado |

2. Transiciones de Fase. Fase micelar – coagel / Fase gel – coagel

2.1 Introducción

2.2.1 Fases mesomórficas. Cristales líquidos.

Está descrito que cuando aumentan las fuerzas atractivas entre las micelas, éstas pueden eventualmente separarse en dos fases. Una alternativa para aumentar esta atracción intermicelar es aumentar la concentración del agente surfactante. En otras palabras, simplemente “forzar” a que las micelas estén más juntas.

Se describe entonces la formación de estructuras alternativas de formas geométricas que sean compatibles con los parámetros críticos de la molécula del surfactante.

Estructuras tipo fases cúbicas, hexagonal o lamelar son comúnmente encontradas como fases simples en diagramas de fases de surfactantes y son conocidos como **mesofases o cristales líquidos**.

El nombre de cristal líquido es altamente descriptivo del estado físico de estas fases. El grado de ordenamiento de las moléculas es intermedio entre un líquido y un cristal y, las propiedades de flujo son intermedias entre un líquido viscoso y un sólido cristalino elástico. En la tabla 4.2 se mencionan los diferentes tipos de mesofases. No es objetivo de la presente tesis describir cada una de ellas.

Tabla: 4.2

| Símbolo | Geometría |
|--------------|---------------------|
| I_1 | Cúbica |
| H_1 | Hexagonal |
| V_1 | Cúbica (bicontinua) |
| L_{α} | Lamelar |
| V_2 | Cúbica reversa |
| H_2 | Hexagonal reversa |
| I_2 | Cúbica |

2.1.2 Transiciones encontradas para Asc_n

Se ha descrito que dispersiones concentradas de surfactantes pueden producir fases gel (**Fg**) transparentes, las cuales exhiben un grado menor de cristalinidad que los coageles. En el estado **Cg** las cadenas hidrofóbicas poseen un mínimo grado de libertad pero, un aumento de temperatura resulta en una expansión anisotrópica de las cadenas, lo que trae aparejado una disrupción parcial del empaquetamiento lamelar, con un consecuente ingreso de agua entre los grupos polares, que dan lugar a la **Fg**, ver figura 4.2

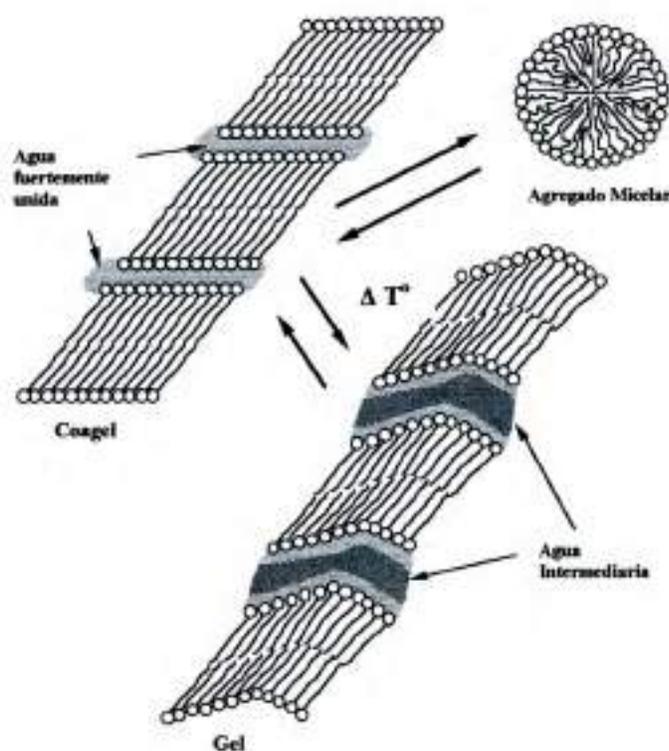


Figura 4.2: Diferentes tipos de agregados presentes para Asc,

De acuerdo a lo descrito anteriormente, la temperatura a la cual el Cg se encuentra en equilibrio con la fase micelar (Fm), es conocida como Krafft Point, K_p .

Este parámetro depende de la clase de surfactante, su concentración, y el contraión, en el caso de especies iónicas. (Sapper y cols., 1981; Kodama y cols., 1991; Matsuki y cols., 1995).

En adición al interés científico de estudiar las diferentes estructuras, interacciones y propiedades de los coageles, se ha descrito que estos fenómenos pueden ser importantes en procesos de manufactura de alimentos, elucidación de mecanismos de anestesia local (Matsuki y cols., 1996) y principalmente en el diseño de formulaciones farmacéuticas, área en la cual su utilización ha sido escasamente explorada.

2.2 Materiales y metodología

Se utilizaron dos técnicas que fueron útiles para determinar las transiciones de fase asociadas los Asc_n :

2.2.1 Difractometría de rayos X (XRD)

Se obtuvieron difractogramas utilizando un equipo marca Philips modelo PW 10-5/25, con una radiación incidente de K_{α} , $\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$, equipado con una platina de calentamiento. Se aplicó un voltaje y una corriente de 30 kV y 20 mA respectivamente. El derivado utilizado fue el Asc_{12} al 10% P/P.

Esta técnica se describe en detalle en el anexo de metodologías analíticas.

2.2.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los experimentos de SEM sobre coageles fueron obtenidos utilizando un equipo marca Philips modelo SEM XL 30 a 10 kV a una temperatura de 10°C y una humedad relativa ambiente entre 45% y 85%. Esto corresponde a una presión de 2,9 –6,0 mmHg. Esta técnica se describe en detalle en el anexo de metodologías analíticas.

2.3 Resultados obtenidos

2.3.1 Estructuras supramoleculares involucradas.

Debido a que los surfactantes en estudio poseen la misma porción polar, es de esperar que la cadena hidrocarbonada sea la responsable de los diferentes comportamientos de fase de los sistemas.

La geometría del agregado supramolecular para un surfactante puede ser predecida por el cálculo del parámetro crítico de empaquetamiento $P_C = \frac{V_H}{a_0 \cdot l_H}$, donde V_H , l_H y a_0 son el volumen, el largo de la cadena y el área de la cabeza polar, respectivamente.

La observación macroscópica de los comportamientos de fase de los Asc_n al 10%, indican que los coageles Asc_8 y Asc_{10} formarían, después del calentamiento, una fase transparente (micelar), **Fm**, ver figura 4.1. Por el contrario los coageles de Asc_{11} , Asc_{12} , Asc_{14} y Asc_{16} dan lugar a la formación de una **Fg** (ver figura 4.3). Este comportamiento es consistente con el valor de P_C de los derivados.

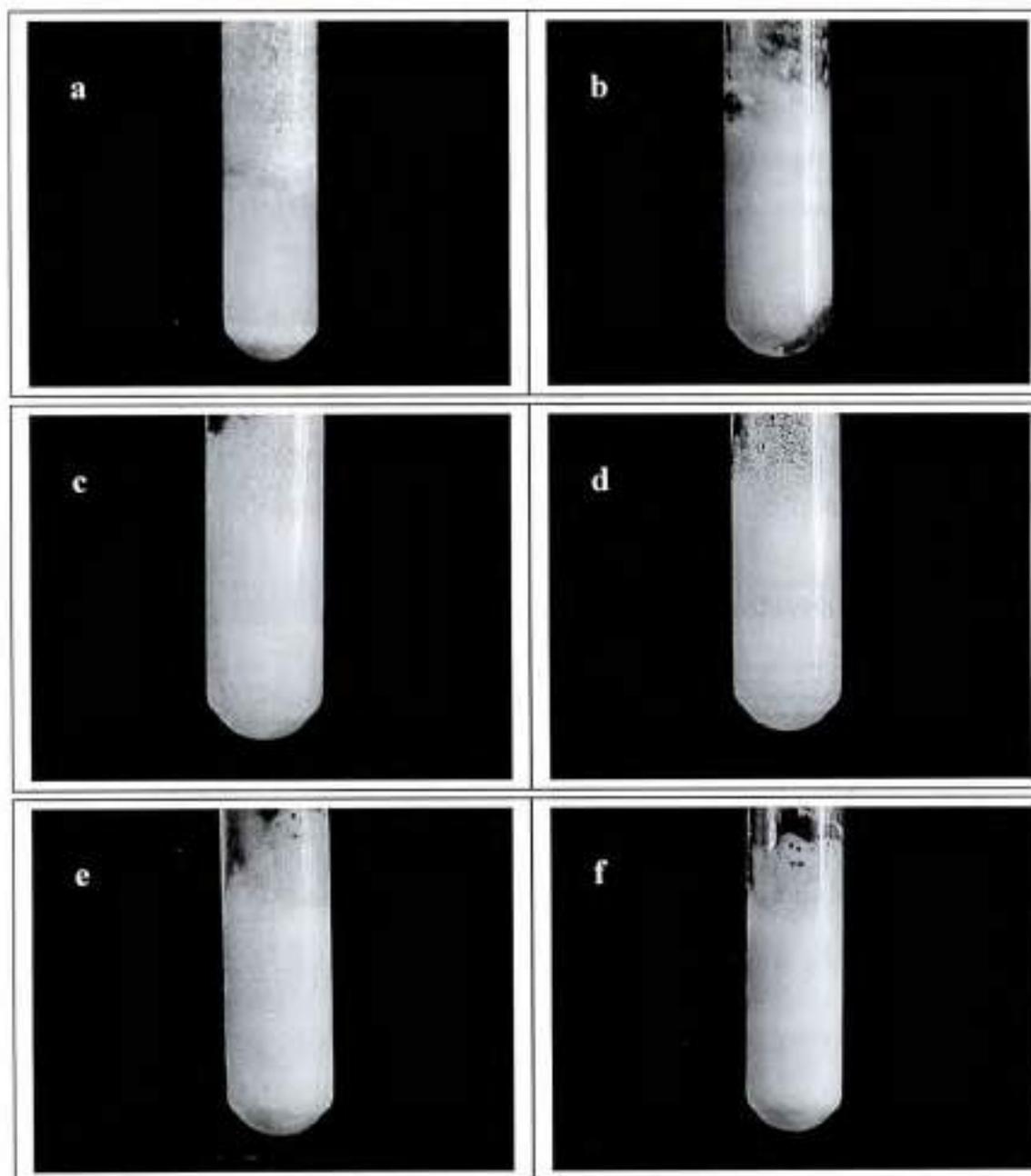


Figura 4.3: Fotografías obtenidas para describir macroscópicamente la formación de coageles (Asc_{16}).

En la figura 4.3 a) y b) puede apreciarse el estado inicial del sistema, donde el surfactante se encuentra en suspensión. A medida que aumenta la temperatura y a partir de un valor determinado (TMC) comienza a producirse la transición de fases debido a la formación del agregado supramolecular. En este caso, a diferencia del Asc_n de bajo peso molecular ($n \leq 10$), cuando el sistema alcanza la TMC no adquiere una apariencia translúcida, de baja viscosidad, característica de las dispersiones micelares, sino que se observa una dispersión opalescente, relativamente viscosa, debido a un ordenamiento en lamelas, dando lugar a una estructura tipo gel (figura 4.3 c) y d)).

Finalmente, cuando el sistema vuelve a T° inferiores a la TMC, puede observarse la formación de coageles (figura 4.3 e) y f)), con su característica configuración altamente estructurada.

Por otro lado, los P_C fueron publicados oportunamente y se reproducen en la tabla 4.3 (Palma y cols., 2002^e)

Para Asc_8 y Asc_{10} este parámetro arroja un valor de 0,29 y 0,36 y esto es característico y necesario para agregados pequeños y relativamente esféricos (Palma y cols., 2002^a-2003; Israelachvilli y cols., 1976).

Tabla 4.3 parámetros geométricos para Asc_n

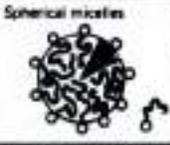
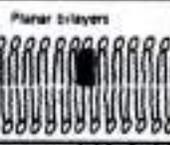
| n | $V_H (\text{\AA}^3)$ | $l_H (\text{\AA})$ | $a_0 (\text{\AA}^2)$ | P_c |
|-----------|----------------------|--------------------|----------------------|-------------------------|
| 8 | 215.7 | 10.3 | 76 | 0.24 |
| 10 | 269.5 | 12.9 | 57 | 0.36 |
| 12 | 323.3 | 15.4 | 33 | 0.64 |
| 14 | 377.1 | 17.9 | 25 | 0.84 |
| 16 | 430.9 | 20.5 | 21 | 1.00 |

En la figura 4.4 se puede apreciar como el P_C influye sobre las estructuras supramoleculares posibles.

La teoría muestra que para valores de $0.3 < P_C < 0.5$, la fase hexagonal es la óptima. Cuando el valor de P_C incrementa por encima de 0.5 (incremento del largo de la

cadena) existen dos posibilidades: si las cadenas están rígidas el sistema revierte a una fase lamelar (o cúbica); si por el contrario las cadenas no están rígidas se obtienen estructuras vesiculares unilamelares. Estas consideraciones termodinámicas son especulaciones teóricas que deben ser comprobadas experimentalmente para cada sistema en particular.

Debido a que los P_C de los Asc_n con $n > 10$ exceden el valor de 0.5, era de esperar que la fase hexagonal no apareciera y por la tanto la coexistencia de una fase gel con la fase coagel es predecible. El SEM que se presenta en la figura 4.5 confirma la presencia del coagel con una red tridimensional, una fase lamelar y agua atrapada.

| Lipid | Critical packing parameter $K = v/a_0 l_c$ | Critical packing shape | Structures formed |
|---|--|---|--|
| Single-chained lipids (surfactant) with large head-group areas; SDS in low salt | $< 1/2$ | Cone  | Spherical micelles  |
| Single-chained lipids with small head-group areas; SDS and CTAB in high salt, nonionic lipids | $1/2 - 1/2$ | Truncated cone  | Cylindrical micelles  |
| Double-chained lipids with large head-group areas, fluid chains: Phosphatidyl choline (lecithin), phosphatidyl amine, phosphatidyl glycerol, phosphatidyl inositol, phosphatidic acid, sphingomyelin, DGDG ^a , dibesitoyl phosphate, dialkyl dimethyl ammonium salts | $1/2 - 1$ | Truncated cone  | Flexible bilayers, vesicles  |
| Double-chained lipids with small head-group areas, anionic lipids in high salt, saturated frozen chains: phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl amine + Ca^{2+} | ~ 1 | Cylinder  | Planar bilayers  |
| Double-chained lipids with small head-group areas, nonionic lipids, poly (cis) unsaturated chains, high T _m : unsat. phosphatidyl ethanolamine, cardiolipin + Ca^{2+} , phosphatidic acid + Ca^{2+} , cholesterol, MGDG ^b | > 1 | Inverted truncated cone or wedge  | Inverted micelles  |

^a DGDG, digalactosyl diglyceride, diglucosyl diglyceride; ^b MGDG, monogalactosyl diglyceride, monoglucosyl diglyceride.

Figura 4.4: Geometrías supramoleculares posibles según el P_C

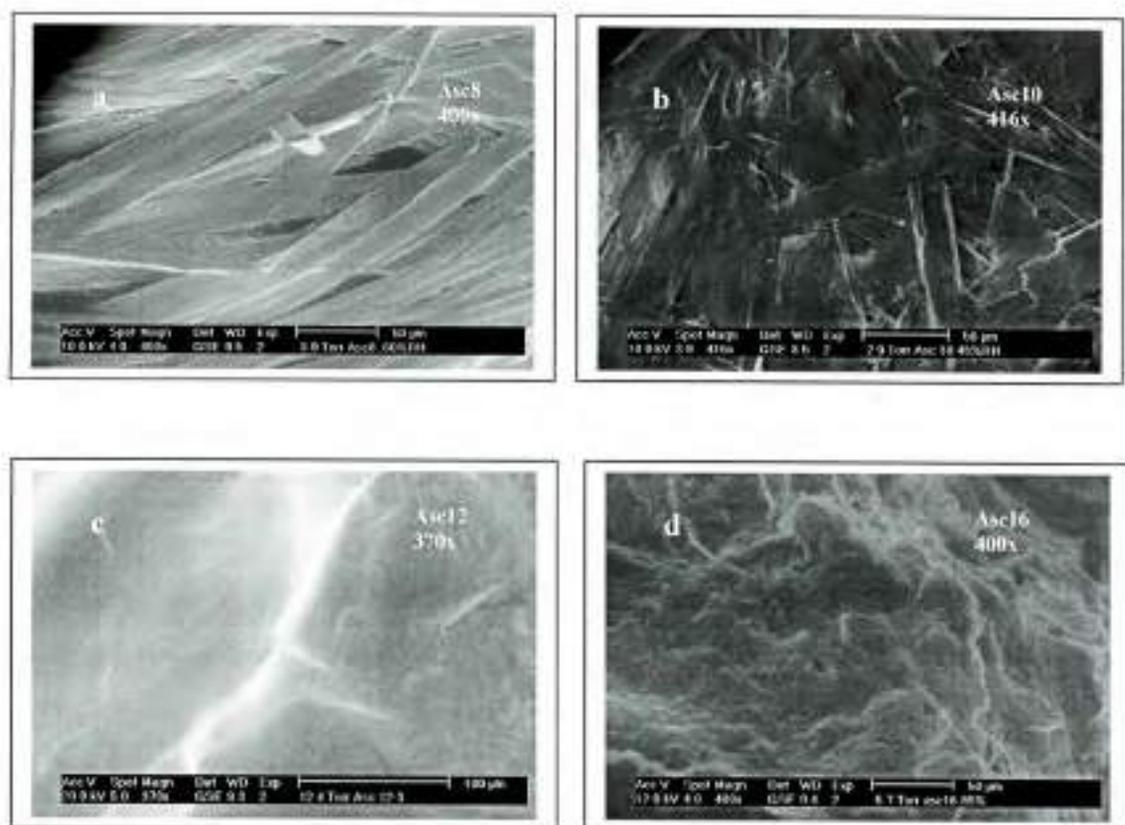


Figura 4.5: Microfotografías para coageles de Asc_n . a) Asc_8 , b) Asc_{10} , c) Asc_{12} , d) Asc_{16}

Continuando con la dilucidación de las estructuras que aparecen en los Asc_n , la figura 4.6 muestra los difractogramas de Rayos X obtenidos para las muestras de Asc_{12} en agua pura en función de la temperatura. Un pico a $2\theta = 2.25^\circ$ permanece inalterado en todas las determinaciones y corresponde a un espaciado $d = 39.2 \text{ \AA}$ lo cual es equivalente al doble del largo de la cadena hidrocarbonada de Asc_{12} en una conformación estrecha (Palma y cols., 2002^c)

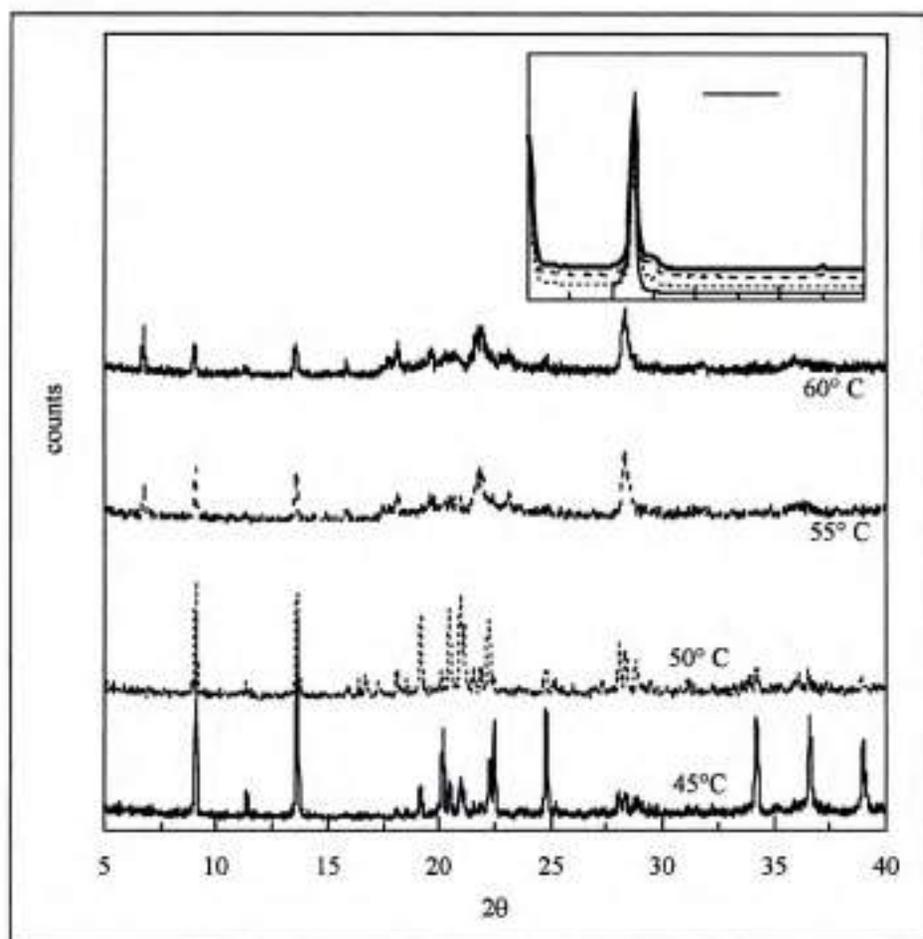


Figura 4.6: difracción de rayos X para Asc_{12}

Las determinaciones realizadas para Asc_{12} muestran la presencia de una estructura cristalina a todas las temperaturas con un cambio en el perfil del difractograma entre 45° y $55^\circ C$, rango de temperaturas donde ocurre la transición coagel – gel ($\approx 47^\circ C$ para Asc_{12}).

Los termogramas (DSC) muestran la presencia de picos endotérmicos que corresponden a las transiciones de fase (TMC). La metodología y los resultados fueron descriptos parcialmente en el capítulo 3.

Para Asc_8 y Asc_{10} , las muestras al 10% de estos coageles muestran una transición coagel – micela, y para los derivados de cadena más larga (Asc_{11} , Asc_{12} , Asc_{14} , Asc_{16}), se observa una transición coagel – gel.

Las temperaturas de transición obtenidas son descriptas en la tabla 4.4. La figura 4.7 muestra las temperaturas de transición en función de los átomos de carbono de la cadena

de cada derivado (n). En esta figura se puede observar la relación entre los puntos de fusión de los derivados en estado sólido y de los ácidos carboxílicos que los componen (ácidos grasos).

Tabla 4.4: Valores de TMC obtenidos para Asc_n . Entropía y entalpía de los procesos involucrados.

| n | DSC (pico) | DSC(onset) °C | Conductividad | ΔH (J/g) | ΔS (J/g K) |
|----|------------|------------------|---------------|------------------|--------------------|
| 8 | 18.5 | 16.8 | 19.3 | 58.8 | 0.20 |
| 10 | 34.5 | 34.0 | 36.8 | 81.1 | 0.26 |
| 11 | 40.0 | 38.7 | 38.5 | 91.7 | 0.29 |
| 12 | 47.3 | 46.4 | 44.5 | 102.8 | 0.32 |
| 14 | 56.0 | 55.0 | 54.2 | 123.8 | 0.38 |
| 16 | 63.8 | 59.2 | 61.3 | 146.7 | 0.43 |

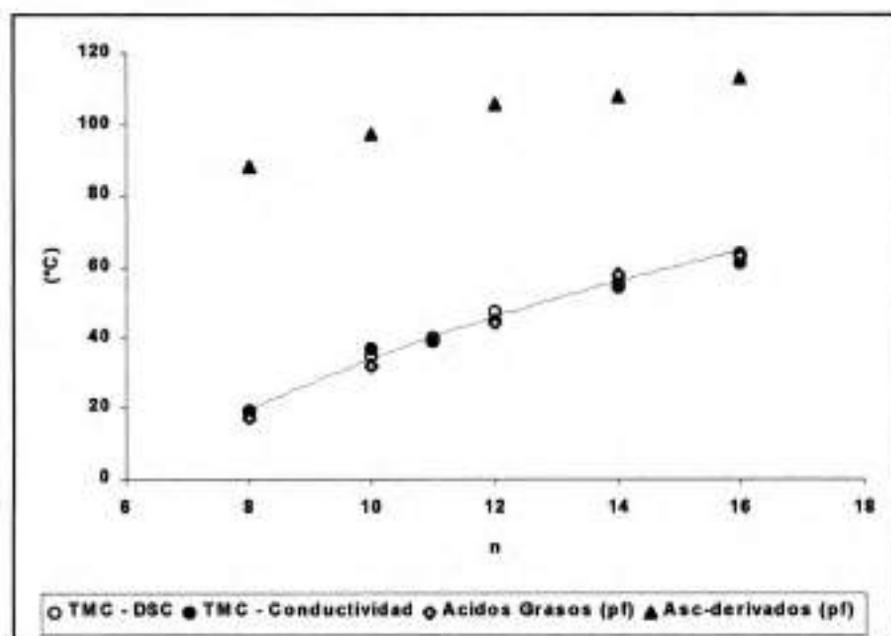


Figura 4.7: TMC en función del largo de la cadena de los Asc_n

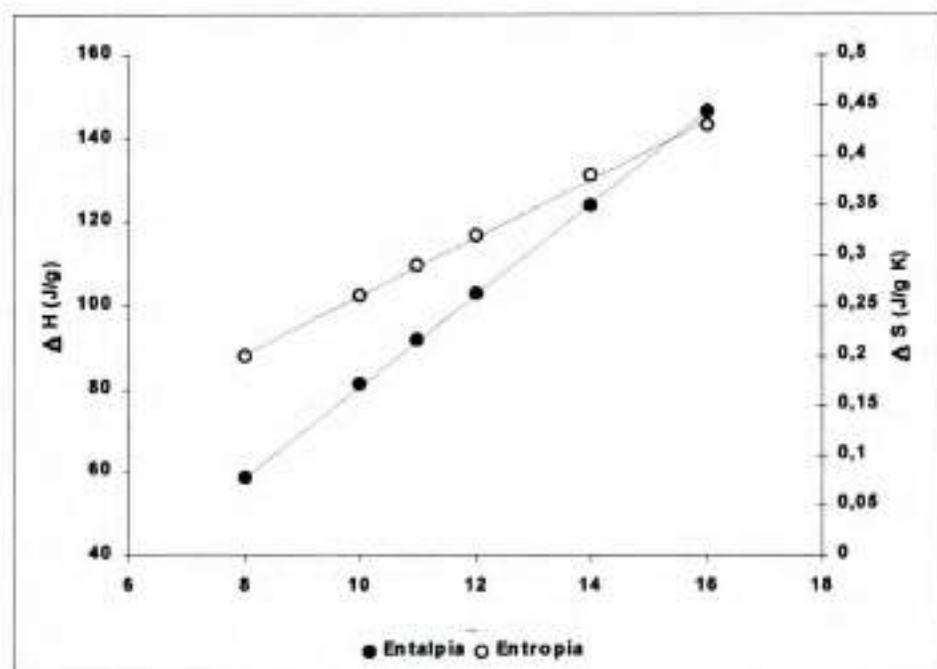


Figura 4.8: Cambios entrópicos y entálpicos obtenidos por DSC para Asc_n

Como se puede apreciar, tanto la entropía como la entalpia de las transiciones de fase involucradas tienen una correlación lineal con el número de átomos de carbono de la cadena.

Por otra parte y como se ha comentado anteriormente el Kp está descrito por algunos autores como la fusión de las cadenas hidrocarbonadas hidratadas. Los puntos de fusión de los ácidos grasos constituyentes de los Asc_n tienen una excelente correlación con las TMC obtenidas (ver figura 4.7).

3. Efecto de las moléculas de agua y de la concentración de Asc_n en las transiciones de fase de los coageles.

3.1 Introducción

La presencia de agua y su ubicación en los agregados supramoleculares son determinantes del tipo de sistema a ser formado.

La sacarosa y la urea pueden modificar la estructura del agua líquida. Utilizando una terminología convencional la sacarosa es un “estructurador” de las moléculas de agua, mientras que la urea tiene un efecto contrario.

Estos compuestos actúan sobre la red de puentes hidrógeno, en el caso de la urea logrando un debilitamiento de estas redes, mientras que la sacarosa provoca un efecto inverso.

Estos fenómenos, donde se observan cambios en la estructura del agua, se pueden encontrar en las interacciones burbuja-burbuja, el fenómeno de “cloud point” y la autoagregación de surfactantes (Vinogradova y cols., 1995; Bunkin y cols., 1996 y 1997). En las transiciones coagel – micela o coagel – gel, las uniones puentes hidrógeno entre los grupos polares del surfactante y las moléculas de solvente adyacentes, juegan un rol central.

Por lo tanto, se podía esperar que la presencia de sacarosa o urea en el medio modificaría las temperaturas de transición así como las entalpías asociadas a estos cambios.

Para evaluar la influencia de urea y sacarosa sobre las propiedades de autoagregación de Asc_n se utilizaron determinaciones calorimétricas (DSC).

El objetivo central de los estudios en presencia de sacarosa y urea, fue determinar la importancia de la estructura del agua y los puentes hidrógenos en la formación de coageles y en las transiciones de fase asociadas, y establecer si la concentración de los Asc_n tiene impacto en las transiciones de fase que han sido descritas para los derivados del ácido ascórbico.

3.2 Materiales y metodología utilizada.

3.2.1 Conductividad

La temperatura de Krafft (TMC) fue determinada en suspensiones acuosas de Asc_{12} por medición de la conductividad específica en función de la temperatura. El conductímetro utilizado fue un Radiometer Type CDM con una constante de celda de $1,25 \text{ cm}^{-1}$. Los experimentos fueron realizados en agua pura (MQ) y en soluciones acuosas (MQ) de sacarosa y urea. La concentración de estos últimos cosolutos varió de 1mM a 3 M.

La concentración de Asc_{12} fue de 1 % P/V. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

3.2.2 DSC

La TMC de los Asc_n fue obtenida a través de DSC con un equipo marca TA instruments Inc, modelo DSC 2920, utilizando portamuestras no herméticos de aluminio, bajo atmósfera de nitrógeno. La rampa de calentamiento utilizada fue de 1°C/min. La TMC fue obtenida en el pico endotérmico. Los experimentos fueron realizados utilizando agua (MQ) y en soluciones acuosas (MQ) de sacarosa y urea. La concentración de estos últimos varió de 1mM a 3 M.

Por otra parte se realizaron determinaciones para coageles de Asc_n en agua pura (MQ) a concentraciones que variaron del 5 al 50%.

3.3 Resultados obtenidos.

3.3.1 Efecto de la sacarosa y la Urea

3.3.1.1 DSC

Utilizando DSC, se estudió el efecto de los cosolutos sacarosa y urea en las transiciones de fase de los coageles. En primera instancia, se seleccionaron soluciones de Asc₁₀ al 10% (P/V). En la figura 4.9 se puede apreciar las temperaturas de transición coagel-micela a diferentes concentraciones de cosoluto (sacarosa – urea). Sacarosa produce un aumento marcado de la TMC, mientras que urea tiene un efecto contrario.

Estas observaciones se fundamentan en que, la sacarosa fortalece la red de puentes hidrógenos, por lo tanto, temperaturas mayores son necesarias para romper la estructura lamelar del coagel y obtener la fase micelar. Por el contrario, la urea debilita este tipo de interacciones, por lo que la transición es observada a temperaturas inferiores.

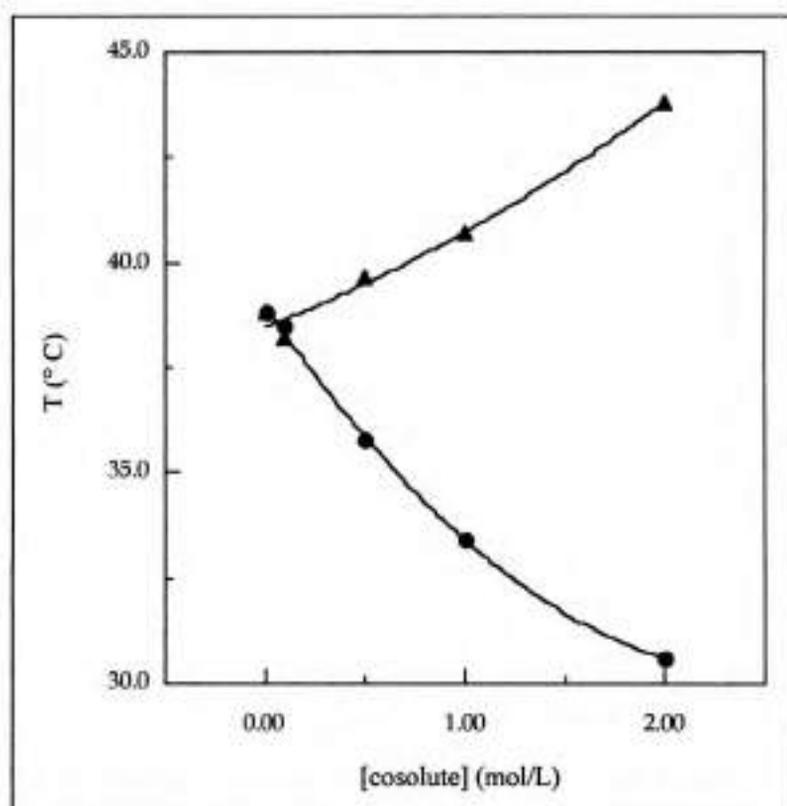


Figura 4.9: Variación de la TMC (°C) en función de la concentración de cosoluto. ● Urea, ▲ Sacarosa. (gráfico obtenido del artículo publicado por el tesista, Lo Nostro y cols., 2003).

3.3.1.2 Conductividad

Información complementaria pudo ser obtenida de las mediciones de conductividad.

Se realizaron mediciones de conductividad sobre muestras de Asc12 al 1% (CMC = 9×10^{-5} M, a 30°C). En el figura 4.10 (a) y (b) se observa la conductividad en función de la temperatura para diferentes concentraciones de sacarosa y urea.

Los resultados obtenidos confirman que tanto sacarosa como urea poseen un efecto marcado sobre la transición coagel-gel.

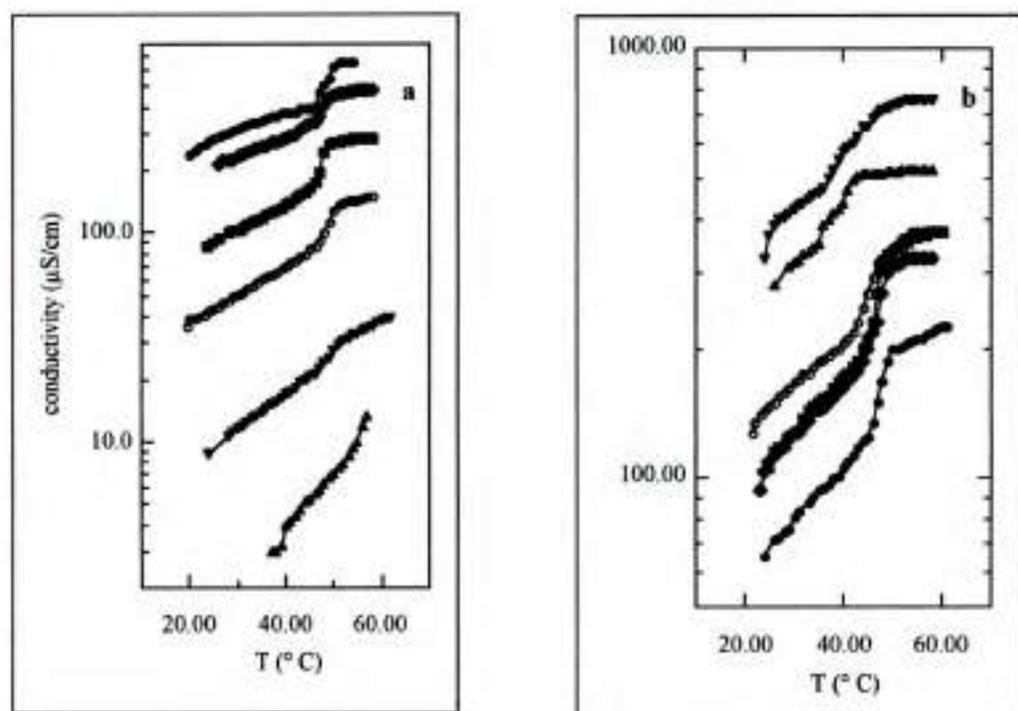


Figura 4.10: Conductividad (en $\mu\text{S}/\text{cm}$) en función de la temperatura para Asc_{12} (1%) en presencia de (a) sacarosa y (b) urea en las siguientes concentraciones de los cosolutos \bullet : 10^{-3} M; \blacklozenge : 10^{-2} M; \blacksquare : 0.1 M; \circ : 1 M; \blacktriangledown : 2 M; \blacktriangle : 3 M.

(gráfico obtenido del artículo publicado por el tesista, Lo Nostro y cols., 2003).

En presencia de urea, la conductividad presenta valores de un orden de magnitud superior a los obtenidos para sacarosa, y el comportamiento es totalmente diferente. En efecto, en presencia de sacarosa, la conductividad de Asc_{12} (1%) decrece regularmente con el incremento de la concentración del cosoluto. Con urea, la conductividad primero aumenta con la concentración (en el rango 1×10^{-3} M hasta 2 M), para luego disminuir rápidamente a concentraciones iguales o superiores a 3 M.

A los fines de determinar si los efectos de sacarosa y urea sobre los coageles eran debidos a un cambio de las propiedades del medio o si realmente estos solutos afectaban estructuralmente estos agregados facilitando o impidiendo las interacciones lamela-agua, se evaluaron comparativamente propiedades como densidad, descenso crioscópico y viscosidad de las soluciones de sacarosa y urea con el comportamiento observado en los coageles.

La figura 4.11 muestra la conductividad de Asc_{12} (1%) a 29°C , 42°C y 53°C (antes y después de la transición), en función de la concentración de sacarosa (a) y urea (b).

En el caso de la sacarosa en el mismo gráfico se observa la viscosidad de las soluciones de este cosoluto. En este gráfico se observa claramente que la conductividad decrece linealmente en función del \log_{10} [sacarosa] y esto no es proporcional al incremento de viscosidad de las soluciones de sacarosa.

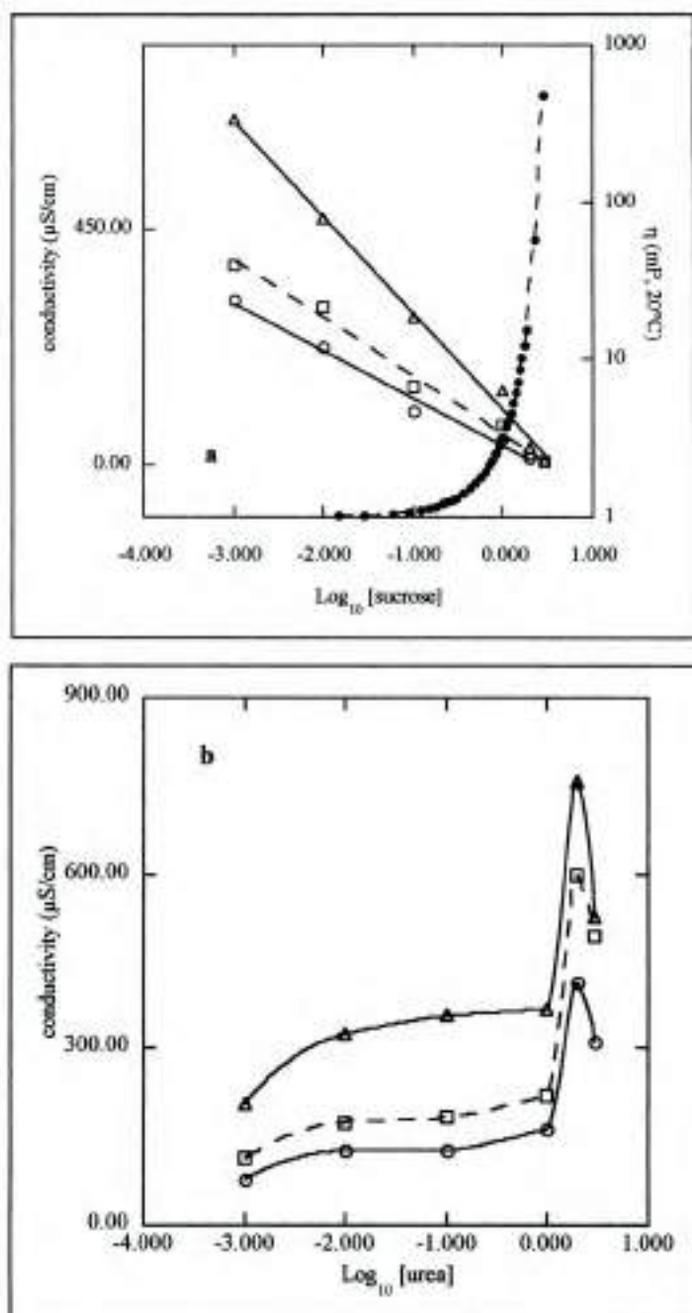


Figura 4.11: Conductividad para muestras de Asc₁₂ (1%) en presencia de a) sacarosa y b) urea a temperaturas superiores e inferiores a la TMC. Los símbolos indican: \circ : Conductividad a 29°C; \square : Conductividad a 42°C; Δ : conductividad a 53°C; \bullet : Viscosidad (η) a 20°C (in mP). (gráfico obtenido del artículo publicado por el tesista, Lo Nostro y cols., 2003)

De esta forma se observa que el decrecimiento de la conductividad no sería solamente consecuencia del aumento de la viscosidad, y que estaría relacionado con un mecanismo mucho más complejo que incluye la modificación de la estructura del agua.

En el caso de la urea, la conductividad muestra un máximo a alrededor de 2 M. Para entender este comportamiento es interesante observar el comportamiento que tienen estos cosolutos (urea y sacarosa) sobre algunas propiedades del agua pura y que reflejan los cambios en la estructura de la misma por parte de estos compuestos. Estas propiedades son el *volumen molar aparente* (V_M) y el descenso del punto crioscópico (ΔT_c). Esto puede ser observado en las figuras 4.12 y 4.13

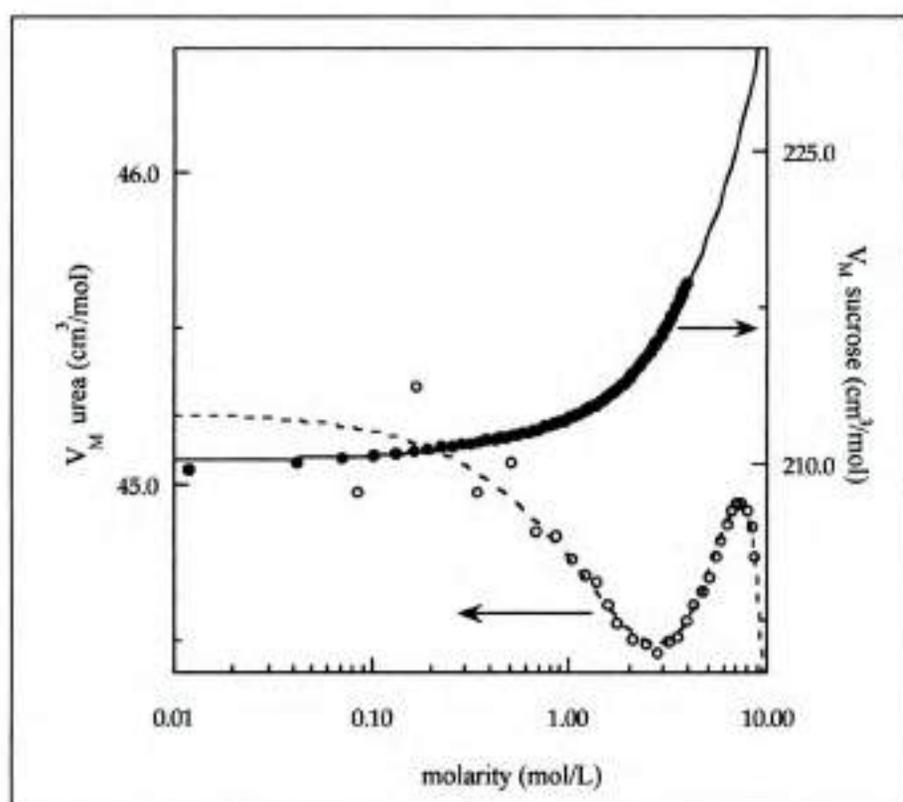


Figura 4.12: Volumen Molar parcial para soluciones acuosas de sacarosa (●) y urea (○) (gráfico obtenido del artículo publicado por el tesista, Lo Nostro y cols., 2003)

El V_M está definido como:

$$V_M = \frac{M}{\rho} - \frac{1000(\rho - \rho_0)}{m \cdot \rho \cdot \rho_0}$$

Donde, M , ρ , ρ_0 y m , son el peso molecular del soluto, la densidad de la solución y del solvente puro a la misma temperatura, y la molalidad de la solución respectivamente.

El V_M de las soluciones de sacarosa aumenta en función de la concentración de cosoluto, como se ve en la figura 4.12 donde se observa una curva exponencial.

La urea se comporta de una manera un poco más complicada, el V_M tiene un mínimo a una concentración de 2 M y un máximo a 7 M. Este comportamiento tan disímil entre sacarosa y urea en cuanto a su efecto sobre el agua es también observado en los coageles de Asc_n permitiendo inferir que estos solutos interactúan estructuralmente con las moléculas del agua afectando del mismo modo las propiedades de los coageles. De este modo puede observarse que la concentración de máxima conductividad de coageles de Asc₁₂ en presencia de urea (≈ 2 M) es coincidente con la concentración de mínimo volumen molar aparente para este soluto.

El mecanismo por el cual estos solutos interactúan con el solvente es objetivo de estudio y debe aun ser dilucidado.

Asimismo este comportamiento particular de urea y sacarosa sobre el agua puede ser observado evaluando el descenso crioscópico de sus soluciones. La figura 4.13 muestra el descenso del punto crioscópico para soluciones de sacarosa y urea, y la línea teórica para soluciones diluidas ($\Delta T_c = K_c m$, donde K_c es la constante crioscópica y m la molalidad del soluto).

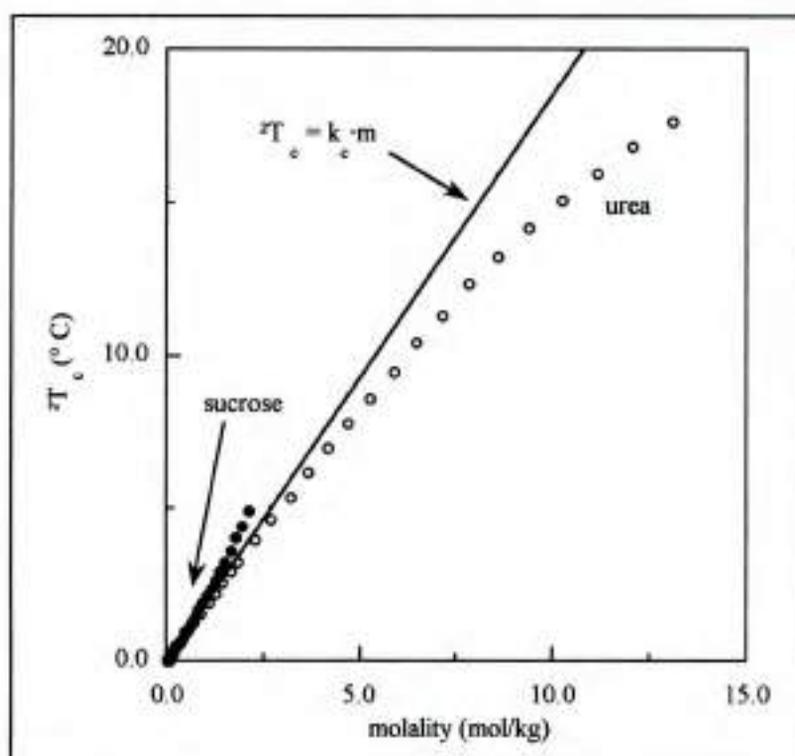


Figura 4.13: Descenso del punto crioscópico para soluciones acuosas de sacarosa(●) y urea (○). La línea recta indica el valor teórico para soluciones diluidas ($\Delta T_c = k_c \cdot m$) (gráfico obtenido del artículo publicado por el tesista, Lo Nostro y cols., 2003)

Las soluciones concentradas de urea y sacarosa se comportan de manera diferente. Las soluciones de sacarosa muestran valores mayores de ΔT_c con respecto al valor calculado (teórico), mientras que para soluciones de urea se observan valores menores. Nuevamente, esta observación permite inferir que para sacarosa el incremento de ΔT_c está directamente relacionado al fortalecimiento de las interacciones entre las moléculas de agua, mientras que para urea, la disminución del ΔT_c es consecuencia de su capacidad de debilitar la estructura de puente hidrógeno del solvente.

Estas observaciones basadas en la viscosidad, V_M y ΔT_c confirman la influencia de urea y sacarosa sobre la estructura del agua y la interacción del solvente con los grupos polares de los Asc_n .

3.3.2 Influencia del largo de cadena (o PM) y la concentración en las propiedades de los coageles.

Fueron preparados coageles en agua a diferentes concentraciones, y como se ve en la figura 4.14 la TMC es graficada en función de la concentración del derivado para todos los Asc_n .

Para Asc_8 y Asc_{10} , las rectas observadas separan la región donde existe la fase micelar (arriba) de la región de fase coagel (abajo).

En el caso de Asc_{12} , Asc_{14} , y Asc_{16} , estas rectas separan la fase gel de la fase coagel.

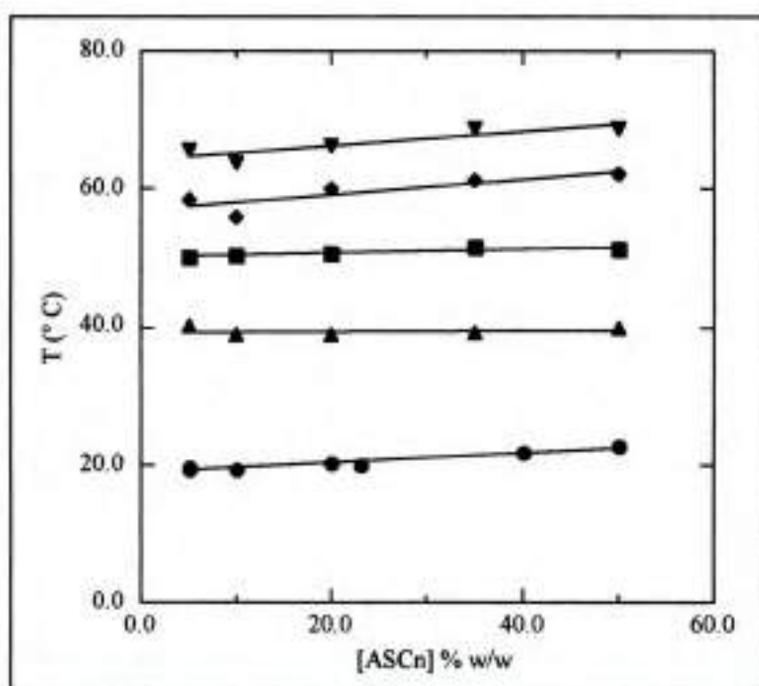


Figura 4.14: TMC obtenidas para Asc_n a diferentes concentraciones. Asc_8 ●; Asc_{10} ▲; Asc_{12} ■; Asc_{14} ◆; Asc_{16} ▼
(gráfico obtenido del artículo publicado por el tesista, Lo Nostro y cols., 2003)

La figura 4.15 (a) muestra las entalpías de transición experimentales (ΔH_{exp}) en KJ/g en función de la concentración de surfactante.

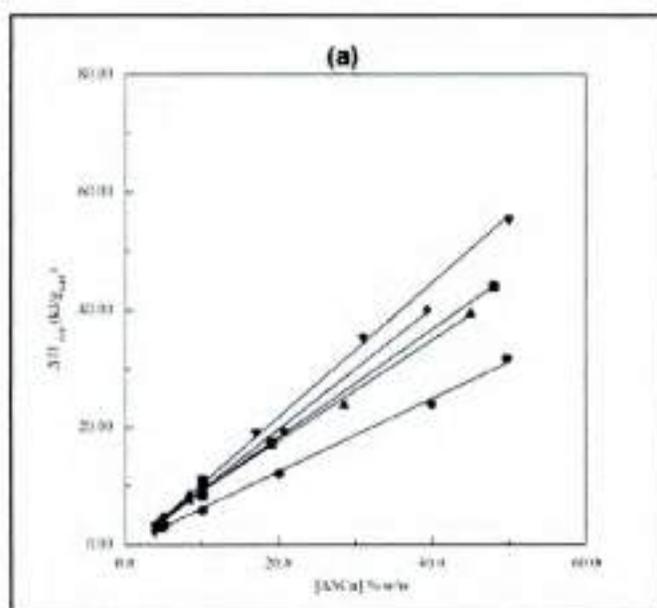


Figura 4.15 (a): Entalpías de transición experimentales para Asc_n a diferentes concentraciones. Asc_8 ●; Asc_{10} ▲; Asc_{12} ■; Asc_{14} ◆; Asc_{16} ▼ (gráfico obtenido del artículo publicado por el tesista, Lo Nostro y cols., 2003)

Se observa que los cambios entrálpicos dependen marcadamente del N° de átomos de carbono del derivado. La figura 4.15 (b) muestra los correspondientes ΔS_{exp} calculados como $\Delta H_{exp}/T$.

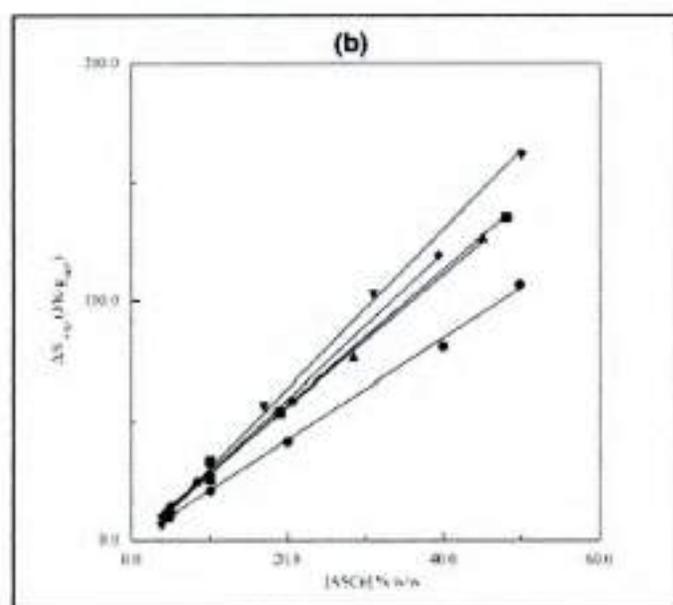


Figura 4.15 (b): Cambios entrópicos experimentales para Asc_n a diferentes concentraciones. Asc_8 ●; Asc_{10} ▲; Asc_{12} ■; Asc_{14} ◆; Asc_{16} ▼ (gráfico obtenido del artículo publicado por el tesista, Lo Nostro y cols., 2003)

La formación de agregados supramoleculares involucra distintas interacciones entre las moléculas del tensioactivo. Estas interacciones tienen asociados parámetros energéticos que permiten caracterizar y cuantificar el proceso.

Los cambios entálpicos observados (ΔH_{exp}) en una transición como la que ocurre con los Asc_n comprenden tres contribuciones que pueden ser descriptas como:

$$\Delta H_{\text{exp}} = \Delta H_{\text{cad}} + \Delta H_{\text{el}} + \Delta H_{\text{hidro}} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde el ΔH_{cad} está involucrado en los cambios conformacionales y de empaquetamiento de la cadena hidrocarbonada, ΔH_{el} está relacionado con las interacciones electrostáticas entre los grupos polares y ΔH_{hidro} es el cambio entálpico debido a la hidratación de las cabezas polares.

Cuando el coagel es calentado, las interacciones electrostáticas entre el grupo polar y su contracción disminuyen y el ΔH_{el} es determinado. Posteriormente estos grupos son hidratados por el solvente (agua) y el ΔH_{hidro} obtenido. Finalmente el ΔH_{cad} es liberado y las estructuras se reordenan en una fase micelar o gel. Debido que los grupos polares son los mismos en todos los derivados estudiados, se espera que los ΔH_{el} y ΔH_{hidro} sean los mismos, y por lo tanto los cambios entálpicos relacionados a la interacción de las cadenas apolares (ΔH_{cad}) serán los factores dominantes en la transición que determinará si el sistema revierte a una fase micelar o una fase gel.

A los fines de individualizar y calcular la contribución de las cadenas alifáticas a la interacción cabeza polar/solvente se puede analizar el proceso de acuerdo a la siguiente ecuación que describe como estaría compuesto el fenómeno entálpico experimental:

$$\Delta H_{\text{exp}} = \Delta H_{\text{cad}} + \Delta H_w = p\Delta H_f + \Delta H_w \quad \text{Ec. 2}$$

ΔH_w indica la contribución total por las interacciones, cabeza polar / solvente (agua) y aquellas entre las uniones fuertes y el agua intermediaria.

Se asumió que ΔH_{cad} es proporcional al ΔH_f del punto de fusión de los Asc_n puros dependiendo del peso del surfactante en la muestra del coagel (p). Esta manera de asumir las contribuciones seguramente puede sobrestimar el valor de ΔH_{cad} y subestimar el ΔH_w .

La tabla 4.5 indica los valores de ΔH_w para diferentes muestras de Asc_n en agua en concentraciones del 10% - 20% y 40%.

Tabla 4.5: Valores de ΔH_w para diferentes muestras de Asc_n .

| n | ΔH_w (10%) | ΔH_w (20%) | ΔH_w (40%) |
|----|------------------------|--------------------|--------------------|
| | KJ/mol _{surf} | | |
| 8 | 8.1 | 8.6 | 8.6 |
| 10 | 5.5 | 4.1 | 3.6 |
| 12 | -7.3 | -6.6 | -6.3 |
| 14 | -8.5 | -6.6 | -5.5 |
| 16 | -10.8 | -8.1 | -6.9 |

Para Asc_8 , el valor de ΔH_w se incrementa muy lentamente con el aumento de la concentración de surfactante. En el caso de los derivados de cadena larga este valor decrece (en valor absoluto), siendo esto muy marcado en el caso de Asc_{16} . Es interesante observar que cuando la transición que se observa es coagel-gel los valores de ΔH_w son negativos. Esto podría explicarse como que algo de la energía liberada en esta transición es debida a las interacciones surfactante-solvente (agua) y solvente-solvente dando lugar a la formación de una estructura más desordenada. En todos estos casos el valor calculado de ΔH_w esta entre 5 y 11 KJ/mol_{surf}. Si tenemos en cuenta que la energía promedio de un puente hidrógeno es de 12-30 KJ/mol y que la ecuación (Ec. 2) seguramente subestima el ΔH_w , se puede concluir que estos cambios entálpicos son debido a la ruptura y formación de puentes hidrógenos en la interfase cabeza polar / agua y dentro de la estructura del solvente. Para Asc_8 y asc_{10} el caso es el inverso debido a la formación de micelas esféricas, en virtud de la importante energía necesaria para la hidratación de las cabezas polares en la microfase autoagregada.

3.4 Conclusión

Para evaluar la importancia de la estructura de agua en la formación de los coageles se utilizaron técnicas de DSC y conductimetría. Se midieron las temperaturas de transición en presencia de sacarosa y urea, de las cuales se han descrito sus propiedades modificadoras de la estructura del agua.

Teniendo en cuenta que en los coageles de los Asc_n las interacciones entre las moléculas del solvente y los grupos polares son dominantes en las transiciones coagel-gel o coagel-micela, se estimó importante evaluar la influencia de este tipo de compuestos sobre el comportamiento de estas transiciones.

La presencia de sacarosa y urea modificó significativamente algunas propiedades de los coageles, debido principalmente a la influencia de estos compuestos sobre la capacidad de formación de puentes hidrógeno y la estructura de agua.

Dependiendo del tipo de cosoluto evaluado, la TMC se ve afectada de forma diversa. De este modo, la sacarosa “fortalece” la estructura del solvente y por lo tanto aumenta las temperaturas de transición, mientras que la urea “debilita” estas uniones, teniendo un efecto contrario.

Por otra parte también se evaluó el efecto de la concentración del derivado en las transiciones de fase, quedando en evidencia que este factor no influencia significativamente los procesos que dan lugar a las transiciones de fase.

4. Efecto de Cosolventes

4.1 Introducción y objetivos

De acuerdo a los resultados obtenidos, los Asc_n son agentes tensioactivos con capacidad de formar diversos agregados supramoleculares, dependiendo de su PM, concentración y T° . La estrategia de utilizar tensioactivos para aumentar la solubilidad aparente de drogas poco solubles ha sido ampliamente utilizada en tecnología farmacéutica para optimizar su formulación en sistemas acuosos.

Otra alternativa para lograr esta meta es la cosolvencia, donde distintos cosolventes son utilizados para aumentar la solubilidad de drogas poco solubles. Del mismo modo, la

combinación de ambas estrategias ha permitido vehicular drogas de interés farmacéutico en soluciones acuosas.

En el caso de Asc_n la imposibilidad de los derivados de PM más alto ($n \geq 12$) de formar dispersiones micelares o lamelares a temperaturas compatibles ($T^\circ < 30^\circ\text{C}$) hace que en principio se pueda esperar poca utilidad de estos sistemas. De este modo, se evaluó la influencia del agregado de cosolventes (polialcoholes) en la TMC de los Asc_n y la capacidad de solubilización de distintas drogas.

4.2 Materiales y metodología utilizada.

Los cosolventes utilizados fueron: Glicerina (Gli), Propilenglicol (Pg) y Polietilenglicol 400 (PEG400).

4.2.1 Conductimetría

Se realizaron mediciones conductimétricas sobre Asc_{10} , Asc_{12} , Asc_{14} y Asc_{16} en presencia de mezclas de concentraciones variables de cosolventes (Pg, Gli, PEG 400) y agua. El conductímetro utilizado fue un Radiometer Type CDM con una constante de celda de $1,25 \text{ cm}^{-1}$. La concentración de los Asc_n fue de 1 % P/V. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

4.3 Resultados obtenidos

Como puede apreciarse en las figuras 4.16, 4.17 y 4.18 los efectos de los cosolventes no fueron uniformes. Mientras la glicerina esencialmente no afecta las temperaturas de transición (TMC), propilenglicol y polietilenglicol 400, disminuyen la TMC de todos los derivados a medida que la concentración del cosolvente aumenta.

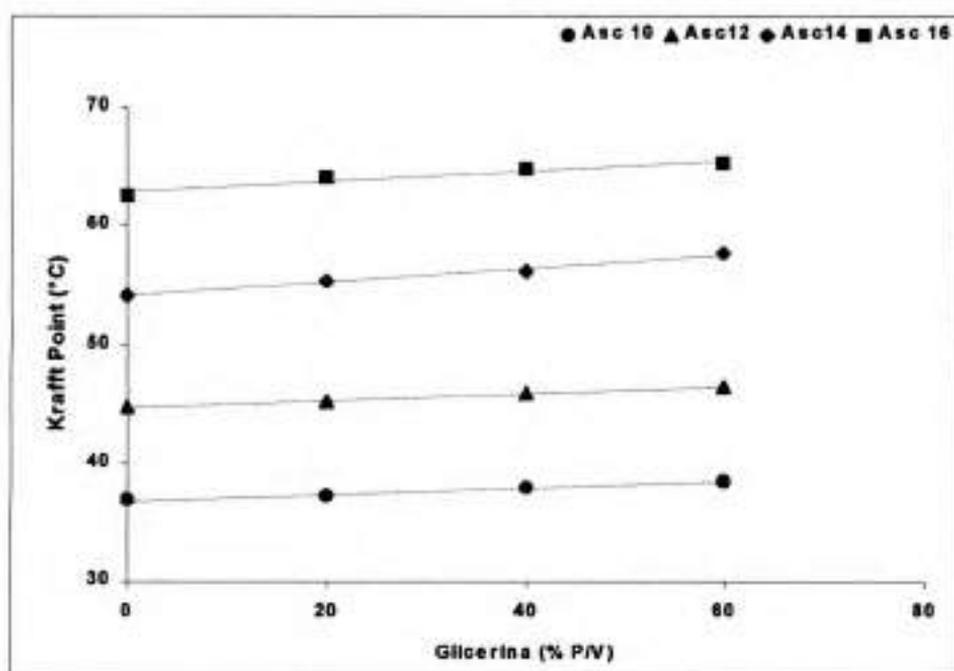


Figura 4.16: TMC de los Asc_n en función de la concentración de Gli en la fase bulk

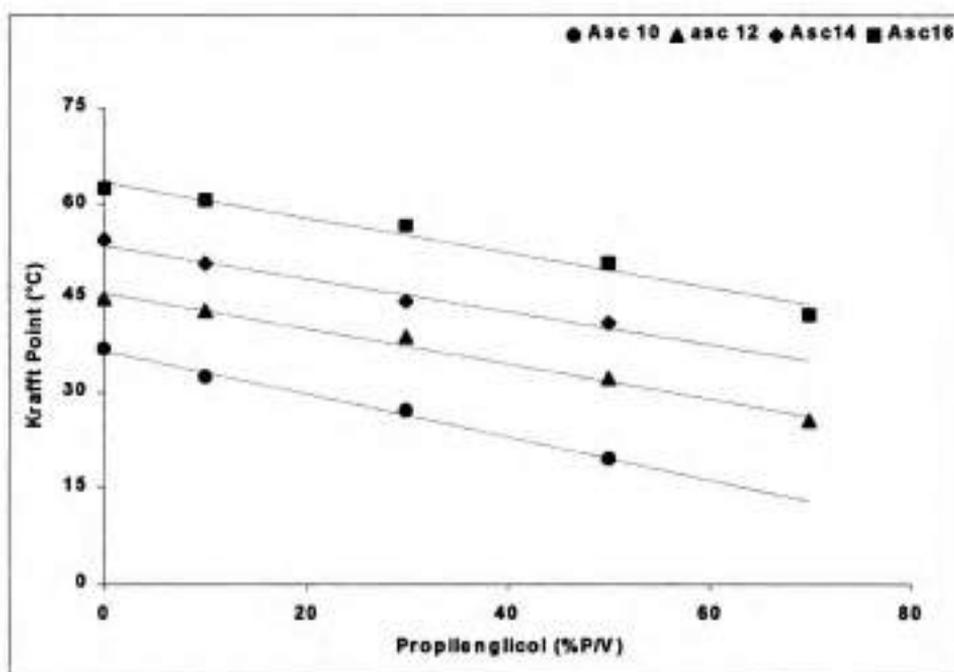


Figura 4.17: TMC de los Asc_n en función de la concentración de Pg en la fase bulk

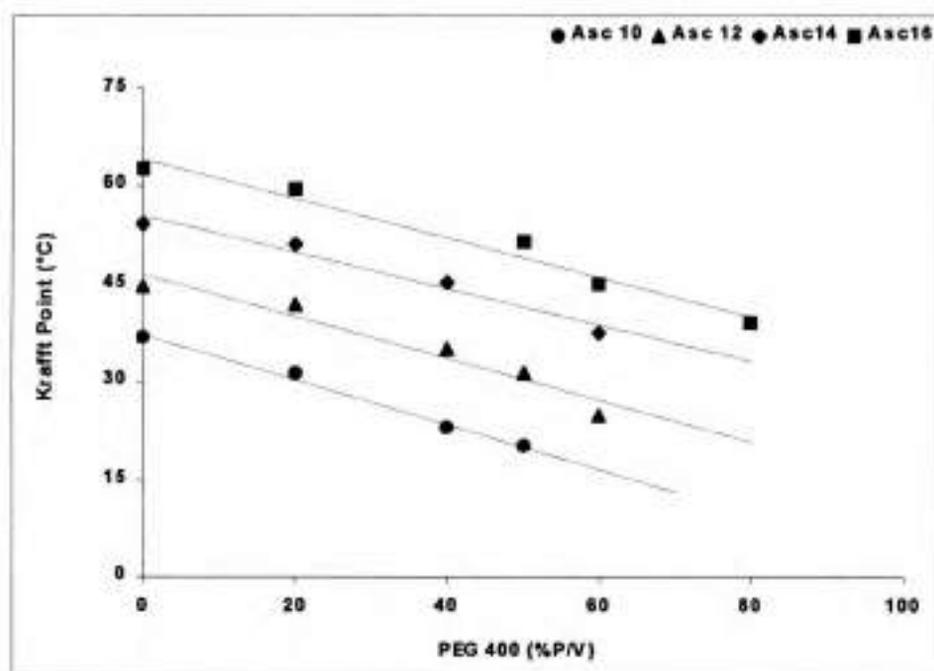


Figura 4.18: TMC de los Asc_n en función de la concentración de PEG 400 en la fase bulk

4.4 Conclusión.

La presencia de Gli en el medio no afecta la TMC de los Asc_n. En cambio, tanto Pg como PEG400 disminuyen la temperatura de transición de fases del sistema para todos los Asc_n estudiado.

Estos resultados son sumamente atractivos porque se puede pensar en utilizar estos cosolventes para “regular” la TMC de un derivado. De esta manera la posibilidad de utilizar derivados de cadena más larga (con mayor capacidad de carga) con TMCs menores puede ser una alternativa útil para obtener dispersiones micelares o lamelares, donde la incorporación de un principio activo poco soluble permitiría obtener una formulación con cualidades farmacéuticas aceptables.

Por otra parte, algunos resultados preliminares indicarían que el uso de cosolventes tendría un efecto aumentando la capacidad de carga de los sistemas.

5. Reología

5.1 Introducción

El término reología, deriva del griego rheo (flujo) y logos (ciencia). Esta palabra es utilizada actualmente para describir el campo de la ciencia que estudia el flujo de líquidos y la deformación de los sólidos. La viscosidad, término también muy utilizado, es una expresión de la resistencia de un fluido a fluir, por lo tanto, cuando hay alta viscosidad existe alta resistencia al flujo. Los líquidos simples pueden ser descriptos en términos de viscosidad absoluta, pero en cambio los sistemas heterogéneos, entre los que se incluyen la mayoría de los sistemas farmacéuticos, son mucho más complejos, por lo tanto no pueden ser expresados por un simple valor.

El estudio de las características reológicas de los materiales es importante sin lugar a dudas en variadas áreas. En medicina, la reología gobierna la circulación de la sangre y el flujo linfático en capilares y grandes vasos, el flujo del mucus, la resistencia de los huesos, el estiramiento de cartílagos y la contracción de los músculos entre muchos otros fenómenos. También en medicina cobra importancia práctica en soluciones para ser inyectadas como así también la flexibilidad de tubos y catéteres. La importancia de la reología en farmacia es indiscutible. El conocimiento de las propiedades reológicas se utiliza activamente en la formulación y el análisis de productos tales como, emulsiones, pastas, supositorios y agentes de recubrimientos de comprimidos, entre otros. Por otra parte en la manufactura de cremas de uso farmacéutico o cosmético, como así también pastas y lociones, se deben mantener lote a lote parámetros reológicos apropiados para asegurar la reproducibilidad.

Los sistemas heterogéneos farmacéuticos presentan generalmente flujo de tipo no newtoniano. En la mayoría de los sistemas farmacéuticos este comportamiento puede favorecer la estabilidad y condiciones de aplicación, como por ejemplo en formas farmacéuticas (FF) tópicas y en la dispensación FF líquidas de uso oral.

De este modo, es importante conocer el comportamiento reológico de estos sistemas y evaluar su implicancia en su formulación.

Mayores consideraciones sobre reología y las metodologías que se utilizan para estudiar este aspecto de los sistemas heterogéneos, se pueden observar en el anexo de metodologías analíticas.

5.2 Objetivos

Una de las potenciales aplicaciones de los coageles obtenidos a partir de los ésteres del ácido ascórbico sería la de vehicular drogas a ser utilizadas en terapias por vía tópica. Por este motivo resultó importante caracterizar reológicamente los coageles pensando en una potencial formulación tópica, ya sea para conocer el comportamiento de los mismos cuando son aplicados sobre la piel, como así también determinar algunas condiciones de manufactura y de envasado.

Como se ha descrito en capítulos anteriores, la solubilidad de los Asc_n decrece con el largo de la cadena alquílica e incrementa con la temperatura. Estos compuestos forman dispersiones transparentes en agua, por encima de la TMC y la CMC de cada derivado.

Si estas dispersiones son enfriadas por debajo de su TMC, se obtiene una mesofase semicristalina que en forma general se denomina coagel. Si estos coageles son ahora nuevamente calentados, lo que se observa es la aparición de una solución micelar homogénea para $n \leq 10$ o una fase gel transparente para $n \geq 11$ (Palma y cols., 2002^c).

El objetivo de esta parte experimental fue obtener información sobre las propiedades reológicas de los coageles de Asc_n . El estudio reológico además de aportar cierta información sobre el uso de estos sistemas en formulaciones tópicas, aportó información relacionada las posibles estructuras tridimensionales de estos derivados.

5.3 Materiales y metodologías utilizadas

5.3.1 Reogramas

Los derivados Asc_8 , Asc_{10} , Asc_{12} , Asc_{14} y Asc_{16} (2% P/V) fueron suspendidos en agua destilada y calentados por encima de su TMC. Cuando no se observó ninguna partícula en suspensión se colocó la muestra en la copa del sensor del viscosímetro, y se dejó a una temperatura de 5-6°C durante tres horas, pasado este lapso de tiempo, se montó junto al sensor del aparato y se procedió a la obtención de la curva de flujo. El equipo utilizado fue un viscosímetro marca Haake VT500 equipado con un software

VT500/VT 3.01, y un sensor NV. Las diferentes curvas y el análisis estadístico fueron realizados usando el programa Microcal Origin® versión 3.5.

Las condiciones de la curva de flujo se resumen en la tabla 4.6 dividida en segmentos consecutivos que el programa de computación adosado al viscosímetro usa para determinar las secuencias de las diferentes curvas.

Tabla 4.6: Condiciones empleadas en las diferentes curvas de flujo realizadas para los Asc_n

| Segmento | Velocidad r.p.m | Tiempo min. | Temperatura °C |
|----------|--------------------|----------------|-------------------|
| 1 | 0 | 15 | 20 |
| 2 | 0 - 100 | 3 | 20 |
| 3 | 100 - 100 | 3 | 20 |
| 4 | 100 - 0 | 3 | 20 |

5.3.2 Microscopia electrónica de Barrido (SEM)

La SEM fue utilizada con el objeto de recabar información de la estructura tridimensional de los coageles y su implicancia en la reología de los mismos. Se utilizó la misma técnica y equipamiento que los descritos en el punto 2.

5.4 Resultados Obtenidos

5.4.1 Observación macroscópica

En primer lugar, importante información cualitativa puede ser obtenida por observación macroscópica del comportamiento de los coageles.

Los sistemas obtenidos para Asc₈, Asc₁₀, Asc₁₄ y Asc₁₆ permanecen en el fondo del recipiente que lo contiene cuando el mismo es invertido o agitado. Por el contrario para coageles de Asc₁₀ y Asc₁₁ se observa un aparente flujo pseudoplástico y pueden ser fácilmente desplazados en el recipiente que los contiene.

Antes de aplicar el stress, los coageles de Asc₈, Asc₁₂, Asc₁₄ y Asc₁₆ son de apariencia homogéneas, no se observa en ellos separación de fases durante un período de por lo

menos 15 días, sin embargo la degradación del ácido ascórbico puede conspirar contra la exactitud de los resultados para estudios en periodos de tiempo más prolongado. Luego de aplicar el stress correspondiente a la medición reológica algunos cambios macroscópicos son observados. Cuando transcurren menos de 30 minutos (de la aplicación del stress) se verifica una separación de fase y se observa una pérdida de agua del sistema. No ocurre lo mismo con los coageles de Asc₁₀ y Asc₁₁ donde esta separación de fases es observada antes de la aplicación del stress.

Estas diferencias en el comportamiento macroscópico pueden estar relacionadas a la configuración estructural que adquiere cada sistema. La SEM permite observar estas estructuras. Para este fin, se obtuvieron microfotografías de coageles de Asc₈, Asc₁₀, Asc₁₂ y Asc₁₆. Para Asc₈ y Asc₁₀ las estructuras halladas podrían ser descritas como lamelas planares continuas, donde las bicapas figura 4.20 a) - h) están ordenadas en láminas, sin embargo se pueden observar importantes diferencias de tamaño entre Asc₈ y Asc₁₀ figura 4.20 a) - b).

5.4.2 Reogramas

El análisis reológico fue realizado obteniendo las curvas de flujo para cada coagel, las cuales consisten en los perfiles de fuerza aplicada (shear stress) versus velocidad de flujo (shear rate).

Todos los coageles muestran flujos No Newtonianos, y las diferencias encontradas están estrechamente relacionadas con su estructura.

Los coageles de Asc₁₀ y Asc₁₁ muestran un flujo pseudoplástico y para el caso de Asc₁₁ es posible observar tixotropía 4.19 b) y c).

Por otra parte los coageles de Asc₈, Asc₁₂, Asc₁₄ y Asc₆ exhiben una reología mucho más compleja 4.19 a),d),e),f) este comportamiento es característico de sistemas semisólidos de alta estructuración los cuales son descritos en bibliografía.

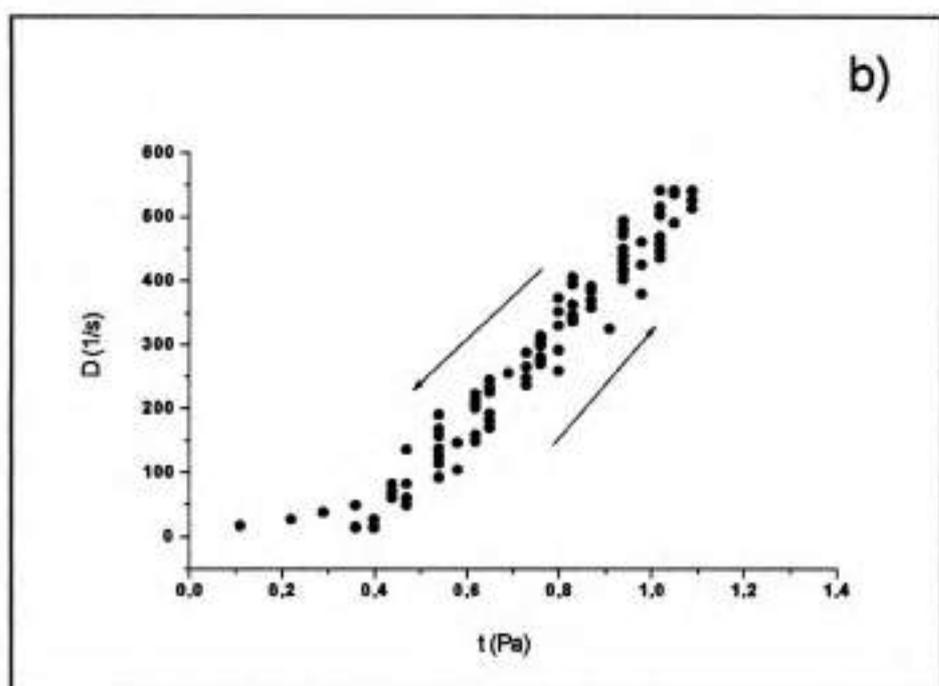
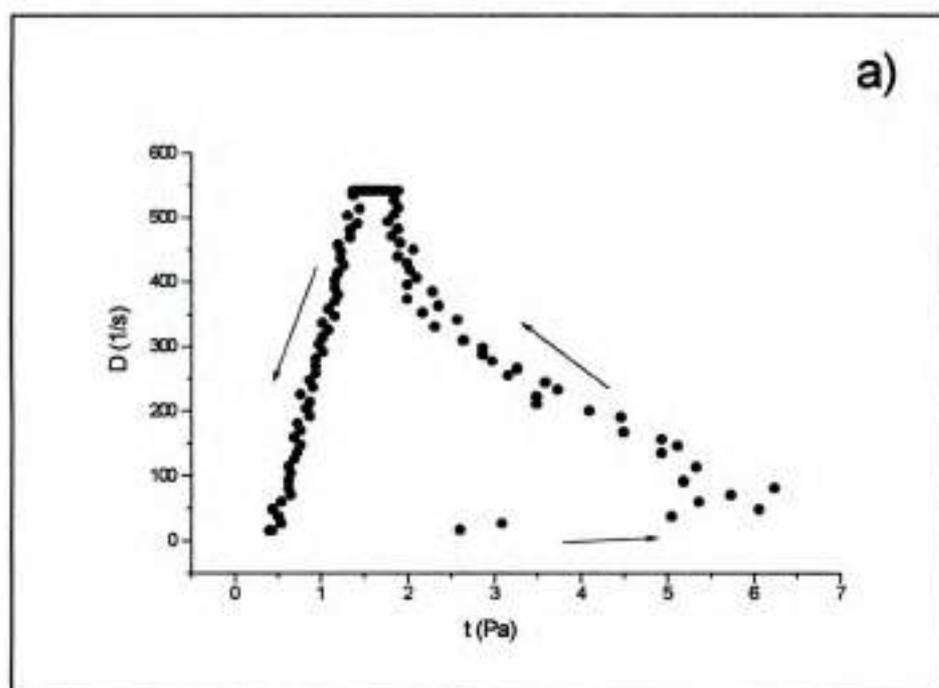


Figura 4.19: Reogramas para: a) Asc_8 , b) Asc_{10} .

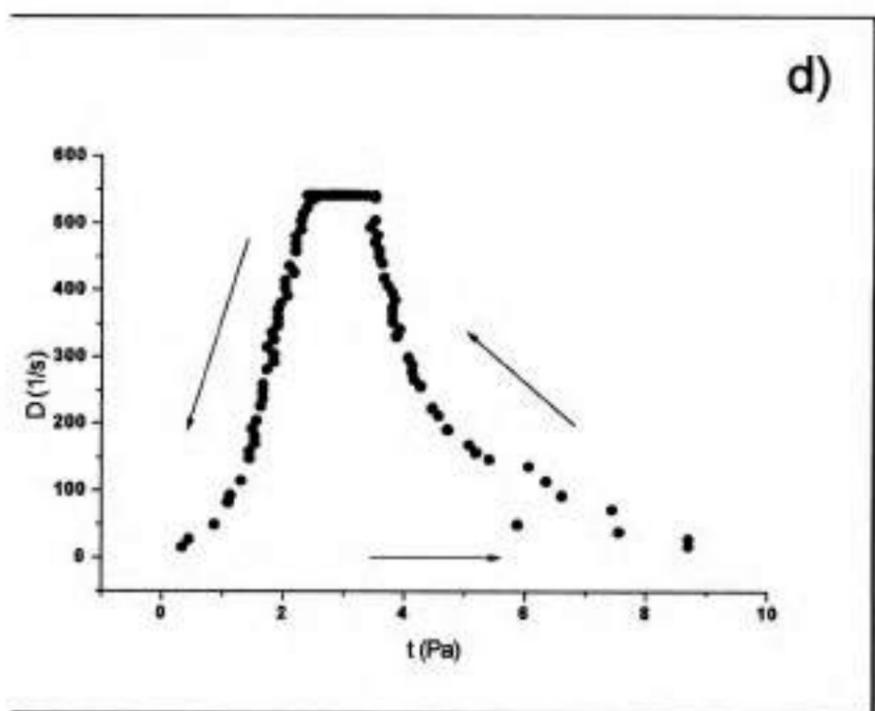
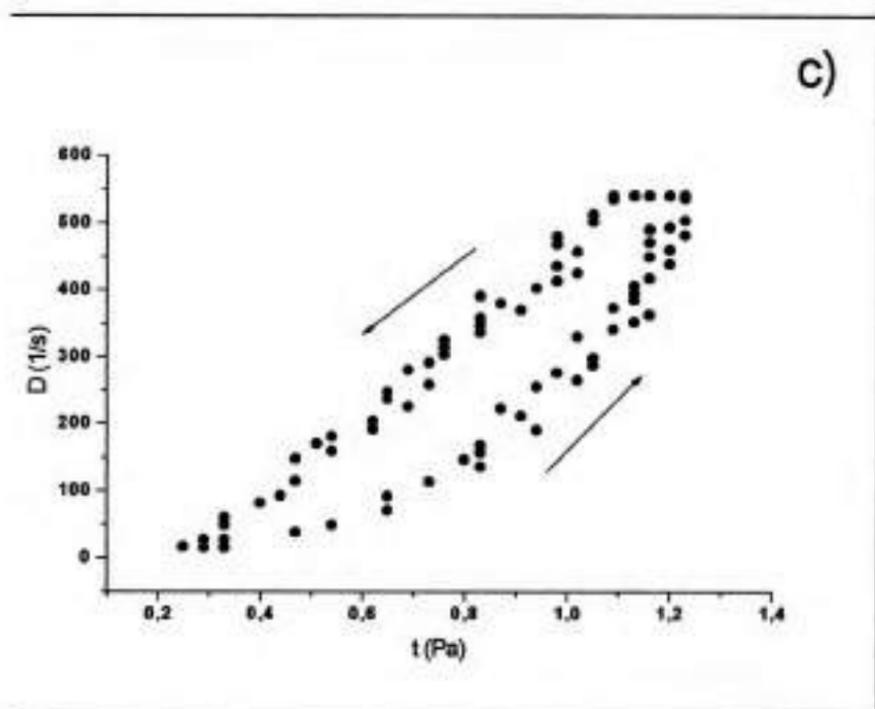
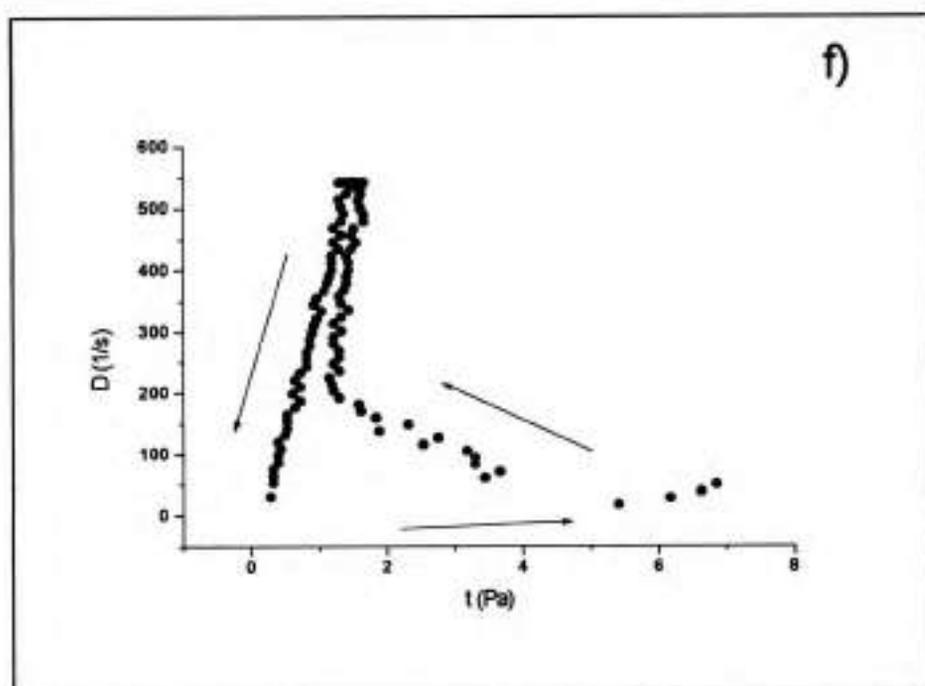
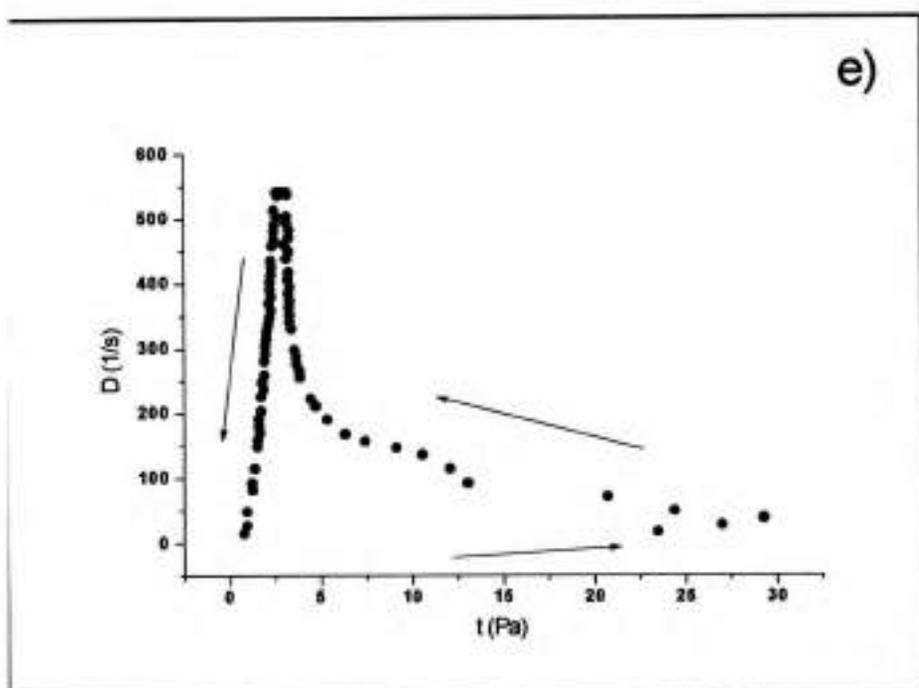


Figura 4.19 (continuación): Reogramas para: c) Asc_{11} , d) Asc_{12}

Figura 4.19 (continuación): Reogramas para: e) Asc_{14} y f) Asc_{16}

Como puede ser observado en las figuras 4.19 (a),(d),(e),(f), la característica principal de estos sistemas es la presencia de una histéresis que se acentúa en la curva ascendente con un valor donde el sistema se “rompe” y da lugar a un sistema con un flujo diferente, que se evidencia en una curva de menor fluidez. Este valor está descrito como “spur value” y sería una medida de la fuerza que se le debe aplicar al sistema para generar esta ruptura o el cambio estructural que da lugar a estos reogramas complejos.

Los coageles que fueron estudiados presentaron un alto valor de ruptura o “spur value”. En este caso el valor podría definirse como la fuerza necesaria para romper la estructura ordenada, cambiando así las características reológicas del sistema.

El valor de fuerza (Shear stress) correspondiente a este punto es denominado (valor de ruptura estático (static yield value, σ_S). Por otro lado, un valor similar (dynamic yield value, σ_D) puede ser obtenido por la extrapolación de la porción lineal de la curva inferior con el eje x (shear stress), el cual es una medida de la energía necesaria para lograr a τ/D constante la disrupción parcial o total durante la curva ascendente (Barry, 1974). Además, otro valor que puede ser obtenido es lo que se denomina “loop area” (LA) y nos puede indicar la “cantidad” de estructura que se ha roto durante la aplicación del stress.

Los valores de σ_S , σ_D y LA para coageles de Asc_8 , Asc_{12} , Asc_{14} y Asc_{16} son reportados en la tabla 4.7.

Tabla 4.7: Valores de LA, σ_S y σ_D obtenidos de los diferentes reogramas.

| Coagel de | LA | σ_S (Pa) | σ_D (Pa) |
|-------------------------|------|-----------------|-----------------|
| Asc₈ | 1253 | 6.24 | 0.42 |
| Asc₁₂ | 1574 | 8.71 | 1.06 |
| Asc₁₄ | 2977 | 29.29 | 1.02 |
| Asc₁₆ | 643 | 6.86 | 0.18 |

Para estos sistemas, una ruptura irreversible de la estructura es observada cuando el τ (σ_D) \geq σ_S . La estructura original que presentaban los coageles no es recuperada después del stress, aún cuando el sistema es mantenido en reposo. Los valores de σ_S observados son proporcionales al largo de la cadena alquílica para Asc_8 , Asc_{12} y Asc_{14} . El valor relativamente bajo para Asc_{16} indicaría una red de menor estructuración. Los semisólidos exhiben un flujo pseudoplástico a $\tau \geq \sigma_S$.

5.4.3 Comportamiento reológico vs. microestructura de los coageles.

Las diferencias estructurales que se observan en las microfotografías obtenidas por SEM pueden ser relacionadas con el comportamiento reológico que se ha descrito anteriormente.

Para Asc_{10} , el coagel muestra una típica estructura lamelar, con láminas paralelas bimoleculares y flexibles (Clint, 1992). Esta estructura está en concordancia con el flujo pseudoplástico obtenido.

Una estructura similar es observada para Asc_8 , sin embargo este sistema muestra una reología más compleja que para Asc_{10} , con un punto de ruptura o "spur value".

Una explicación para este fenómeno podría ser la diferencia de tamaño observada entre las placas de Asc_8 y Asc_{10} . La estructura del derivado Asc_8 es mucho más grande que la de Asc_{10} .

Los coageles de Asc_{12} , Asc_4 y Asc_{16} muestran un comportamiento similar al de Asc_8 en cuanto a la reología, sin embargo las microfotografías figura 4.20 e),f),g) y h) muestran un arreglo de las lamelas del tipo "castillo de naipes". Esta estructura sería debido a la presencia de una región de agua fuertemente unida en las regiones de las bicapas. Esto no sería posible para Asc_{10} y Asc_{11} .

Cuando los coageles de Asc_{12} , Asc_{14} y Asc_{16} son sometidos a fuerzas de agitación intensas ($\tau \geq \sigma S$) las estructuras se rompen irreversiblemente y los valores de viscosidad disminuyen significativamente. Ahora los coageles adquieren una estructura menos ordenada similar a Asc_{10} . Este fenómeno puede ser observado con claridad con la microfografía obtenida sobre el coagel de Asc_{12} después de la aplicación del stress (figura 4.21). La estructura de Asc_{12} ahora es similar a la de Asc_{10} figura 4.20 b) y el sistema adquiere flujo pseudoplástico.

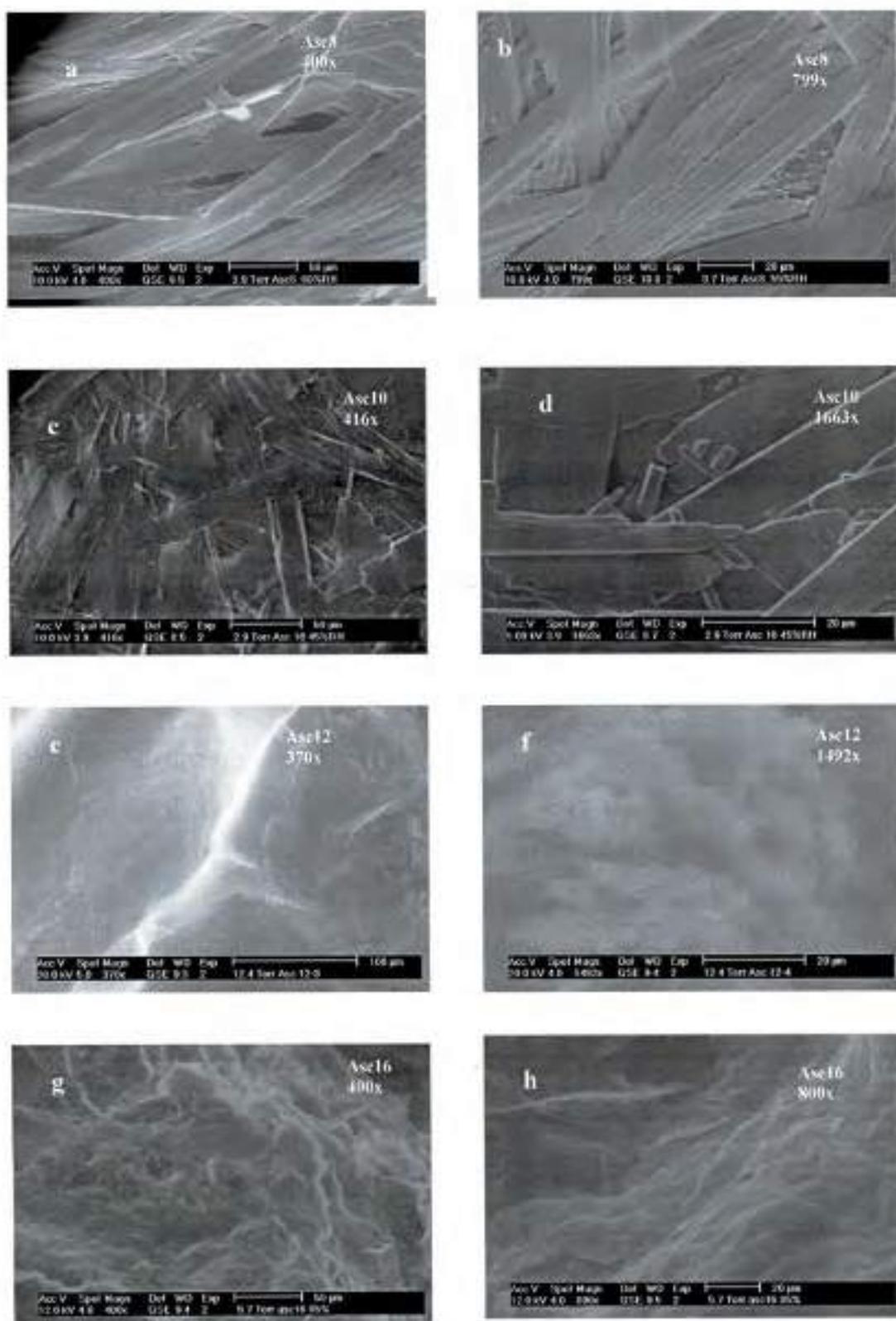


Figura 4.20: Microfotografías obtenidas para los diferentes coageles.

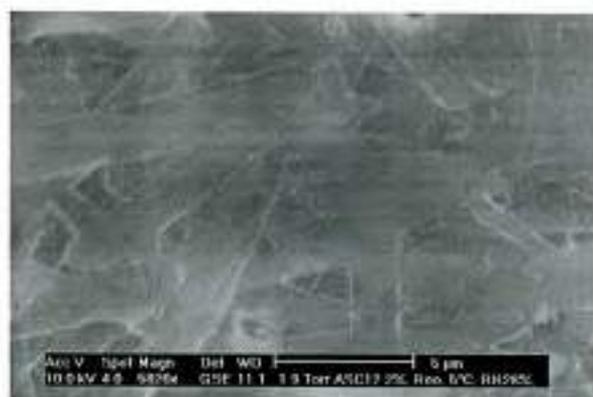


Figura 4.21: Microfotografía obtenida para Asc₁₂ después de la aplicación del stress

5.4 Conclusiones

Asc₈, Asc₁₂, Asc₁₄ y Asc₁₆ muestran una reología compleja (spur value), mientras que los coageles obtenidos a partir de Asc₁₀ y Asc₁₁ exhiben flujo pseudoplástico, y tixotropía para el caso de Asc₁₁. El arreglo estructural de estos sistemas es el factor clave para estos comportamientos. Asc₁₂, Asc₁₄ y Asc₁₆ forman “castillos de naipes”, mientras que Asc₁₀ y Asc₁₁ estarían restringidos estructuralmente para lograr estos arreglos y forman láminas paralelas bimoleculares.

Cuando el $\tau \geq \sigma S$ (spur value) los coageles adquieren flujo pseudoplástico. Debido a esto la manipulación de los sistemas puede afectar el comportamiento reológico, siendo este un dato de importancia para el potencial diseño de formas farmacéuticas semisólidas utilizando los derivados del ascórbico como portadores.

6. Conclusiones generales del capítulo.

Las conclusiones generales de este capítulo pueden básicamente dividirse en tres partes:

- a) Se estudio la formación de coageles de los Asc_n, determinando las estructuras involucradas, haciéndose uso de los datos obtenidos y de un análisis de la escasa bibliografía que existe sobre este tema.
- b) Se estudió la influencia de algunos factores que se consideraron importantes para conocer estos sistemas. Entre estos factores se destacan la importancia de la estructura del agua en la estructura y transiciones involucradas en estos sistemas y la influencia de la presencia de cosolventes en las transiciones de fase. En este sentido se pudo comprobar que la estructura del agua en los coageles es vital en la estructura de los mismos, y que el agregado de cosolventes comúnmente utilizados en farmacia puede influir en las transiciones de fase posibilitando diseñar sistemas incluyendo estas variables.
- c) Y por último y asumiendo la potencial utilización de los coageles como vehículos en formas farmacéuticas tópicas, se colectó información sobre la reología de los mismos. Estos resultados aportaron por un lado el conocimiento básico de los sistemas, como dato de preformulación en caso de utilizar estos sistemas en semisólidos de aplicación tópica y por otro lado arrojaron interesantes datos sobre la estructura tridimensional y estabilidad física de los coageles.

Capítulo 5

Propiedades de relevancia farmacéutica

1. Introducción general

1.1 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 describe aquellos usos y aplicaciones que se hacen de los conocimientos básicos adquiridos en el diseño, preparación, control y almacenamiento de formulaciones farmacéuticas.

En las últimas décadas el arsenal terapéutico se ha incrementado exponencialmente, se han diseñado y probado un gran número de drogas para un gran número de patologías.

Entre los procesos involucrados en la obtención de un efecto farmacológico por parte de una droga, se pueden identificar claramente tres fases: i) la fase farmacéutica, aquella donde se pueden incluir todos los procesos que sufre la formulación hasta que libera el principio activo (p.a) en el sitio de absorción (que puede ser el sitio de acción en aplicaciones tópicas), ii) la fase farmacocinética, aquellos procesos que incluyen la absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco, vale decir aquella fase que regulará la cantidad de p.a que alcanzará el sitio de acción, y por último iii) la fase farmacodinámica, que describe la acción específica del fármaco en su sitio de acción, donde esta involucrada la interacción droga-receptor.

En muchos casos la modificación de aspectos relacionados a la fase farmacéutica, puede mejorar aspectos relacionados a la fase farmacocinética, o bien disminuir efectos secundarios y/o indeseados, o en muchos casos por ejemplo extender el tiempo durante el cual la droga ejerce su actividad.

La eficacia de muchas drogas es usualmente limitada por su potencial de alcanzar el sitio de acción. En muchos casos, solamente una pequeña cantidad de la dosis administrada alcanza este sitio, mientras que la mayor parte de la droga es distribuida por el resto del cuerpo dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas.

Por otra parte las propiedades fisicoquímicas de los p.a en numerosas oportunidades pueden dificultar la formulación de un medicamento: solubilidad en distintos solventes, estabilidad, propiedades fisico-mecánicas (fluidez, densidad, compactabilidad), son en muchos casos limitantes para poder lograr la formulación deseada.

Por lo tanto una "buena droga" debe necesariamente estar ligada a un "buen envase" es decir no solo es necesario que el p.a tenga una farmacodinamia apropiada, sino que se debe asegurar que la formulación en todos los aspectos sea exitosa.

Por lo antes descrito y por muchos factores más es que, la investigación en Sistemas Portadores Drogas ha tenido en los últimos años un incremento importante. Esto se ve ejemplificado en la gran cantidad de publicaciones que se observan en este tópico en la literatura científica principalmente en los últimos diez años. Nuevas revistas (journals) se han sumado a las ya existentes por la demanda de ediciones específicas en campos puntuales de la investigación. (Breimer, 1998).

En el marco de la presente tesis, se evaluó la potencial utilización de agregados supramoleculares de Asc_n , en sistemas portadores conteniendo drogas insolubles y/o de baja estabilidad en sistemas acuosos.

1.2 Utilización de compuestos anfipáticos en sistemas farmacéuticos.

1.2.1 Aplicaciones generales

Las aplicaciones generales de los AT son comentadas en capítulo 1, *introducción*.

1.2.2 Aplicaciones específicas

De todas maneras y a los fines de clarificar un poco más la importancia que los tensioactivos tienen en sistemas farmacéuticos, es que a continuación se hará una descripción de algunas aplicaciones que se ven en literatura científica.

En este orden de cosas, es común en tecnología farmacéutica utilizar los agentes tensioactivos para aumentar la absorción de principios activos por diferentes vías. La literatura contiene un número importante de reportes donde está claramente demostrado que los surfactantes pueden influenciar la velocidad y la cantidad de absorción de ciertas drogas. Sin embargo también se ha reportado que la inclusión de surfactantes en las formulaciones puede tener un efecto contrario.

Por otra parte, no debe perderse de vista que existen surfactantes fisiológicos (por ejemplo las sales biliares) que pueden por sí mismo modificar la absorción de ciertas drogas (Gibaldi y cols., 1970).

Un ejemplo de lo que se viene planteando se ve reflejado en diversos artículos donde se utilizan surfactantes en la solubilización e incremento de la absorción intestinal de ciertas drogas como sulfadiazina y sulfaisoxazol en ratas (Reddy y cols., 1976), o bien tetraciclina (Allen y cols., 1981). Por otra parte también se utilizan surfactantes para aumentar la permeación transdermal de ciertas drogas (Chowhan y cols., 1978; Funke y cols., 2002), como así también es el caso de ciertas formulaciones donde el tensioactivo es utilizado para aumentar la permeación de drogas por vía rectal, un caso particular de estos es la zidovudina (Kawaguchi y cols., 1991).

Por supuesto no habría que perder de vista aquellas aplicaciones de los surfactantes como agentes de suspensión, emulgentes o mojantes (formas farmacéuticas sólidas).

Por lo tanto, a manera de resumen, la utilización de agentes tensioactivos en sistemas farmacéuticos se puede ordenar o clasificar de la siguiente manera:

- a) Modificadores de propiedades biológicas
 - Enhancers (transdermales, rectales, etc)
- b) Modificadores de propiedades farmacotécnicas y biofarmacéuticas:
 - Agentes de suspensión (FF líquidas y semisólidas)
 - Emulgentes (FF líquidas y semisólidas)
 - Solubilizantes (FF líquidas)
 - Agentes humectantes (FF sólidas)

Como una síntesis de lo antes descrito en la tabla 5.1 se puede observar un grupo de drogas que tienen en sus formulaciones surfactantes.

Tabla 5.1: Drogas de interés farmacéutico que contienen surfactantes en su formulación

| Droga | Surfactante | Ruta |
|--------------------------------|----------------|---------|
| Clordiazepóxido HCl | Polisorbato 80 | IM |
| Acetato de hidrocortisona | | IM |
| Acetato de dexametasona | | IM |
| Etoposido | | IV |
| Acetato de medroxiprogesterona | | IM |
| Acetato de metilprednisolona | | IM |
| Loxapina HCl | | IM |
| Vitamina A | | IM |
| Ampicilina | Polisorbato 40 | IM e IV |
| Penicilina G benzatínica | | IM |

| | | |
|--------------------------|----------------------------------|-------------|
| Testolactona | Polisorbato 20 | IM |
| Anfotericina B | Desoxicolato de Na | IV |
| Fitonadiona | POE (derivados de ácidos grasos) | IM, SC e IV |
| Ciclosporina | POE (aceite de castor) | IV |
| Penicilina G benzatinica | POE (sorbitan) | IM |
| Penicilina G procainica | Monopalmitato | IM |

2. Objetivos

Los estudios relacionados a la potencial utilización de los agregados supramoleculares de Asc_n en el diseño de distintas formas farmacéuticas nos permitió recabar la información necesaria para culminar el trabajo de tesis con un criterio racional. De esta manera, los estudios iniciales de preformulación dieron origen al juicio crítico para proponer distintas formulaciones con potencial éxito como medicamento posible de ser utilizado terapéuticamente.

Todas las propiedades evaluadas en los estudios de preformulación son un significativo aporte para dilucidar el comportamiento como tensioactivo de los Asc_n , ya que estos compuestos no han sido descritos anteriormente como tales.

De todas maneras, el objetivo primario de este trabajo y que se intentará reflejar en este capítulo es la aplicabilidad de los Asc_n en sistemas farmacéuticos.

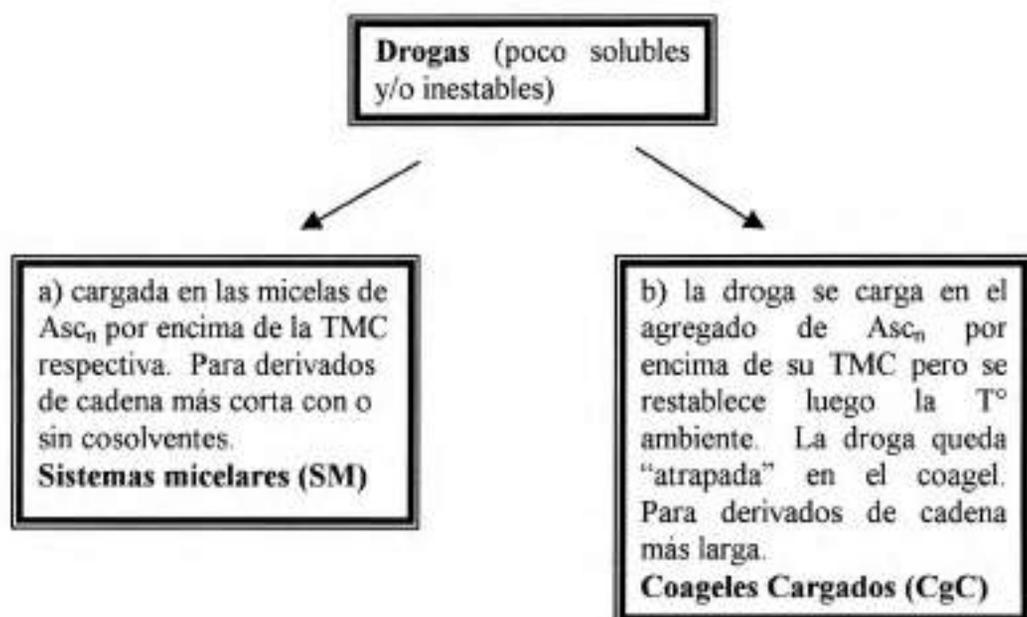
De acuerdo a los resultados obtenidos, los Asc_n pueden formar sistemas semisólidos por debajo de la TMC, los cuales pueden ser utilizados como portadores de fármacos. Estos tipos de sistemas, con características de cristales líquidos, han sido descritos como vehiculos para distintas drogas (Nesseem, 2001; Lee and Kellaway, 2000; Farkas y cols., 2000; Schneeweis and Muller-Goymann, 1997; Wahlgren y cols., 1984; Mueller-Goymann and Hamann, 1993).

Las características semisólidas de los coageles de Asc_n los hace de especial interés en el diseño de FF tópicas. En este contexto, los objetivos que se presentan en este capítulo fueron:

- a) Solubilización de drogas poco solubles y/o inestables.
- b) Incorporación de drogas en coageles de Asc_n

Por un lado la solubilización de drogas insolubles y/o inestables en sistemas micelares, es decir a temperaturas superiores a la TMC del derivado, y por otra parte, aquellos sistemas donde se carga la droga por encima de la TMC pero se deja enfriar el sistema con la consecuente obtención de un coagel cargado.

Estos procesos son esquematizados a continuación:



3. Solubilización de drogas poco solubles. Asc_n a temperaturas superiores a su TMC. Sistemas Miceíares (SM)

3.1 Introducción

Uno de las propiedades más importantes de los surfactantes en solución es la habilidad de las micelas u otros agregados de aumentar la solubilidad (aparente) de compuestos que son reportados habitualmente como insolubles o poco solubles en el medio de dispersión usados.

Este fenómeno, conocido normalmente como *solubilización*, ha sido extensamente revisado por muchos autores (Mulley, 1964; Nakagawa, 1967; Elworthy y cols., 1968) y utilizado intensivamente en diversos sistemas farmacéuticos.

Para entender los aspectos cinéticos de la solubilización micelar y la interacción de las diferentes drogas con las micelas es de suma importancia conocer la localización, distribución y orientación de dichas drogas en los agregados.

Estos factores pueden también afectar la estabilidad y biodisponibilidad de los compuestos solubilizados, cuya localización en las micelas depende de la naturaleza (polar o no polar) de las moléculas. Existen varios sitios donde pueden localizarse los compuestos solubilizados; se sugiere que las moléculas apolares en sistemas acuosos de surfactantes iónicos pueden localizarse en el centro hidrocarbonado de la micela (figura 5.1 a)), mientras que sustancias polares pueden adsorberse sobre la superficie figura 5.1 d). También es posible para moléculas de naturaleza variable ubicarse en la zona intermedia (zona de empalizada) , entre la zona estrictamente apolar y la cabeza polar del surfactante (figura 5.1 c)). En la figura 5.1 b) se observa una situación intermedia entre a) y c).

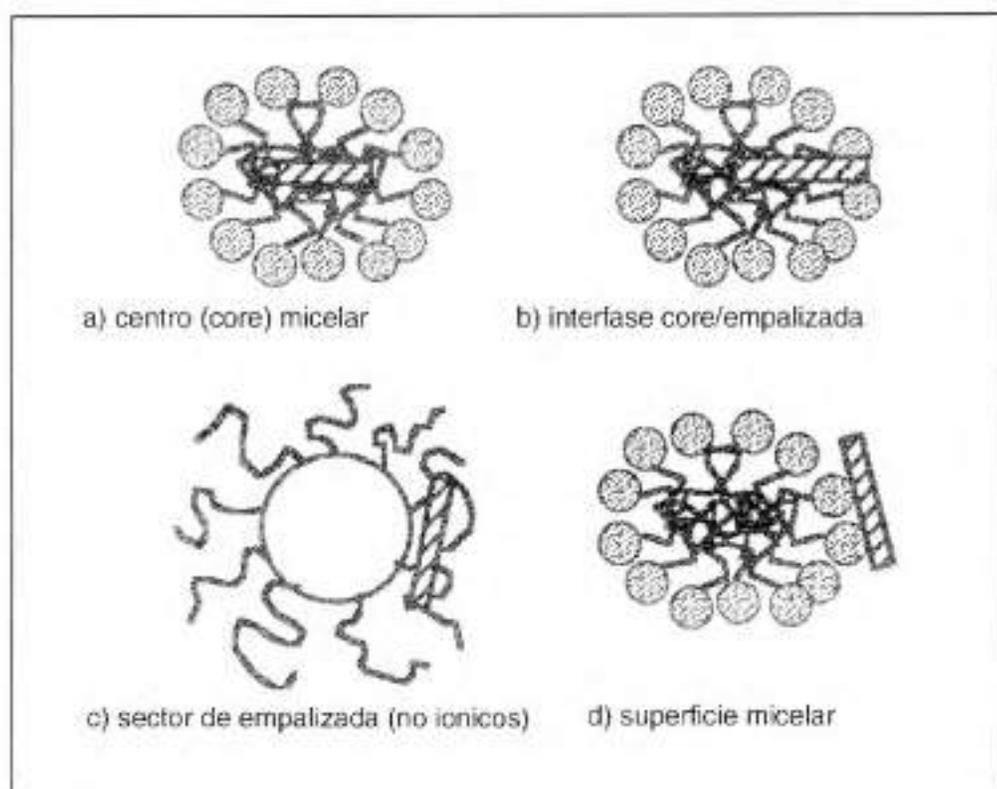


Figura 5.1: distintas posibilidades de localización de drogas en una micela. a) ubicación en el centro micelar; b) localización intermedia entre el centro y el sector de empalizada; c) localización en el sector de empalizada y d) localización en la superficie micelar.

Los surfactantes no iónicos son en general los más utilizados en sistemas farmacéuticos, principalmente por su baja toxicidad. Sus micelas muestran un gradiente de polaridad creciente desde el centro de la micela hacia la zona de los grupos polioxietileno cercana al agua y obviamente a la superficie de la micela.

La extensa zona interfacial entre el centro micelar y la solución acuosa es un sector muy hidratado. La distribución anisotrópica de las moléculas de agua en este sector puede ser utilizada para la solubilización de una gran variedad de moléculas. Este sector se denomina sector de *empalizada* de la micela y puede ser también utilizado para la carga de drogas dentro del agregado.

3.1.1 Factores que afectan la solubilización

La capacidad de solubilización de un sistema varía según la naturaleza del surfactante y la droga a ser solubilizada.

Si una droga hidrofóbica es solubilizada en el interior de la micela (core), un aumento del largo de la cadena hidrocarbonada, y por lo tanto de la hidrofobicidad de la micela, aumenta la capacidad solubilizante del sistema.

Para micelas de surfactantes iónicos un aumento del tamaño del centro hidrofóbico micelar es el principal mecanismo para aumentar la solubilización de compuestos. Mientras que para micelas construidas con surfactantes no iónicos este fenómeno no está muy claro ni definido en la literatura.

El pH puede afectar el poder solubilizante de sistemas micelares de surfactantes no iónicos por modificación del equilibrio entre la droga ionizada y no ionizada. Esto afecta la solubilidad en agua y modifica la partición de la droga entre la fase micelar y la fase acuosa. Un ejemplo de esto puede ser el caso del ácido benzoico, donde la forma no ionizada es mejor solubilizada en una micela de polisorbato 80 que la forma ionizada (Collet y cols., 1975).

3.1.2 Termodinámica de la solubilización

La solubilización puede ser considerada como una partición de la droga entre la fase micelar y el entorno acuoso. Por lo tanto la energía libre estándar de solubilización ΔG_s^0 está relacionada con el coeficiente de partición K entre la micela y el medio acuoso:

$$\Delta G_s^0 = -RT \ln K \quad \text{Ec. 1}$$

La entalpía y entropía estándar de solubilización pueden describirse con las siguientes ecuaciones:

$$\ln K = -\frac{\Delta H_s^0}{R} \frac{1}{T} + \text{constante} \quad \text{Ec. 2}$$

$$\Delta G_s^0 = \Delta H_s^0 - T \Delta S_s^0 \quad \text{Ec. 3}$$

El signo y la magnitud de las funciones termodinámicas ΔH_s^0 y ΔS_s^0 pueden relacionarse con la localización del compuesto solubilizado en la micela. La solubilización de una molécula hidrofóbica en el centro micelar es similar a la transferencia de la molécula de una fase acuosa a un medio orgánico, en ambos casos, el orden y la magnitud de las variables termodinámicas es la misma. La entalpía es aproximadamente cero o un número pequeño positivo y la energía libre es generalmente negativa. El mayor aporte a la negatividad de la energía libre es el importante cambio entrópico que se produce.

Para solutos polares el ΔG_s^0 de la transferencia desde el medio acuoso al centro de la micela es positivo y el cambio entrópico es negativo. Esto da una obvia explicación termodinámica de porque solutos polares no tienen una tendencia a ingresar en el interior de la micela.

Las funciones termodinámicas para la transferencia de varios solutos desde el agua a una solución micelar o solventes orgánicos son mostradas en la tabla 5.2. El ácido benzoico es un soluto modelo de aquellos que se adsorben en la superficie micelar en surfactantes no iónicos, para este compuesto las tres variables termodinámicas son negativas. Los derivados del ácido barbitúrico solubilizados en lauril sulfato de sodio, un surfactante aniónico, muestran que los valores de las variables son similares a las del ácido benzoico.

Tabla 5.2: Funciones termodinámicas para la transferencia de solutos desde agua a una solución micelar o solventes orgánicos.

| Solutos | Medio orgánico | ΔG^0 | ΔH^0 | ΔS^0 |
|-------------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | | (cal/mol) | (cal/mol) | (cal/mol) |
| Cloruro de amonio | Etanol | + 5010 | -2830 | -26.3 |
| Metano | Ciclohexano | -2280 | + 2380 | + 15.6 |
| Amobarbital | Solución micelar* | -2340 | -1700 | + 2.1 |
| Barbital | Solución micelar* | -790 | -2600 | -6.0 |
| Ácido Benzoico | Solución micelar [†] | -2320 | -3700 | -4.7 |
| Etano | Solución micelar* | -3450 | + 2000 | + 18.3 |
| Fenobarbital | Solución micelar* | -1850 | -3800 | -6.5 |
| Propano | Solución micelar* | -4230 | + 1000 | + 17.5 |

* Lauril sulfato de sodio

[†] Alquil polioxietileno

Los barbituratos pueden distribuirse en la parte exterior de la micela (la región de los polioxietilenos) más que en el core micelar, por lo tanto deben tener un cambio entrópico negativo.

3.2 Materiales y metodología

Para estos estudios fueron seleccionados $Asc_{16}Na$, Asc_8 y Asc_{10} . Estos derivados presentan la característica de poseer TMC por debajo de $37^{\circ}C$. Esto posibilita la obtención de dispersiones micelares con potencial utilización en FF líquidas. Las drogas que se utilizaron fueron fenacetina (FEN), Parafarm[®] (Argentina); griseofulvina (GRI), Parafarma[®] (Argentina); Antralina (ANT), Parafarma[®] (Argentina) y ácido retinoico (RET), Sigma-Aldrich[®] (USA).

Se prepararon soluciones de concentración creciente del Asc_n . Posteriormente se procedió a colocar un exceso de la droga bajo estudio y homogenizar las muestras a tiempos determinados por un lapso de 3 horas. Transcurrido este tiempo se filtran las muestras, se diluyen en caso de ser necesario y se realizan determinaciones espectrofotométricas a las siguientes longitudes de onda: FEN (305nm), GRI (333nm), ANT (366nm), y RET (350nm). Las determinaciones en dispersiones de $Asc_{16}Na$ y Asc_8 fueron realizadas a una temperatura de $30^{\circ}C$, mientras que para Asc_{10} la temperatura fue de $40^{\circ}C$. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.3 Resultados obtenidos

En las figuras 5.2 y 5.3 se observa la solubilidad de griseofulvina y fenacetina en dispersiones de $Asc_{16}Na$. Como se puede observar la CMC (ver capítulo 3, *propiedades de agregación*) no se modifica por el agregado del soluto.

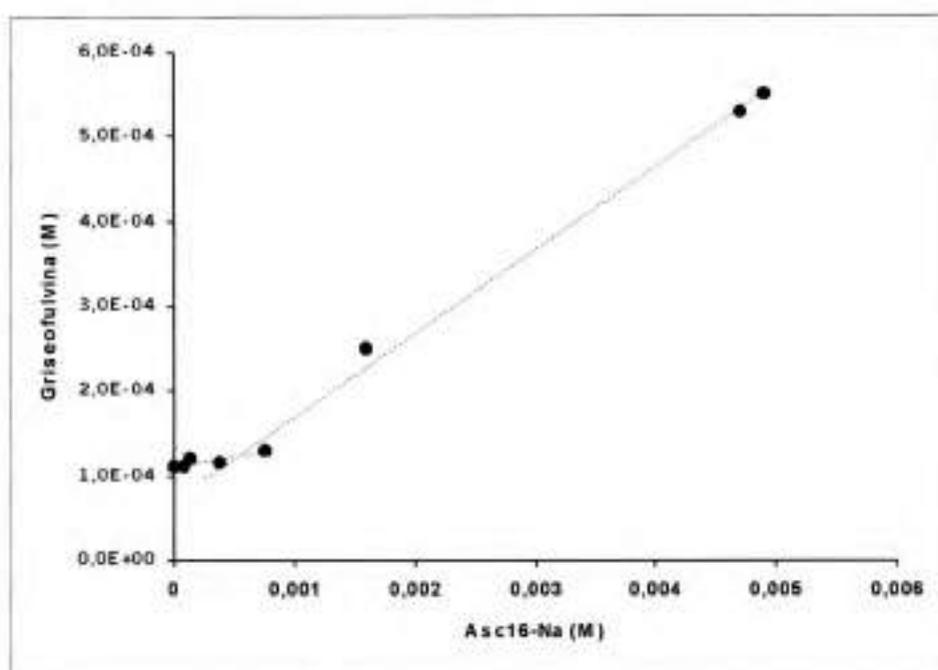


Figura 5.2: Solubilidad aparente de griseofulvina en dispersiones de Asc₁₆Na

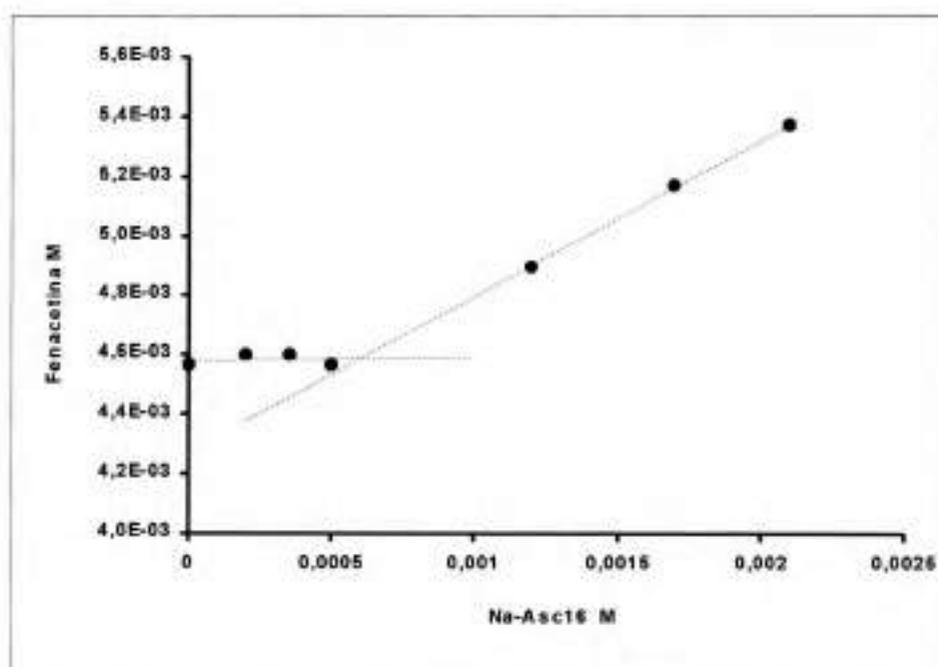


Figura 5.3: Solubilidad aparente de fenacetina en dispersiones de Asc₁₆Na

Para el caso de griseofulvina se verificó un aumento de 5,6 de veces la solubilidad en agua pura.

Para el caso de fenacetina, después de la CMC se puede observar una pendiente de 0,5, esto indicaría que se incorpora una molécula de soluto cada dos moléculas de Asc_{16}Na .

Asc_8 posee la TMC más baja ($\cong 18^\circ\text{C}$) de la serie de compuestos estudiados, por lo tanto a temperatura ambiente, si se supera la concentración crítica, el sistema funcionaría como un SPD.

Por este motivo se procedió a verificar la capacidad de carga de Asc_8 utilizando como drogas modelos, griseofulvina, fenacetina, antralina y ácido retinoico.

Los resultados condensados se muestran en las figuras 5.4, 5.5 y 5.6.

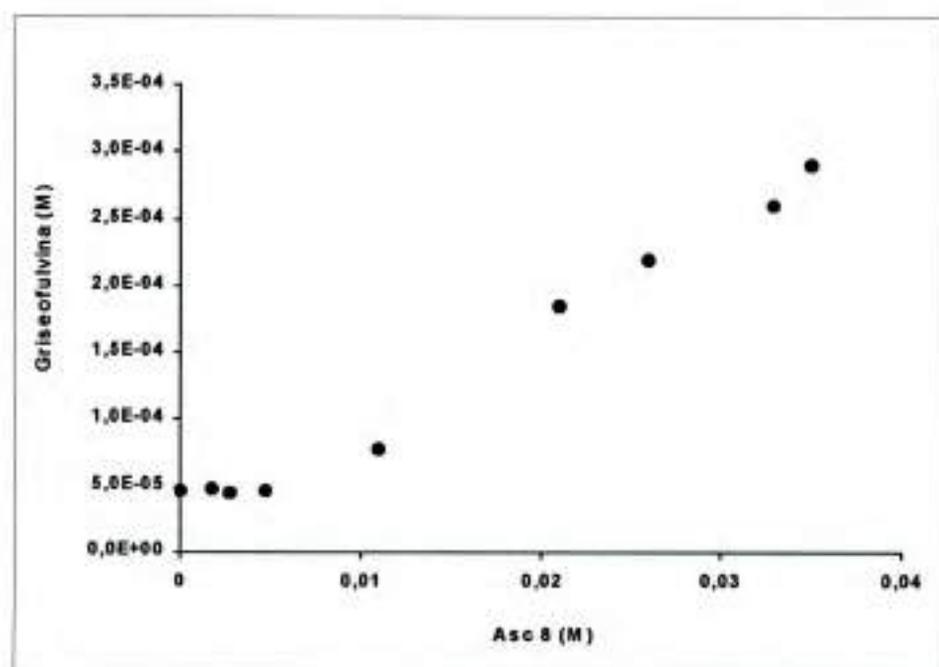


Figura 5.4: Solubilidad aparente de griseofulvina en Asc_8

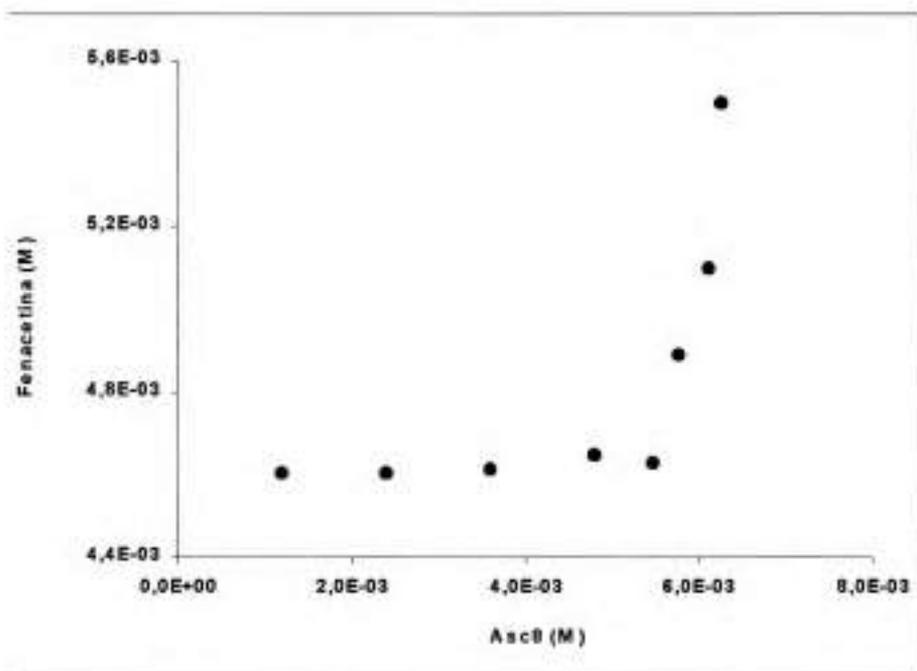


Figura 5.5: Solubilidad aparente de fenacetina en Asc₁

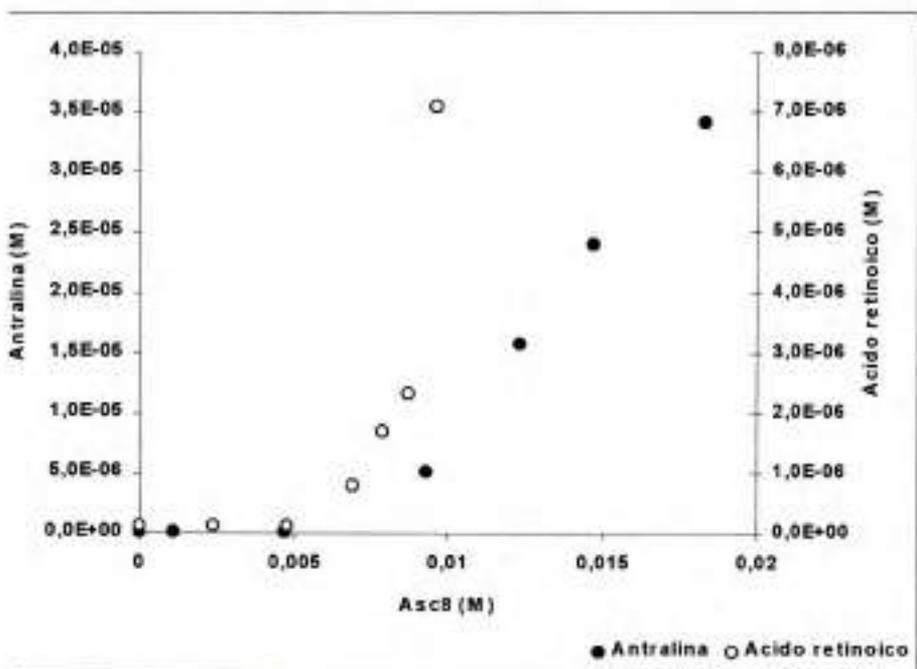


Figura 5.6: Solubilidad aparente de antralina y ácido retinoico en Asc₃

Para el caso de Asc_{10} ($TMC > 36^{\circ}C$) se realizaron los experimentos de solubilización micelar con griseofulvina. Los resultados pueden observarse en la figura 5.7.

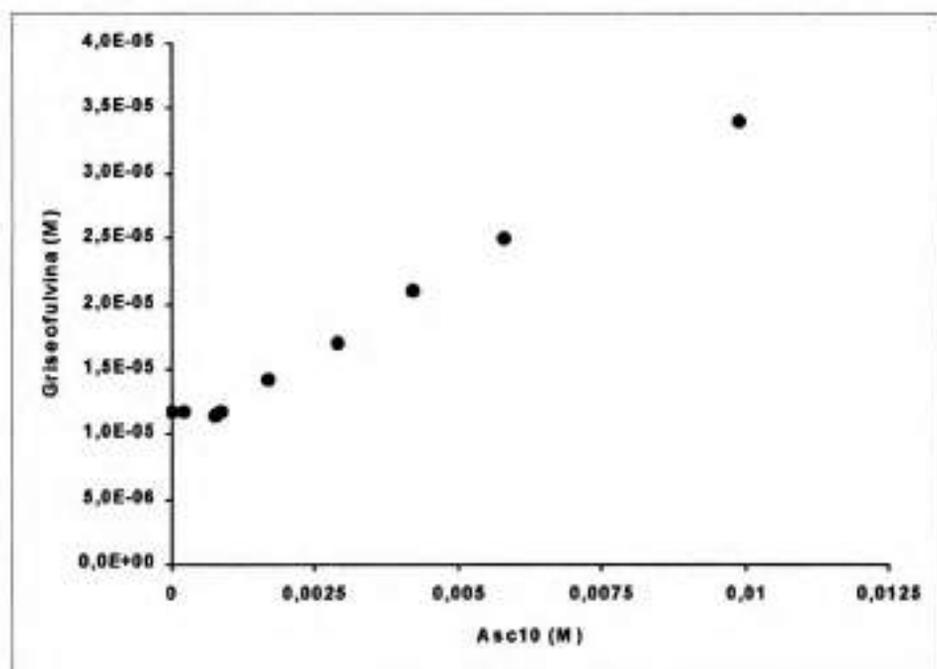


Figura 5.7: Solubilidad aparente griseofulvina en Asc_{10}

3.4 Conclusión

De los resultados obtenidos se puede decir que los tres derivados estudiados poseen capacidad de cargar drogas poco solubles y el agregado de estos p.a no afecta la CMC en forma marcada de ninguno de los tres Asc_n

4. Coageles cargados

4.1 Introducción

4.1.1 Aspectos generales

Los resultados obtenidos de la evaluación de propiedades fisicoquímicas, propiedades de agregación y estudios de preformulación de los Asc_n permiten suponer que los agregados supramoleculares (micelas, geles y coageles) pueden tener potencial aplicación como sistemas portadores de fármacos.

El análisis racional del comportamiento de los distintos Asc_n indica que las aplicaciones de estos sistemas pueden ser variables, dependiendo del tipo de derivado.

A partir de los Asc_n de cadena más corta ($n \geq 10$), pueden ser formulados sistemas líquidos (a T° ambiente) con potencial utilidad en el diseño de soluciones para uso oral, inyectables, etc.

Por otra parte, los derivados de cadena más larga ($n \geq 12$) poseen TMC relativamente altas ($TMC > 40^\circ C$) lo cual permite obtener a T° ambiente agregados supramoleculares semisólidos (coageles)

De esta forma, estos sistemas podrían ser utilizados como vehículos para administración tópica de distintas drogas, entre otras aplicaciones.

En virtud de esto se comenzó a trabajar sobre el siguiente esquema.

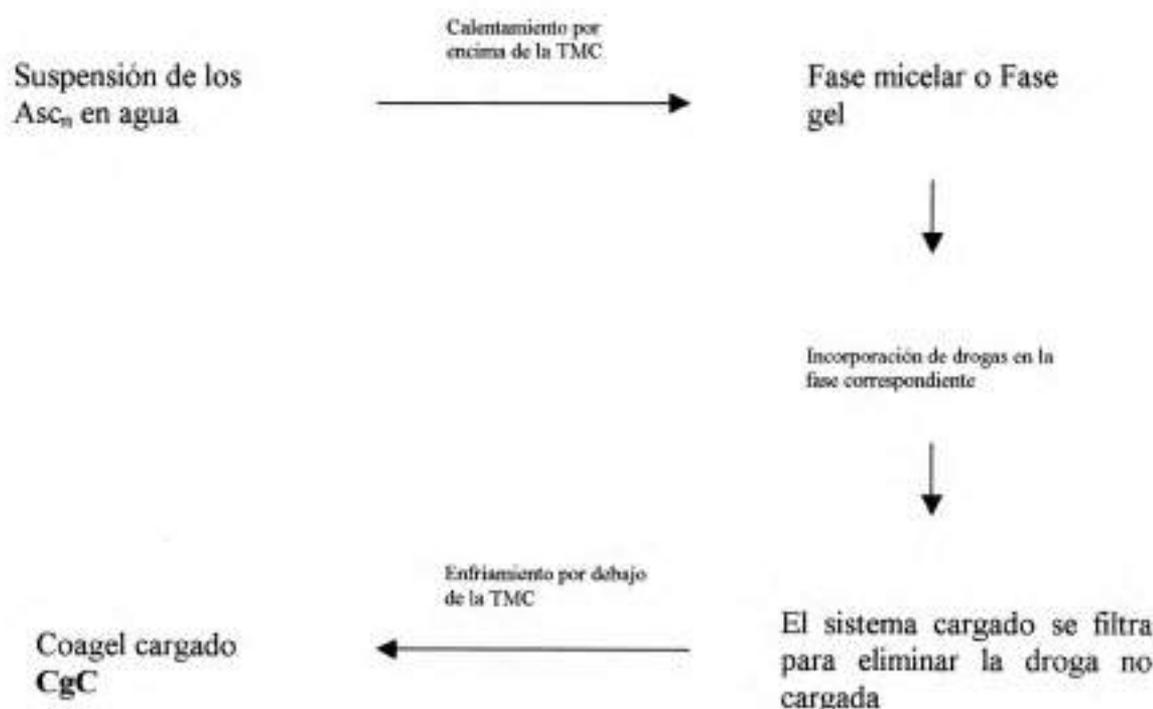


Figura 5.8: Proceso esquemático general para obtener un CgC.

4.1.2 Coageles cargados como vehículos semisólidos.

Los sistemas semisólidos han sido usados por varias centurias para tratar diversas patologías de la piel, o bien para preservar este órgano del desgaste natural.

La definición de *semisólido* en realidad tiene un origen y un alcance estrictamente farmacéutico. Son aquellas formulaciones que a T° ambiente poseen propiedades de sólidos, pero cuando son aplicadas modifican sus propiedades reológicas tendiendo más a un comportamiento líquido. Esto es sin lugar a dudas una simple generalización y actualmente los sistemas portadores de fármacos de aplicación tópica, que poseen características semisólidas, forman parte de un grupo demasiado heterogéneo como para describirlos en esta tesis.

De todas formas, existen algunos criterios importantes a tener en cuenta cuando se seleccionan excipientes para vehicular drogas de acción tópica o bien, y este es el caso, cuando se proponen nuevos sistemas portadores:

a) Propiedades reológicas:

Como se mencionó anteriormente, los sistemas más apropiados de aplicación tópica deben tener propiedades de flujo que garanticen por un lado su fácil envasado y conservación, pero que al momento de aplicarse en el sitio de acción puedan ser distribuidos homogéneamente.

b) Estabilidad:

La estabilidad química y física de un sistema debe ser lo suficientemente alta como para asegurar la potencia y utilidad del medicamento. Básicamente el sistema debe ser física y químicamente estable, no interactuar con otros excipientes y la droga, y en lo posible mantener o mejorar la estabilidad del p.a.

c) Posibles interacciones con la piel:

La palabra vehículo es de amplia difusión pero, en algunos casos puede ser un tanto desafortunada. Este es el caso de cuando uno analiza las posibles interacciones que los mismos tienen sobre la piel, ya que no solo sirven de portadores de la droga sino que en muchos casos pueden interactuar favorable o desfavorablemente, cambiando las propiedades de una formulación. En muchas oportunidades

simplemente pueden ser irritantes o alérgicos, pero también pueden aportar emolencia u oclusión; en esta última consideración se pondera incluso un efecto promotor de la absorción de ciertos fármacos.

d) Liberación de los p.a:

Definitivamente, un paso crucial en una formulación es la liberación de las drogas contenidas en la misma. En sistemas semisólidos no existe una excepción en este punto. El vehículo debe, de acuerdo a las necesidades biofarmacéuticas preestablecidas, liberar la droga para que ejerza su efecto.

Los coageles de Asc_n tienen propiedades que hacen posible pensar en ellos como portadores de drogas de acción tópica. Entre estas propiedades se pueden citar:

- Capacidad de carga de fármacos poco solubles que en otros sistemas deberían estar dispersos en el vehículo.
- Una reología apropiada para la utilización que se pretende (ver capítulo 4, *coageles*)
- Un potencial efecto estabilizante sobre drogas inestables a la oxidación.
- La posibilidad de tener sistemas con un alto porcentaje acuoso que haga factible su fácil retiro de la zona de aplicación pero con una potencial actividad oclusiva remanente cuando el agua del sistema se pierda por evaporación.

En función de estos conceptos, se seleccionó Antralina como p.a. a ser vehiculizado. Este compuesto es una droga utilizada en terapéutica para el tratamiento tópico de la psoriasis, motivo por el cual es vehiculizada en formas farmacéuticas semisólidas (Mahrle y cols., 1997; Federman y cols., 1999). Tanto la crema como ungüento conteniendo esta droga están codificados en USP XXIV.

La psoriasis es un desorden común crónico que se manifiesta en la piel, que causa alta morbilidad, se estima que entre 1-3 % de la población está afectada.

Los tratamientos antipsoriásicos utilizando antralina presentan varias desventajas debido principalmente a las propiedades físico-químicas, a sus efectos adversos y a su formulación (Ashcroft y cols., 2000). La Antralina (Ditranol, 1,8-dihidroxi-9-antrona) es un polvo microcristalino color amarillo insoluble en agua (ver figura 5.9). En soluciones de solventes orgánicos existe casi totalmente en la forma cetónica (antrona),

mientras que en solventes orgánicos alcalinos (ej: aminas y piridina) cambia a la forma tautomérica enólica (antranol) (Baba y cols., 1968).

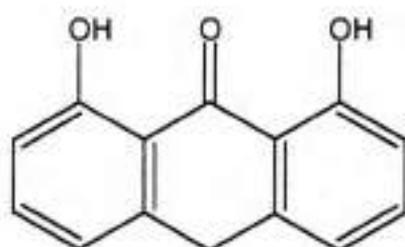


Figura 5.9: Estructura química de antralina

La antralina es una droga inestable y sufre oxidación espontánea dando lugar a la formación de monómeros y dímeros de quinona. El principal producto de degradación, dantrona, es relativamente inestable y sufre también oxidación. La oxidación de antralina es favorecida por la luz visible y ultravioleta, presencia de oxígeno, incremento de temperatura, metales, soluciones alcalinas y el contacto con lípidos, proteínas y enzimas. Eventualmente, dependiendo de las condiciones, se puede producir polimerización de los productos de degradación

Los tratamientos antipsoriásicos utilizando antralina han mostrado ser seguros y efectivos, sin embargo, una serie de efectos adversos están presentes y conspiran contra la efectividad del tratamiento (Ashcroft y cols., 2000). Su aplicación puede ser problemática ya que produce efectos irritantes, ardor, tinción y necrosis de la piel normal y enferma. Las formas farmacéuticas actualmente disponibles son poco efectivas en moderar los efectos adversos de esta droga y generalmente no mejoran la estabilidad química de la Antralina. Los vehículos convencionales como parafina poseen capacidad limitada de solubilización de Antralina, por lo que se hace necesario incorporar cantidades "extras" de droga en estado sólido (suspensión) para mantener la concentración requerida en el sitio de acción. Debido a esto, el exceso de droga sólida en la superficie de la lesión y su distribución indiscriminada en la región perilesional causa normalmente irritación y tinción de la piel sana.

De esta forma, como objetivos del diseño de una forma farmacéutica semisólida para la vehiculización de antralina se pueden establecer: i) solubilización del principio activo

en el sistema, ii) aumento de la estabilidad de la droga en el vehículo, iii) contribuir a paliar los efectos irritantes sobre la piel no lesionada, iv) disminuir los efectos de tinción sobre la piel y vestimenta y, v) posibilitar el retiro de la formulación a través del lavado de la zona de aplicación a los fines de facilitar la aplicación de tratamientos de contacto de tiempos cortos (Prins, 2002).

4.2 Objetivos

- a) Evaluar la posibilidad de utilizar a los Asc_n en forma de coageles como portadores de fármacos de aplicación tópica, utilizando como modelo una droga antipsoriásica (antralina).
- b) Establecer el efecto del largo de cadena sobre la capacidad de carga de la droga en los coageles de Asc_n .
- c) Estudiar la capacidad estabilizante de los coageles de Asc_n , teniendo en cuenta que antralina es inestable a la oxidación.
- d) Evaluar la influencia de la incorporación de antralina en los coageles sobre el comportamiento reológico de estos sistemas.

4.3 Materiales y metodología

4.3.1 Materiales

La antralina utilizada en este trabajo fue marca Parafarm[®] (Argentina, origen Suiza). La dantrona utilizada fue marca Sigma[®] (USA). El agua utilizada fue bidestilada y purificada (MQ).

4.3.2 Metodología

En todos los casos los coageles de Asc_n fueron obtenidos suspendiendo una cantidad exactamente pesada de cada derivado en agua para luego elevar la temperatura por encima de la TMC correspondiente. Cuando era obtenida la fase micelar o la fase gel, se agregó un exceso de antralina. Cada muestra (a temperaturas superiores a la TMC) fue mantenida en esa condición por un lapso de 2 hs. Pasado este tiempo se filtró a la misma temperatura y se dejaron enfriar. Posteriormente, una cantidad exactamente

pesada de cada coagel “cargado” se llevó a un matraz de 10 ml, se enrasó con etanol, se diluyó en caso de ser necesario, y se procedió a la medición espectrofotométrica.

Para las determinaciones reológicas se realizó el mismo procedimiento, a excepción de que se dejó enfriar el coagel (cargado o no) en la copa portamuestra del viscosímetro. Se mantuvo el sistema a 8°C durante 3 hs. para luego proceder a la determinación reológica en un equipo marca Haake modelo VT500 dotado de un software VT500/VT 3.01 y un sensor NV (ver capítulo 4, *coageles*). Los ensayos de estabilidad se realizaron utilizando una técnica espectrofotométrica para multicomponentes teniendo en cuenta el λ_{\max} de antralina (366 nm) y su producto de degradación dantrona (427 nm). De esta manera a distintos intervalos de tiempo se siguió la concentración de antralina sin interferencia analítica de dantrona en coageles de Asc₁₆.

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

4.4 Resultados obtenidos

Los detalles estructurales y el análisis de las interacciones involucradas en la conformación de coageles de Asc_n fueron recientemente publicados (Palma y cols., 2002^o; Lo Nostro y cols., 2003) y descriptos en el capítulo 4, *coageles*.

Asimismo, los valores de TMC para los derivados fueron determinados por dos métodos independientes y los resultados obtenidos se reproducen en tabla 5.3. Esta tabla es una igual a la que se incluye en el capítulo 3, *propiedades de agregación*.

Tabla 5.3: TMC de Asc_n

| n | TMC (° C) | |
|----|-----------|---------------|
| | DSC | Conductividad |
| 8 | 18.5 | 19.3 |
| 10 | 34.5 | 36.8 |
| 11 | 40.0 | 38.5 |
| 12 | 47.3 | 44.5 |
| 14 | 56.0 | 54.2 |
| 16 | 63.8 | 61.3 |

El tipo de agregado supramolecular que estos compuestos forman por encima de la TMC depende del largo de la cadena alquímica. Para derivados con $n \leq 10$ se obtienen dispersiones micelares, mientras que para $n \geq 12$ se observa la formación de geles (capítulo 4, *coageles*)

4.4.1 Vehiculización de Antralina en coageles de Asc_n

Para la obtención de estos sistemas puede proponerse una secuencia de procesos aplicable a distintos principios activos, que son esquematizados en la figura 5.8.

Para cada Asc_n se evaluó su capacidad de solubilización de Antralina a una temperatura de unos pocos grados por encima de su TMC. Los resultados obtenidos son mostrados en la figura 5.10.

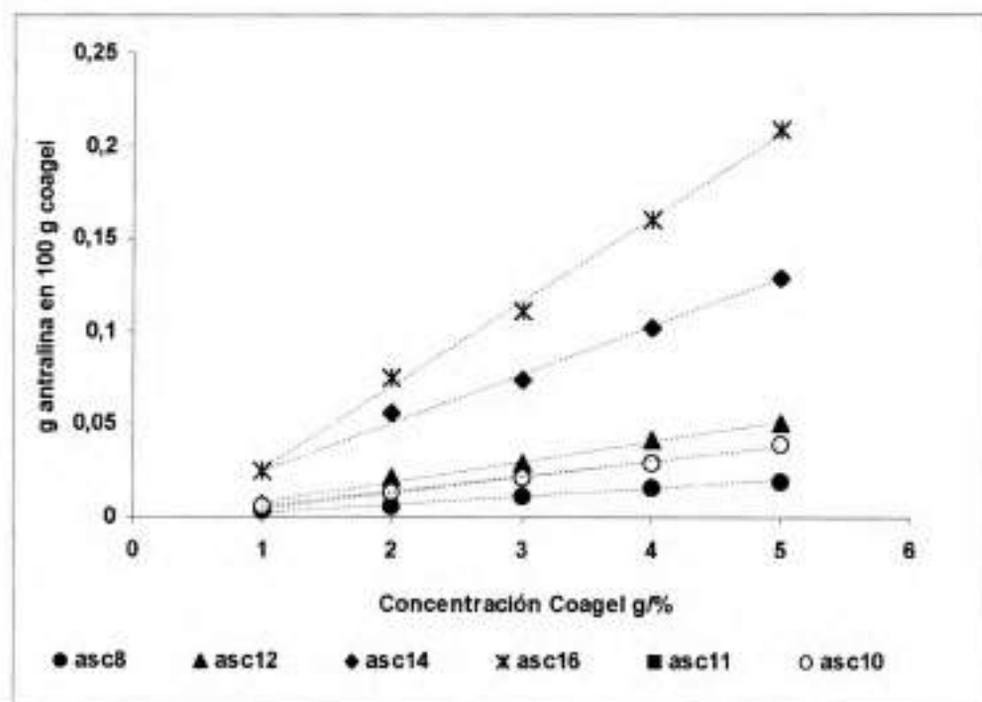


Figura 5.10: Antralina cargada en los coageles de Asc_n

Como era de esperar, para todos los derivados se observa un aumento de la concentración de Antralina solubilizada a medida que la concentración de Asc_n aumenta. En la figura 5.10 también puede observarse que la pendiente de la recta, indicativa de la capacidad de solubilización de cada derivado, aumenta a medida que

aumenta el largo de la cadena alquímica. Esto es concordante con el aumento del entorno lipofílico dentro de los agregados supramoleculares, con el consecuente aumento de la eficiencia de solubilización. No obstante, si se correlaciona la pendiente de estas rectas con el número de átomos de carbono de los Asc_n , puede observarse claramente un significativo aumento de la capacidad de carga para derivados de $n > 12$ (ver figura 5.11). Esto está directamente relacionado con las estructuras supramoleculares que los Asc_n forman por encima de la TMC. Las conformaciones tipo gel correspondientes a Asc_{12} , Asc_{14} y Asc_{16} permitirían solubilizar mayor cantidad de droga debido probablemente a un medio lipofílico con mayor capacidad de solubilización (lamelas de geometría planar) comparativamente a las dispersiones micelares (esféricas) formadas por los derivados de menor peso molecular.

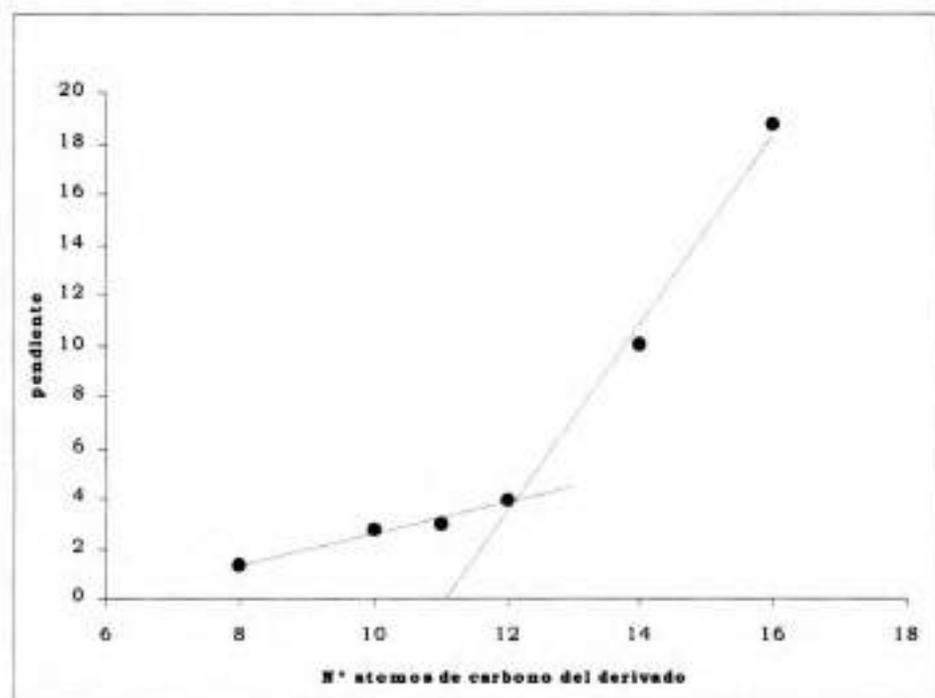


Figura 5.11: Capacidad de carga para Asc_n determinada por la pendiente obtenida para cada derivado de la figura 5.10.

Este fenómeno puede también ser observado si se analiza la eficiencia de solubilización evaluando la relación molar de Asc_n /Antralina (ver tabla 5.4). La cantidad de moléculas

de surfactante necesarias para solubilizar una molécula de droga disminuye significativamente a medida que aumenta el largo de cadena alquílica (n) de los Asc_n.

| n | m _{Asc_n} /m _{ant} ⁽¹⁾ |
|----|---|
| 8 | 214 |
| 10 | 100 |
| 12 | 67 |
| 14 | 23 |
| 16 | 15 |

Tabla 5.4: ⁽¹⁾ m_{Asc_n}/m_{ant} = moles de Asc_n necesarios para solubilizar un mol de antralina.

Las concentraciones de Antralina usualmente utilizadas para el tratamiento de la psoriasis van del 0.5 al 3% (Mahrle y cols., 1997). Actualmente se están realizando estudios tendientes a evaluar la posible incorporación de cosolventes a los sistemas con el objeto de: a) disminuir las TMC y b) aumentar la capacidad de carga de los sistemas.

4.4.2 Estabilidad química de la Antralina en coageles de Asc_n

La baja estabilidad de antralina debido a sus propiedades de auto-oxidación es uno de los principales inconvenientes de la formulación de esta droga en FF semisólidas (FFsS). Antralina es usualmente vehiculizada en ungüentos, pastas y cremas. Estos sistemas no garantizan la estabilidad y además son muy difíciles de retirar de la zona de aplicación, ya que se formulan sobre la base de vehículos oleosos con propiedades oclusivas. Este problema se ve especialmente agravado en zonas de aplicación como el cuero cabelludo, donde es necesario retirar el medicamento mediante lavado. Otro aspecto importante es la baja solubilidad de la droga en estos vehículos, lo que hace que antralina deba ser dispersada en la formulación. Como consecuencia de esto, es indispensable un tratamiento previo del principio activo tendiente a minimizar y homogeneizar su tamaño de partícula. Distintas alternativas han sido evaluadas para mejorar la estabilidad de Antralina en FF semisólidas. El agregado de antioxidantes como ácido salicílico parece haber mejorado la estabilidad, sin embargo se han informado resultados disímiles dependiendo del tipo de vehículo utilizado. Del mismo

modo se reporta la utilización de ácido ascórbico como antioxidante (Whitefield y cols., 1981)

De esta forma, el diseño de una FFsS convencional conteniendo antralina presenta varios inconvenientes muy difíciles de superar. Los sistemas semisólidos constituidos por cristales líquidos han sido descriptos como una alternativa sumamente útil para el diseño de FFsS debido principalmente a alta eficiencia de solubilización y aumento de la estabilidad por un efecto de encapsulación. Los sistemas semicristalinos lamelares han sido propuestos como vehículos para la administración tópica de distintas drogas (Nesseem y cols., 200; Swarbrick y cols., 1992^{a-b})

Sobre esta base se evaluó la estabilidad de Antralina en coageles de Asc₁₆, comparativamente a soluciones alcohólicas de la droga con y sin Asc₁₆. Los resultados son resumidos en la tabla 5.5 donde puede observarse que el aumento de estabilidad de la antralina en coageles de ASC₁₆ fue muy significativo.

Tabla 5.5

| Antralina en etanol (con Asc₁₆) | | |
|---|----------------------------------|----------------------------------|
| Tiempo | % de antralina remanente | |
| | Asc₁₆ (1% P/V) | Asc₁₆ (5% P/V) |
| 24 hs. | 99.5 | 100 |
| 72 hs. | 96.8 | 100 |
| 3 semanas | 16.1 | 15.9 |
| Antralina en etanol (sin Asc₁₆) | | |
| 24 hs. | 86.2 | |
| 72 hs. | 59.3 | |
| 3 semanas | 14.2 | |
| Antralina en Coagel de Asc₁₆ | | |
| 4 meses ⁽¹⁾ | 94 | 97 |

⁽¹⁾ Se obtuvieron datos intermedios que no son informados debido a que las variaciones no fueron significativas

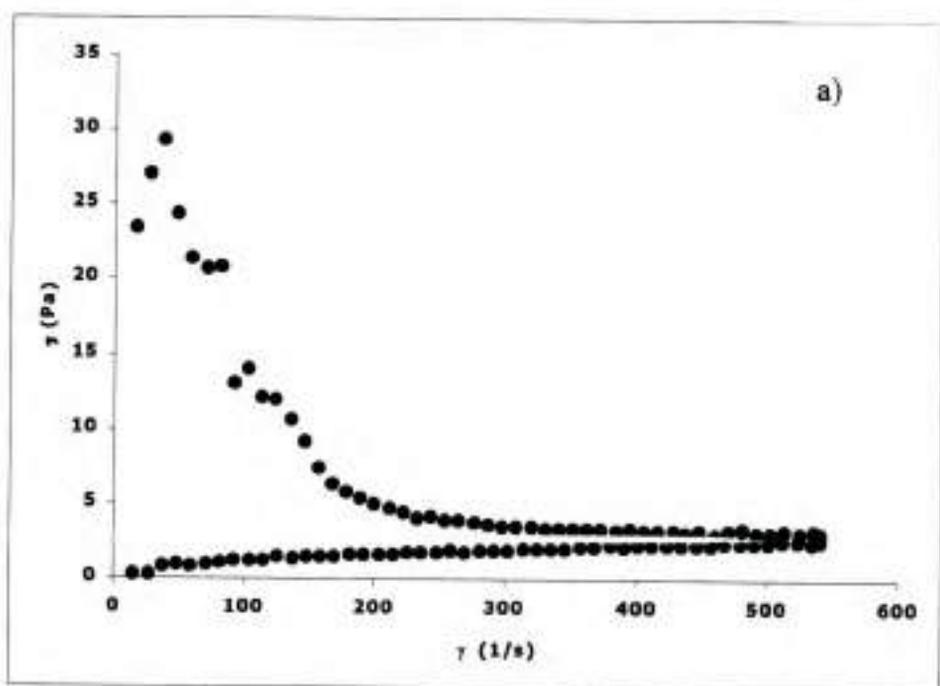
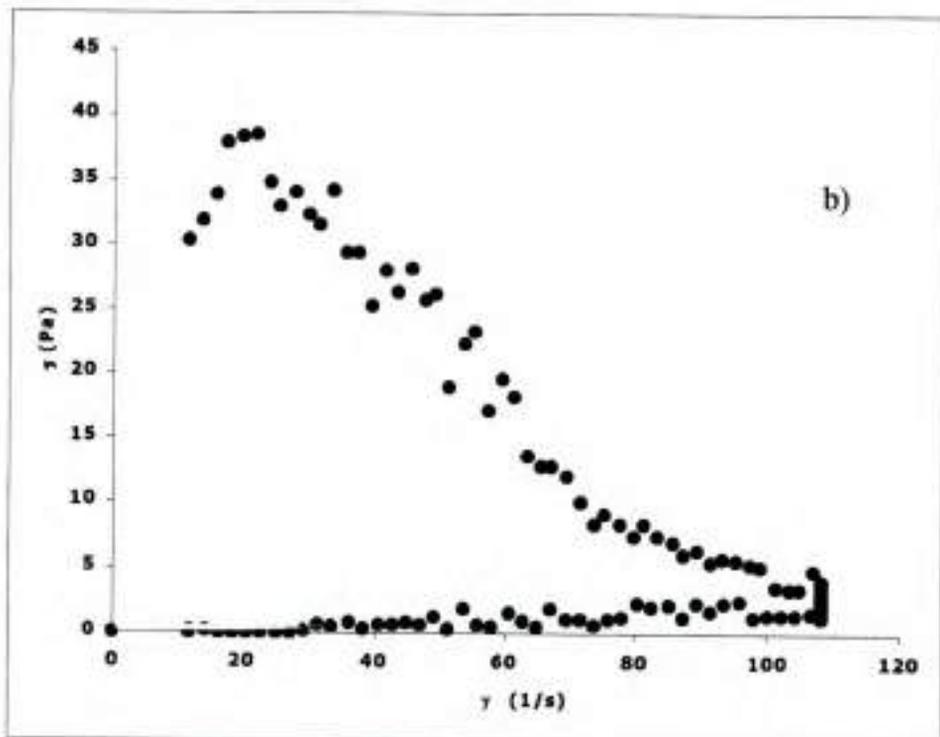
Cabe destacar que la presencia de Asc₁₆ en la solución etanólica tuvo un mínimo efecto como antioxidante. Esto indicaría que la solubilización de Antralina en las lamelas de

los coageles produciría un efecto de encapsulación, el cual sería el principal responsable de la protección de la droga en el medio acuoso. Otro aspecto a destacar es la influencia de la concentración de antralina sobre la velocidad de degradación. Las preparaciones con menor concentración de droga son menos estables que las más concentradas.

4.3.3 Comportamiento reológico de coageles de Asc_n en presencia de antralina.

En las figuras 5.12 y 5.13 se presentan los resultados obtenidos de coageles de Asc₁₄ con y sin presencia de antralina. Estos coageles mostraron un comportamiento reológico característico de sistemas semisólidos altamente estructurados similares a los descritos para sistemas que presentan estructuras tipo “castillo de naipes” (ver capítulo 4, *coageles*). El reograma presenta un gráfico donde la curva descendente es desplazada hacia la izquierda de la curva ascendente. Este tipo de reogramas presentan un valor crítico de fuerza (*“spur value”*) en la curva ascendente y puede ser tomado como una medida de la fuerza necesaria para romper en forma irreversible la alta estructuración que los coageles poseen inicialmente luego de su obtención cuando se encuentran en reposo.

La incorporación de Antralina en coageles de Asc₁₄ no parece afectar las características reológicas del sistema. Se observa también un sistema altamente estructurado, similar al anterior, indicando que la droga estaría realmente solubilizada en el interior hidrofóbico de las lamelas, sin afectar la estructuración del coagel provocada por la presencia de agua.

Figura 5.12: Reograma para Asc_{14} sin antralinaFigura 5.13: Reograma para Asc_{14} con antralina

4.5 Conclusión.

La utilización de FFsS constituidas por coageles de Asc_n, portadores de Antralina, sería ventajosa con respecto a FFsS tradicionales fundamentalmente debido al aumento de la solubilización de la droga, a un entorno que favorece la protección del compuesto frente a la degradación y a que se facilita la eliminación de la formulación del sitio de acción por lavado (Asc_n actuaría como tensioactivo).

Los Asc_n presentan la capacidad de formar agregados supramoleculares por encima de la TMC y depende del largo de cadena alquímica del derivado. Por encima de la TMC, se obtiene una dispersión micelar para derivados con $n \leq 10$, o bien geles para $n \geq 11$. Cuando la temperatura del sistema desciende por debajo de la TMC, estos derivados no precipitan sino que forman cristales líquidos con características semisólidas y son conocidos como coageles.

Para todos los derivados estudiados se observa un aumento de la cantidad de Antralina solubilizada a medida que la concentración de Asc_n aumenta. La capacidad de solubilización de cada derivado aumenta con el largo de la cadena alquímica. Esto es concordante con el aumento del entorno lipofílico dentro de los agregados. Para los derivados de $n > 12$ puede observarse claramente un significativo aumento relativo de la capacidad de carga. Las conformaciones tipo gel correspondientes a Asc₁₂, Asc₁₄ y Asc₁₆ permitirían solubilizar mayor cantidad de droga comparativamente a las dispersiones micelares formadas por los derivados de menor peso molecular.

Los coageles de Asc₁₄ mostraron un comportamiento reológico característico de sistemas semisólidos altamente estructurados similares a los descritos para sistemas que presentan estructuras tipo "castillo de naipes". La incorporación de antralina no parece afectar las características reológicas del sistema. La droga estaría solubilizada en el interior hidrofóbico de las lamelas, sin afectar la estructuración del coagel provocada por la presencia de agua.

El aumento de estabilidad de antralina en coageles de Asc₁₆ fue significativo. La presencia de Asc₁₆ en la solución etanólica tuvo un mínimo efecto como antioxidante. La solubilización de Antralina en las lamelas de los coageles produciría un efecto de encapsulación, el cual sería el principal responsable de la protección de la droga en el medio acuoso. Las preparaciones con menor concentración de droga son menos estables que las más concentradas.

Conclusiones generales

Las conclusiones de la presente Tesis se pueden resumir en los siguientes puntos

1. Los Asc_n son un grupo de surfactantes que presentan la característica de formar agregados supramoleculares dependiendo de la temperatura (TMC) y el largo de la cadena alquímica.
2. Los derivados estudiados forman coageles. Estas estructuras supramoleculares presentan características interesantes desde el punto de vista farmacéutico como potenciales vehículos en formas farmacéuticas sólidas, semisólidas y líquidas.
3. Estos sistemas tendrían potencial utilidad en la formulación de distintas FF. Las propiedades tensioactivas de estos compuestos permitirían solubilizar, estabilizar y vehicular distintas drogas en FF líquidas, semisólidas y sólidas.

Perspectivas

Los estudios realizados permiten presentar a los Asc_n como nuevos vehículos portadores de drogas. 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:

1. Evaluar la incorporación en los coageles de diferentes drogas de uso tópico.

Los estudios realizados hasta el momento hacen suponer que los Asc_n son una interesante alternativa como portadores en sistemas semisólidos. Por un lado han demostrado tener una importante capacidad de carga de fármacos sumado a la posibilidad de mejorar la performance de drogas con problemas de estabilidad ante la oxidación. Por otra parte en forma preliminar se están realizando experimentos que demuestran que los derivados del ácido ascórbico promueven la penetración de drogas en la piel dependiendo de largo de la cadena alquímica del derivado.

2. Obtener formulaciones de uso oral o parenteral utilizando los derivados de cadena más corta.

Como se ha descripto los derivados de cadena más corta tienen la capacidad de formar agregados micelares a temperatura ambiente. Para el caso de Asc₈ esto se da en dispersiones acuosas, mientras que para Asc₁₀ esto se puede lograr mediante el agregado de cosolventes en la fase continua.

Debido a esto, puede ser promisorio (de hecho se han realizado algunos estudios preliminares) la obtención de sistemas micelares para la administración enteral o parenteral de drogas insolubles y/o inestables.

3. Obtención de sistemas sólidos por la adsorción de coageles sobre excipientes inertes.

Existen numerosos materiales sólidos, generalmente de naturaleza inorgánica, que poseen una alta capacidad de adsorber agua debido a su alta superficie específica. Un ejemplo de estos materiales es el dióxido de silicio. Una de las estrategias de

trabajo que se plantean a futuro es la carga de coageles cargados sobre dióxido de silicio para poder aprovechar las propiedades de los coageles en sistemas sólidos y poder diseñar, por ejemplo, formas farmacéuticas compactas, tales como comprimidos.

4. Estudiar el comportamiento de sistemas mixtos, donde se podrían realizar mezclas de diferentes derivados.

En estudios preliminares se observó que cuando se mezclan dos derivados se puede apreciar una sola temperatura de transición (TMC) correspondiente al derivado de cadena más corta. Esta opción permitiría por un lado regular las TMC e hipotéticamente aumentar la capacidad de carga debido al aumento de entorno hidrofóbico del sistema.

5. Sintetizar derivados de doble cadena para poder obtener vesículas como una alternativa para vehicular drogas.

Otra potencial alternativa en el estudio de los Asc_n sería la de sintetizar derivados con dos cadenas alifáticas para la potencial obtención de vesículas. Estos sistemas podrían ser utilizados en el diseño de formas farmacéuticas de distinto tipo con mayor versatilidad que los sistemas micelares.

Anexo II **Metodologías analíticas**

El siguiente anexo describe en forma más detallada las diversas metodologías analíticas utilizadas en este trabajo de tesis.

El orden en el cual se muestran las diferentes técnicas es arbitrario y no refleja la utilización de las metodologías de manera cronológica.

1. Métodos Térmicos

Por métodos térmicos se entiende un conjunto de técnicas instrumentales basadas en la medida de una propiedad del sistema en función de la temperatura.

En el tercer Congreso de la Confederación Internacional de Análisis Térmico (ICTA), se adoptó el criterio de clasificar los métodos térmicos de la siguiente forma:

A) Métodos asociados a cambios de peso:**a) Métodos estáticos**

- 1) Determinación isobara de cambio de peso
- 2) Determinación isotérmica de cambio de peso

b) Métodos dinámicos

- 1) Termogravimetría (TG)
- 2) Termogravimetría derivada (DTG)

B) Métodos asociados a cambios de energía:

- 1) Curvas de calentamiento
- 2) Análisis térmico diferencial (DTA)
- 3) Calorimetría diferencial de barrido (DSC)
- 4) Análisis entálpico diferencial (DEA)

C) Métodos asociados a desprendimiento de gases

- 1) Análisis de gas desprendido (LGA)

D) Métodos asociados a cambios de dimensión

- 1) Dilatometría diferencial

E) Métodos mixtos

- 1) Termogravimetría y análisis térmico diferencial simultáneos (TG/DTA)
- 2) Termomicroscopía (TOA)

Durante el calentamiento o enfriamiento de los materiales, su estructura, estado o composición química, cambia. Estas transformaciones y reacciones están íntimamente relacionadas con el intercambio de calor entre la muestra y la atmósfera circundante. Los distintos métodos térmicos proporcionan diferente información sobre estos procesos de intercambio de calor y por consiguiente de un gran número de cambios físicos y fisicoquímicos que tienen lugar en la muestra, tales como: absorción, adsorción, desorción, quimisorción, hidratación, deshidratación, fusión, vaporización, sublimación, reacciones en estado sólidos, transiciones entre estados mesofórficos, reacciones gas-sólido, descomposición, degradación, etc.

Aunque los métodos térmicos fueron desarrollados originalmente para el estudio de reacciones químicas y estructura de materiales inorgánicos (minerales, arcillas, materiales de construcción, etc), actualmente su utilización es bastante más abarcativa, incluyendo el estudio de algunos procesos fisiológicos, estructura de polímeros y fundamentalmente en farmacia para el control de calidad y desarrollo de fármacos.

Entre estos métodos se destacarán, la termogravimetría (TG) y la calorimetría diferencial de barrido (DSC) por haber sido usados en este trabajo de tesis.

1.1 Termogravimetría (TG)

La termogravimetría consiste en seguir las variaciones de peso que experimenta la muestra sometida a un incremento continuo y lineal de la temperatura.

La representación de la variación de peso de la muestra en función de la temperatura constituye una curva termogravimétrica o termograma (ver figura II.1). El peso de la muestra se puede expresar indistintamente en peso absoluto, en porcentaje del peso total, o en porcentaje de pérdida de peso.

En un termograma se distinguen tramos horizontales o plataformas, en las que el peso de la muestra permanece constante y tramos de fuerte pendiente descendente que marcan la velocidad de pérdida de peso.

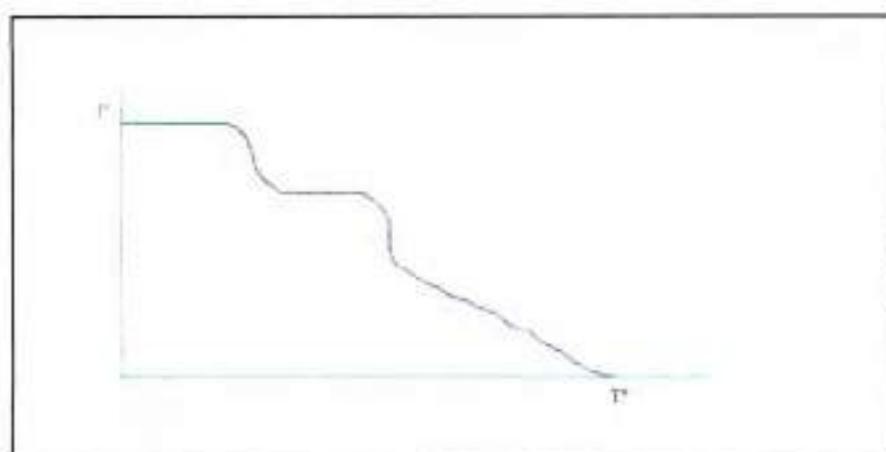


Figura II.1: Esquema de un termograma

Con frecuencia se usa una variante de esta metodología denominada termogravimetría de derivada (DTG). Las curvas de termogravimetría de derivada (ver figura II.2) relacionan la velocidad de pérdida de peso con la temperatura.

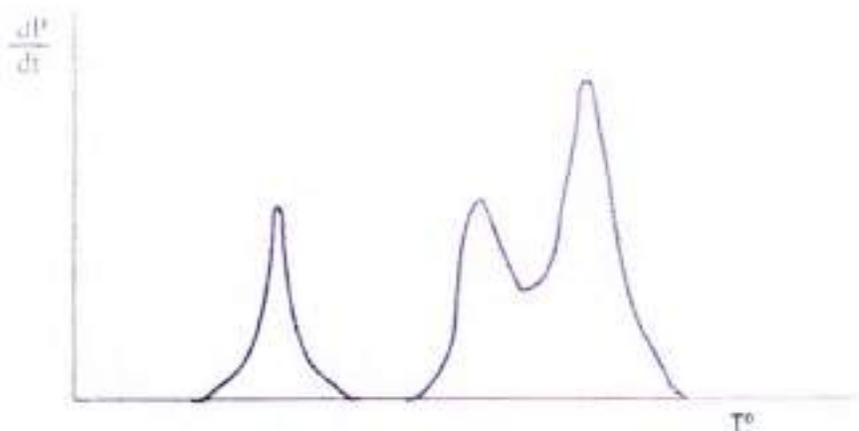


Figura II.2: Termogravimetría derivada.

En estas curvas, los valores de ordenada cero ($dP/dt = 0$) corresponden a las plataformas de los termogramas convencionales y los máximos coinciden con los puntos de máxima pendiente de los tramos descendentes. Los puntos donde existe un mínimo distinto de cero en la curva derivada, pueden indicar la formación de un compuesto o transición intermedia, aunque también pueden ser atribuibles a causas experimentales, tales como irregularidad en la rampa de calentamiento o en la respuesta del termopar involucrado en la medición de la temperatura. Las curvas de derivada suelen ofrecer una mejor resolución que los termogramas comunes, por ejemplo un pequeño hombro en la curva DTA es una posible indicación de reacciones consecutivas que pueden pasar desapercibidas en una curva normal.

Los instrumentos que permiten el registro continuo de curvas termogravimétricas, es decir la variación de peso en función de la temperatura que aumenta continuamente a lo largo del tiempo, se denominan *termobalanzas*. Suelen tener la posibilidad de variar la velocidad de calentamiento (rampa) y de registro, controlar la atmósfera en la que se encuentra la muestra (inerte, oxidante, reductora, vacío, etc), etc.

Esencialmente una termobalanza consta de tres partes principales (ver figura II.3): el horno, la balanza y el sistema de registro.

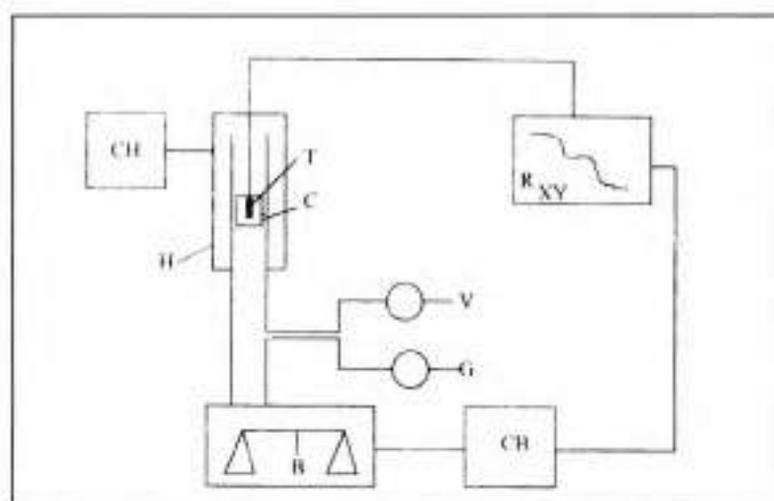


Figura II.3: Esquema descriptivo de una termobalanza

- 1) El Horno (H), de material refractario, contiene en su interior un crisol (C) en el que se coloca la muestra. El sistema calefactor eléctrico está controlado por un microprocesador (CH) que permite un incremento lineal de la temperatura de la muestra a velocidad regulable. En el interior del horno la temperatura debe ser lo más uniforme posible. El control de la temperatura se logra mediante un termopar (T) situado en un punto próximo a la muestra. En la mayor parte de los hornos se alcanzan temperaturas máximas del orden de los 1100 a 1500 °C mediante resistencias de nicrom o de platino-rodio.
- 2) Las Balanzas (B) utilizadas pueden ser de compensación o desviación. Las balanzas de compensación se basan en la aplicación continua sobre el brazo, de una fuerza restauradora mecánica o eléctrica, proporcional al peso de la muestra, que mantiene el brazo en una posición fija. Ello se consigue mediante un servo mecanismo accionado por un sistema detector que percibe pequeñas desviaciones que se registran a la posición de equilibrio. El sistema detector registra el valor de la fuerza restauradora que hay que aplicar en cada momento,

proporcional al peso de la muestra. Las balanzas de desviación, miden y registran, como en el sistema clásico, la amplitud del desplazamiento del brazo de la balanza, proporcional al peso de la muestra. Normalmente para la medida de este desplazamiento, llevan acoplado un sistema óptico digital basado en la reflexión de un rayo luminoso por el brazo de la balanza. Este método, que puede llegar a ser tan sensible o más que el anterior, presenta varias dificultades cuando quiere utilizarse para medidas al vacío o en atmósferas especiales.

- 3) El Sistema de Registro (Rxy) está conectado al termopar del horno para registrar, en abscisas, la temperatura de la muestra, y a la balanza para registrar, en ordenadas, el peso de la muestra en cada temperatura.

Entre las diversas aplicaciones de esta técnica se pueden destacar:

- Contenido de solventes (solvatos)
- Estequiometría de descomposición
- Temperatura de descomposición
- Contenido de cenizas

Cabe destacar que esta técnica es de gran utilidad cuando se la combina con la de DSC. Por ejemplo un pico endotérmico en un DSC que coincida con una meseta (sin cambio de peso) en TG presume un fenómeno de fusión.

1.2 Calorimetría Diferencial de Barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC), es un método directo y cuantitativo para la determinación de calor de transferencia y los cambios de entalpía. En esta técnica se realiza la medida de la diferencia de cantidad de calor entre una sustancia y una referencia en función de la temperatura de la muestra cuando ambas están sometidas a un programa de temperatura controlado.

El flujo de calor es siempre una medida indirecta, por esta razón existen dos sistemas reconocidos por el ICTA:

- 1) DSC por flujo de calor: en esta técnica se mide la diferencia de cantidad de calor, entre la muestra y la referencia, cuando la temperatura de la muestra aumenta o disminuye linealmente.

- 2) DSC por compensación de potencia: la muestra y el material de referencia son calentados por calefactores separados, si bien sus temperaturas se mantienen iguales mientras las temperaturas se aumentan o disminuyen linealmente.

A modo de ejemplo se describe a continuación un DSC por compensación de potencia. Desde el punto de vista instrumental es similar al DTA, como en ella la muestra se somete a una temperatura programada con gradiente determinado, pero se diferencia en que muestra y sustancia de referencia tiene resistores de calefacción independientes. Cuando los termopares de la muestra y la referencia señalan una diferencia de temperatura, se produce automáticamente una mayor calefacción en el elemento de menor temperatura (muestra o referencia) suficiente para volver a igualar ambas temperaturas.

En la figura II.4 se muestra un esquema de un instrumento multiuso de DSC.

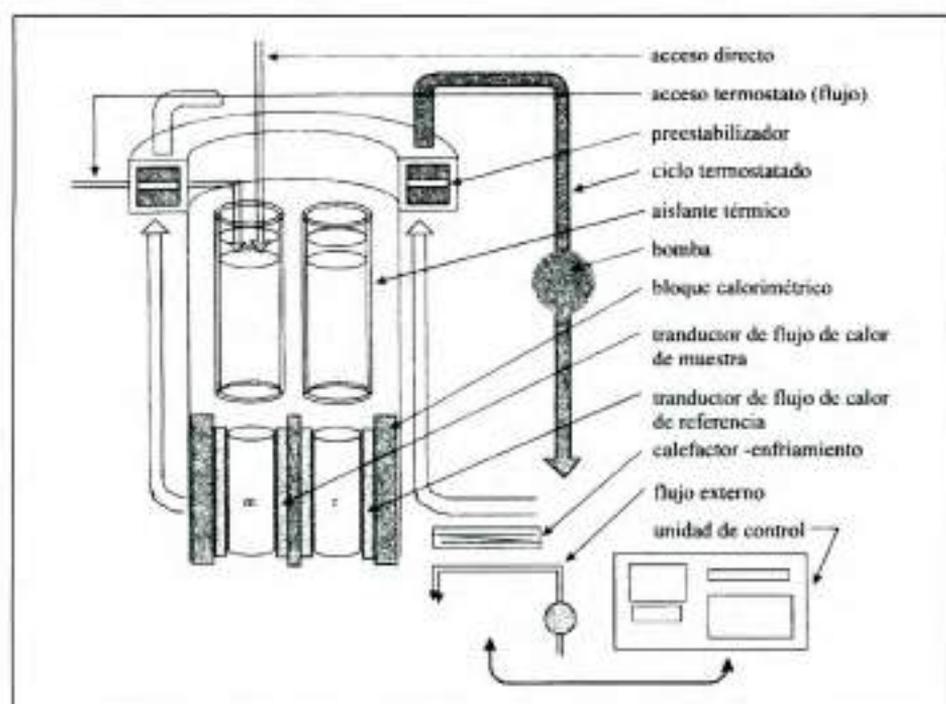


Figura II.4: Esquema de un equipo de DSC.

La unidad de control, produce un incremento lineal de la temperatura en la sustancia referencia (y por consiguiente también en la muestra). El registrador indica la potencia

eléctrica adicional que ha habido que suministrar a la muestra (positiva o negativa con respecto a la referencia) para mantener las condiciones isotérmicas, en función de la temperatura de referencia.

El termograma obtenido es similar al clásico del DTA, pero el área bajo el pico es una medida de la energía requerida por la muestra para compensar el proceso endotérmico, o por la sustancia de referencia para igualar la energía emitida por la muestra cuando se trata de un proceso exotérmico. Los errores producidos por las diferencias de conductividad térmica, capacidad calorífica, etc, carecen en este caso, de importancia.

La DSC y en definitiva los métodos térmicos diferenciales, están indicados entre otras cosas para la determinación de:

- Temperatura y calor de fusión
- Temperatura y calor de cristalización
- Temperatura y calor de descomposición u oxidación
- Compatibilidad de productos
- Capacidad calorífica
- Análisis de pureza
- Cálculo de cinéticas

Por este motivo la DSC ha alcanzado en la industria farmacéutica un desarrollo importante. En ese sentido se destacan entre otras aplicaciones, la determinación de la pureza de los principios activos o el estudio de la compatibilidad de las drogas con los excipientes de la formulación.

En el presente trabajo de tesis la DSC se utilizó principalmente para determinar las temperaturas de transición (TMC) de los Asc_n en agua.

2. Conductimetría

La medida de la capacidad de conducción de la corriente eléctrica de una solución electrolítica recibe el nombre de *conductancia* (G). Es igual a la inversa de la resistencia que opone el electrolito al paso de la corriente eléctrica.

$$G = 1/R$$

Dado que en el SI la unidad de resistencia es el ohmio (Ω), la conductancia se expresa en Ω^{-1} , unidad que recibe el nombre de *siemen* (S).

La conductancia depende directamente del número de partículas cargadas que existen en solución. Por ello, para poder comparar adecuadamente la conductancia de dos soluciones de electrolitos se debe llevar a cabo la normalización de la geometría del electrodo, de la concentración y de la carga del ión, lo que conduce a definir tres nuevas magnitudes: conductividad, conductividad molar (o conductancia molar) y conductividad equivalente.

Al igual que en los conductores de primera especie, la resistencia, R, (y por consiguiente la conductancia) de una solución de un electrolito depende tanto de la superficie transversal (área), A, de los electrodos como de la distancia (d) de separación de los mismos, ya que ambos factores determinan la cantidad de electrolito que circula por la corriente.

$$R = \rho (d/A)$$

y por lo tanto

$$G = \frac{1}{\rho} \frac{A}{d}$$

donde ρ , es la resistividad o resistencia específica del conductor.

La *Conductividad* o conductancia específica (k) de una solución de electrolitos, es la conductancia en cubo de 1cm de arista. Es la inversa de la resistividad y se mide en $S \cdot cm^{-1}$

$$K = \frac{1}{\rho} = G \frac{d}{A}$$

El cociente d/A , característico de cada celda conductimétrica, se denomina constante de celda (K_{cel}) ya que depende de sus características geométricas (área de los electrodos y distancia de separación entre ellos), de forma que se obtiene la ecuación:

$$K = G \cdot K_{cel}$$

El valor de la conductividad varía con la concentración del electrolito en la solución, por lo tanto este valor no resulta apropiado para definir la propiedad de un electrolito para conducir la corriente eléctrica. Es más conveniente para esta finalidad fijar un número de iones, respecto al cual medir el poder conductor de la solución con independencia del volumen requerido para incluir dicho número de iones. El número de iones seleccionado es el contenido en un mol o equivalente de soluto, lo que permite definir los nuevos parámetros, la conductividad molar (Λ_m) y la conductividad equivalente (Λ).

Para medir la Conductividad se emplea un instrumento denominado *conductímetro*, que consta esencialmente de un puente, donde en uno de sus brazos se monta la celda que consiste en dos electrodos entre los que se encuentra la solución cuya resistencia o conductividad se pretende medir y recibe el nombre de celda conductimétrica.

Las aplicaciones farmacéuticas de la conductividad son variadas. Como es una medida de la cantidad de iones que contiene el agua, se puede utilizar el método para inferir la pureza de la misma. Así por ejemplo, para un agua desionizada destinada a la preparación de formas farmacéuticas orales, se acepta una conductividad del orden de 10^{-5} S/cm, mientras que para formas inyectables se exigirá un agua bidestilada cuya conductividad sea como máximo del orden de 10^{-7} S/cm.

Si bien las aplicaciones más importantes en el campo farmacéutico de la conductividad son las valoraciones conductimétricas, sería innecesario describir esta situación en este trabajo de tesis.

Una aplicación importante y de directa incumbencia en este trabajo de tesis es la determinación de la CMC de sustancias tensioactivas, por encima de la cual forman agregados supramoleculares. Esto se observa en detalle en el capítulo 3, propiedades de agregación.

3. Isotermas de compresión

Es conocido que muchas moléculas anfifílicas forman capas monomoleculares en la interfase entre agua y aire. Si la molécula es poco soluble en la fase bulk, forma un film insoluble que es denominado monocapa de Langmuir.

Estas monocapas pueden formarse cuando existe un correcto balance entre la solubilidad de la cabeza del compuesto anfifílico y la naturaleza hidrofóbica de la cadena hidrocarbonada. Para sustancias como ácidos grasos, este balance puede ser alcanzado para largos de cadena de entre 12 y 30 átomos de carbono. Monocapas insolubles de fosfolípidos y ésteres simples también son relativamente fáciles de formar.

La naturaleza macroscópica de estas monocapas es esquematizada en la figura II.5. Los grupos polares están "sumergidos" en la fase subfase (agua) y las cadenas hidrocarbonadas permanecen fuera del agua.

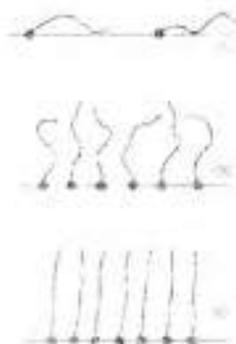


Figura II.5: Esquema de una monocapa de un compuesto anfifílico.

Para lograr la secuencia a-c se debe aumentar la densidad existente entre las moléculas y esto se logra sometiendo el sistema a una compresión (isoterma). A bajas densidades las cadenas están desordenadas y pueden con ciertas restricciones tener algunos puntos de contacto con el agua (se debe tener en cuenta que la hidrofobicidad de las cadenas no implica necesariamente interacciones repulsivas con el agua). Si la densidad de la monocapa es incrementada por compresión a temperatura constante, las cadenas comienzan a interactuar entre sí, "despegándose" de la subfase. Cuando la densidad es máxima tanto las cadenas como los grupos polares están altamente ordenados y empaquetados como en un sistema 3D observados comúnmente en sólidos.

Las complejas interacciones energéticas y factores entrópicos que participan en la formación de monocapas son similares a otros sistemas formados por agentes tensioactivos. Lo que aparece como algo nuevo aquí es la posibilidad del cambio continuo en el área por molécula del anfifilo por las interacciones que ocurren entre las cadenas y los grupos polares en la subfase cuando se aumenta la presión ejercida al sistema.

Una complicación para estos tipos de sistemas es que los anfifilos son esencialmente dipolares, por lo tanto cuando la densidad es suficientemente alta para orientar las cadenas, los dipolos moleculares son alineados y repelidos unos a otros.

Las monocapas de Langmuir pueden ser preparadas mediante la deposición de pequeñas cantidades del surfactante disuelto en un solvente volátil apropiado en una superficie perfectamente de agua perfectamente limpia.

La monocapa se forma espontáneamente cuando el solvente es sprayado sobre la superficie y el mismo se evapora.

El dispositivo (ver figura II.6) es generalmente de poca profundidad para minimizar el volumen de agua pura requerida y recubierto de un material hidrofóbico usualmente teflón (A). La monocapa es usualmente confinada a un área conocida de agua mediante una barrera hidrofóbica (B), que en un aparato simple puede ser accionada manualmente, pero en los aparatos mas sofisticados posee dispositivo que le da el movimiento deseado (C) mediante un motor (D). La fuerza horizontal que desarrolla la barrera es medida mediante un dispositivo (E). La monocapa no puede escaparse por la acción de una barrera que se encuentra en el borde del dispositivo (F).

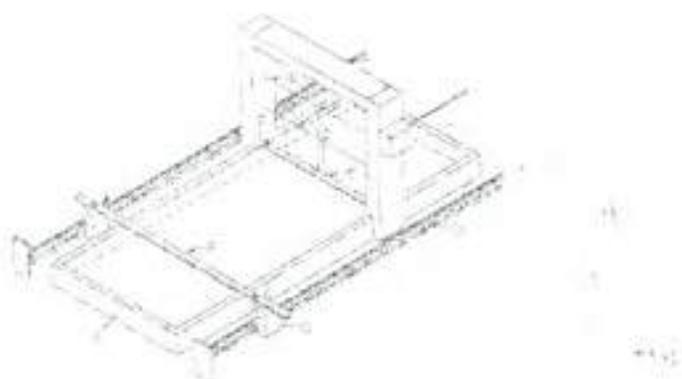


Figura II.6: Esquema de un dispositivo para la medición de isoterms de compresión.

Las aplicaciones de la monocapas de Langmuir son realmente variadas, pero de todas maneras una de las aplicaciones más importantes es la obtención de isothermas de presión de superficie vs. área de la molécula anfifílica. Esto tiene la utilidad de obtener el dato de la dimensión de la cabeza polar lo cual permite tener aproximaciones geométricas de las posibilidades de empaquetamiento que tiene una molécula anfifílica cuando se autoagrega.

Como se pudo ver en el capítulo 2, obtención de los derivados, se realizó una isoterma de compresión (monocapa) para la $Asc_{16}Na$ para establecer el parámetro crítico de empaquetamiento P_c .

4. Microscopía electrónica (ME)

El microscopio óptico ordinario solo es capaz de resolver objetos de dimensiones mayores a 10^{-7} m. Muchos virus por ejemplo tiene un tamaño mucho menor a este y numerosos detalles estructurales de las células también están por debajo de dicho límite. Para aumentar el poder de resolución, se utiliza un microscopio que utiliza longitudes de onda mucho menores que las de la luz visible. Estas exigencias se logran con el microscopio electrónico, con el que se puede alcanzar un límite de resolución que, en ciertas condiciones, llega a ser inferior al del átomo de uranio (5 \AA aproximadamente).

Si se sustituye entonces la luz visible por un haz de electrones y las lentes ópticas por lente eléctricas o magnéticas, se logra aumentar el poder de resolución.

La teoría de De Broglie considera la dualidad onda-partícula. Así como el fotón tiene asociada una onda, una partícula en movimiento (por ejemplo, un electrón) tiene también asociada una onda.

La energía de un fotón viene relacionada con la frecuencia de la radiación y esta con la longitud de onda:

$$E = h \nu = h c / \lambda$$

En condiciones adecuadas, una partícula en movimiento, como el electrón, presenta propiedades ondulatorias, experimentando difracción e interferencias.

Puesto de los haces de electrones poseen características de una onda, fue posible utilizarlos para construir microscopios.

Potenciales acelerantes de 50-60 kV son frecuentes en microscopía electrónica, siendo la longitud de onda asociada del orden de los picómetros, obviamente mucho más cortas que las de las visibles. El poder de resolución aumentará enormemente aunque no hasta los límites teóricamente previsible.

Teóricamente, la resolución de un microscopio electrónico caería dentro de unos niveles similares a las distancias existentes entre los átomos de una molécula. Sin embargo, técnicamente es difícil de lograr resoluciones superiores a 0,10 – 0,12 nm, cotas casi imposibles de lograr en muestras biológicas.

Las formas más importantes de interacción entre un haz de electrones de alta energía y la muestra a estudiar, se resume en la figura II.7.

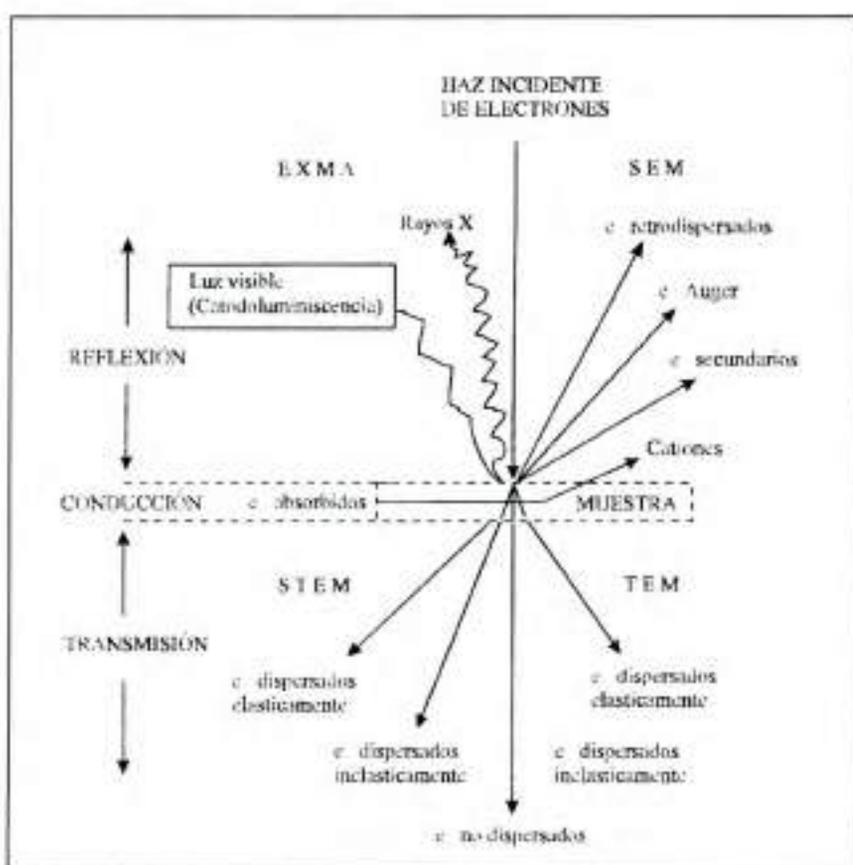


Figura II.7: Interacciones entre un haz de electrones de alta energía y la muestra a estudiar

Descendiendo al nivel atómico, estas interacciones pueden explicarse según tres factores.

- a) El electrón incidente no choca con ningún átomo de la muestra, transmitiéndose sin sufrir dispersión.
- b) El electrón choca (interacción) con el núcleo atómico. La gran diferencia de masas entre ambos hace que el electrón sea dispersado sin que haya intercambio de energía. La dispersión es, por lo tanto, de tipo elástico. El ángulo de dispersión puede ser pequeño, transmitiéndose el electrón, o muy grande, reflejándose.
- c) El electrón incidente choca con un electrón de la muestra (preparación). Al tener la misma masa, tienden a intercambiar su energía; la dispersión es inelástica, en consecuencia el electrón incidente pierde velocidad, aumentando la longitud de onda. El ángulo de dispersión es menor que en el caso anterior, y por lo tanto, todos los electrones son transmitidos.

Como se mencionó anteriormente existen "lentes de microscopía electrónica".

El haz de electrones puede ser desviado por un campo electromagnético o electrostático. Las lentes electrostáticas forman una imagen mejor que las electromagnéticas, pero tiene la desventaja de precisar de una corriente de muy alta intensidad, corriendo el peligro de que pueda establecerse un arco eléctrico en el interior de la columna, especialmente si el vacío no es bueno.

Las lentes electromagnéticas están formadas por un solenoide

Al igual que en las lentes del tipo luminicas, las lentes electrónicas presentan diferentes tipos de aberraciones. La aberración que en mayor grado afecta el poder de resolución es el astigmatismo. Esto puede corregirse hasta niveles óptimos gracias a un sistema de piezas electrostáticas y electromagnéticas (o en ocasiones mecánicas), que en conjunto constituyen el astigmador. Tanto en la lente objetivo como en la ocular existe al menos un astigmador.

Por último se podría destacar que las lentes van acompañadas de diafragmas. El diafragma corrige en gran medida las aberraciones, pero reduce el poder de resolución.

Existen diferentes tipos de microscopios electrónicos que pueden ser clasificados en tres categorías:

- a) *Microscopios electrónicos de formación de imágenes estigmáticas (imágenes de Gauss)*. Como en los microscopios convencionales, la imagen esta formada por lentes electrónicas. Las leyes clásicas de la óptica se aplican a la onda de electrones. Estos microscopios funcionan generalmente por transmisión.
- b) *Microscopios electrónicos de barrido (SEM)*. La imagen se forma de manera secuencial por tratamiento de las informaciones suministradas, al interaccionar un haz de electrones que barre el objeto. Estos microscopios forman parte de la imagen por reflexión o por transmisión, pero sobre todo por emisión secundaria. En este último tipo la imagen puede ser formada no solamente por los electrones emitidos sino por los secundarios, rayos X, infrarrojos, iones y hasta ondas sonoras.
- c) *Microscopios de efecto "túnel"*. Es el de más reciente desarrollo. La imagen se forma por la corriente térmica que se forma entre la muestra y un punto muy fino, una sonda a escala atómica explora el potencial de la nube electrónica que envuelven la superficie de los sólidos y que suministra una topografía de la superficie.

Las muestras destinadas a la ME deben ser muy delgadas, debido a la capacidad de la materia de dispersar los electrones; dependiendo de las resoluciones a conseguir el espesor de las muestras han de variar. Para una resolución de 10 nm el espesor debe ser como máximo de 0,1 micrómetro y de 5 a 10 nm de espesor si se quiere tener resoluciones de 1 nm.

El **microscopio electrónico de barrido (SEM)** es el utilizado en este trabajo de tesis. La diferencia entre el SEM y el microscopio de transmisión es que en el primero la imagen no se forma en el lente objetivo. La técnica de formación es similar a la utilizada en televisión con formación de imágenes secuenciales.

De esta manera se pueden obtener en este tipo de equipos, fotografías donde se puede evaluar la topografía de los sistemas.

Por lo tanto es el apropiado para determinar estructuras de sistemas supramoleculares como aquellas que se forman con los Asc_n.

5. Difracción de Rayos X

Los rayos X constituyen un pequeño intervalo de frecuencias del espectro general de radiaciones electromagnéticas, que se confunde con los rayos ultravioletas en la zona de frecuencias más bajas, y con los rayos γ en la zona de más alta frecuencia. En este sentido puede asignarse a los rayos X longitudes de onda comprendidas entre 0,1 y 100 Å. Los rayos X con longitudes de onda más cortas reciben el nombre de *duros*, mientras que los de longitudes de onda más larga se denominan *blandos*, con estos nombres se diferencian las radiaciones que son menos o más fácilmente absorbidas por la materia respectivamente.

Los aspectos corpuscular y ondulatorio de la radiación se manifiestan muy diferenciadamente en los diversos fenómenos que presentan los rayos X.

Algunos minerales radiactivos y ciertos radioisótopos emiten espontáneamente rayos X; esta emisión constituye un fenómeno secundario provocado por la liberación de partículas α , β o de radiación γ , durante el proceso de desintegración radiactiva. Por otra parte, la propia radiación X procedente de un emisor *primario*, puede excitar a su vez la radiación X de un emisor *secundario* (muestra), denominándose esta última *radiación de fluorescencia*.

Como fuente de radiación primaria pueden emplearse isótopos, pero este procedimiento está bastante limitado. La fuente más usual para la obtención de rayos X es un tubo de rayos X o tubo Coolidge.

Este tubo de rayos X tipo Coolidge está básicamente constituido por una ampolla de vidrio en la que se ha hecho un vacío elevado, que contiene un filamento, que hace de cátodo, y un ánodo metálico enfrentado al mismo. Si entre el filamento y el ánodo también llamado placa anticátodo, se aplica una diferencia de potencial de algunas decenas de miles de voltios, los electrones emitidos por el filamento, previamente puesto incandescente mediante una corriente eléctrica, son fuertemente acelerados hacia el anticátodo produciéndose la colisión los rayos X, merced a la perturbación que se produce en el estado energético de los átomos de material bombardeado. Estos rayos X se emiten en todas direcciones, pero solo se permite su salida al exterior a través de

una o más ventanas, constituidas por un material muy transparente a la radiación (generalmente berilio).

El fenómeno de la absorción de los rayos X por la materia es de una cierta complejidad, ya que al mismo tiempo contribuyen no solo la naturaleza del absorbente (o sea, su composición atómica), sino también la energía o longitud de onda de la radiación sobre el mismo. Suponiendo una radiación monocromática, la atenuación de su intensidad al atravesar el absorbente es proporcional al espesor del mismo, b , cumpliendo una ley análoga a la ley de Beer que rige los procesos de absorción de la radiación electromagnética. En este caso, la ley adopta la expresión:

$$I = I_0 e^{-\mu b}$$

donde I es la intensidad de la radiación transmitida, I_0 la de la radiación incidente y μ una constante proporcionalidad llamada *coeficiente de absorción lineal*. La utilización de este coeficiente presenta dificultades en la práctica. Como su magnitud está determinada por la cantidad de materia atravesada (o por el número de átomos), es más conveniente expresarlo en función de la densidad (ρ) del absorbente.

El nuevo coeficiente, $\mu_0 = \mu/\rho$, se denomina *coeficiente de absorción másico* ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$). Contrariamente al coeficiente de absorción lineal, μ_0 es una magnitud atómica, posibilitando la comparación de las propiedades absorbentes de las sustancias en función del contenido de los átomos de las mismas.

Los rayos X, por tener longitudes de onda del mismo orden de magnitud que las distancias interatómicas de las redes cristalinas, experimentan procesos de difracción en los cristales. El fenómeno de la difracción es esencialmente un proceso de dispersión de las radiaciones electromagnéticas por un conjunto de átomos dispuestos regularmente en el espacio, como ocurre en un cristal. Los rayos dispersados por cada átomo se refuerzan en determinadas direcciones del espacio, produciéndose interferencias constructivas de ondas, en cuyo caso se dice que las ondas están en fase, es decir, sus amplitudes en un punto cualquiera de la dirección de propagación tiene la misma dirección, originándose una onda resultante reforzada, cuya amplitud es la suma de las amplitudes parciales de cada componente.

El tratamiento teórico de la difracción de rayos X es un proceso bastante complejo y extenso. La ley de Bragg, sin embargo, sintetiza de una forma muy simple toda la geometría de la difracción, considerando el fenómeno como una reflexión óptica de los rayos X en las familias de los planos paralelos equidistantes del cristal.

Entre las múltiples aplicaciones de la difracción de rayos X, deben distinguirse dos de singular relevancia: la identificación y el análisis cuantitativo de fases cristalinas y la determinación de estructuras cristalinas.

Cualquier especie cristalina produce siempre un diagrama de difracción característico y, si la muestra está constituida por una mezcla de diferentes especies, el diagrama correspondiente manifestará la suma de efectos de difracción de cada una de ellas. El difractograma puede ser considerado por lo tanto, como la "huella dactilar" de la fase cristalina que lo ha producido, pudiéndose usar para su inequívoca identificación. La característica más interesante de este método de análisis deriva del hecho de que la información que proporciona se refiere en exclusiva a la fase cristalina íntegramente considerada, independientemente de los elementos que la integran. Así por ejemplo, si la fórmula de la sustancia es A_xB_y , el diagrama será representativo de la fase A_xB_y como tal identidad estructural, mientras que el análisis químico solo pondría de manifiesto la existencia de los constituyentes elementales $xA + yB$. Si la sustancia en cuestión existe en dos o más variedades alotrópicas, los diagramas de difracción serán diferentes en cada una de ellas. Tal es el caso, por ejemplo, de la determinación de las distintas variedades del SiO_2 , CO_3Ca , C, TiO_2 .

Específicamente en este trabajo de tesis se utilizó la técnica para determinar las estructuras presentes en los cristales líquidos que conforman los coageles de los Asc_n .

6. Determinaciones de Solubilidad y Solubilización

En el presente trabajo de tesis uno de los datos más importantes colectados fue la determinación de solubilidad de diversas entidades químicas. En un plano más concreto se determinó también la cantidad solubilizada en sistemas micelares.

Por lo tanto en esta sección se hará hincapié al menos en algunos aspectos relacionados a la manera de obtener e interpretar los datos de solubilidad.

En primeras instancias uno podría verse tentado en decir que las de terminaciones de solubilidad no revisten mayores complicaciones para llevarse a cabo. Esto es porque básicamente la medición de la solubilidad puede dividirse en tres etapas:

- a) Preparación de una solución saturada del soluto a medir en el solvente adecuado (agua o una solución por ejemplo de Asc_n)
- b) Separación generalmente por filtración del exceso de soluto.
- c) Utilización de alguna técnica analítica para determinar la concentración del soluto.

Cada una de estas etapas debe ser realizada cuidadosamente y determinar para cada compuesto a analizar las variantes de la técnica que sean necesarias.

Por ejemplo, en la preparación de las soluciones saturadas se debe extremar la precaución de que periódicamente el sistema sea homogeneizado, además se debe determinar para cada soluto y solvente el punto final donde se alcanza un equilibrio de solubilidad y por lo tanto se pase al siguiente paso que es eliminar el exceso de sólido.

En la mayoría de los casos esta recomendada la filtración con un filtro apropiado, salvo en aquellas determinaciones donde la diferencia de temperatura entre la solución saturada y el sistema de filtrado pueda arrojar resultados erróneos. En estos casos se puede echar mano a la centrifugación. **En el caso de los Asc_n las técnicas fueron evaluadas por separado arrojando resultados muy similares por lo que se optó por la centrifugación ya que de esta manera se evitaron problemas con la formación del coagel dentro del filtro.**

Por último la espectroscopia UV-Vis utilizada para cada compuesto, fue puesta a punto en cada caso, teniendo como principal inconveniente la interferencia analítica que en algunos casos aportaban las soluciones de Asc_n por la absorción característica del ácido ascórbico a 265 nm del espectro.

Otro punto muy importante a tener en cuenta en este anexo es que cuando el solvente en el cual se determina la solubilidad no es agua, sino una solución micelar (o cualquier otro agregado supramolecular) estamos hablando entonces de una **solubilización** y el resultado por cierto se convierte en la **solubilidad aparente** (S_a) de la droga en ese sistema.

Por lo tanto así como es normal expresar la solubilidad acuosa o en algún otro solvente puro en términos como: moles/l, g/l o partes relativas, para el proceso de solubilización la interpretación no parece ser tan sencilla.

Una de las posibilidades más atractivas parece ser presentar los resultados como una relación del tipo coeficiente de partición entre un solvente orgánico (centro de la micela) y el agua en el medio circundante. Por lo tanto se trata a la micela como una pseudofase en donde se particiona o no la droga seleccionada. Se puede establecer esta relación de la siguiente manera:

$$P = X_{micela} / X_{fase\ bulk}$$

Donde X_{micela} representa la fracción molar de soluto solubilizado en la micela y $X_{fase\ bulk}$ es la fracción molar del soluto en la fase bulk extramicelar (también llamada fase monomérica)

Otra alternativa es expresar la solubilización siguiendo la ley de acción de masas, y relacionar el fenómeno con la constante de equilibrio para una "reacción":

$$K_s = \frac{[\text{soluto en la micela}]}{[\text{surfactante en forma de micela}] [\text{soluto en la fase bulk}]}$$

donde los corchetes indican la concentración molar medida en cada caso.

7. Tensión superficial

La tensión interfacial es una medida de la energía cohesiva de un líquido.

Esto es el exceso de energía libre en la interfase de contacto entre dos líquidos. Cuando uno de los fluidos es un gas la tensión se denomina tensión superficial y cuando los dos son líquidos se denomina tensión interfacial.

Esto es expresado en unidades de miliNewtons/metro (mN/m) o bien dynas/cm.

La tensión superficial es una medida de la energía cohesiva presente en una interfase.

Las moléculas de un líquido se atraen unas a otras.

Las interacciones de las moléculas en la fase bulk de un líquido se encuentran balanceadas por fuerzas atractivas en todas las direcciones. Salvo las moléculas de la

superficie en donde las fuerzas están desbalanceadas como se ve en la figura II.8 que se observa abajo.

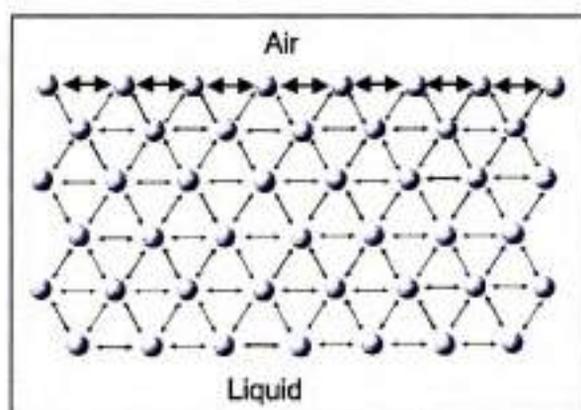


Figura II.8: Interacciones de moléculas en una interfase agua-aire

El efecto de red que ofrece esta situación arroja como resultado un exceso de energía libre en la superficie. Este exceso es llamado energía libre de superficie y puede ser cuantificado mediante la medición de la relación energía/área. Líquidos polares, como el agua, tienen fuertes interacciones intermoleculares y por lo tanto altas tensiones superficiales.

De todos modos existen algunos factores que pueden hacer disminuir esa tensión superficial elevada. Por ejemplo el aumento de la temperatura puede hacer decrecer la tensión superficial. También los agentes tensioactivos (como lo indica su nombre) pueden hacer disminuir considerablemente este factor.

La medición de la tensión superficial es realizada mediante el uso de un **tensiómetro**. Este equipo fundamenta la medida en la interacción de un sensor con la superficie a medir. Básicamente se coloca sobre la superficie y se mide la fuerza necesaria para despegar el dispositivo. El tensiómetro dispone de una balanza la cual determinará cual fue la fuerza necesaria para lograr el despegue del sensor y el equipo extrapolará este valor al de tensión superficial. De todas maneras es importante destacar que las fuerzas medidas por la balanza dependen de los siguientes factores: forma y tamaño del sensor,

ángulo de contacto entre el sólido (sensor) y el líquido, y la tensión superficial del líquido. El tamaño y la forma del sensor son fácilmente controlables. El ángulo de contacto debe tender a cero (completo mojado del sensor), por lo tanto se usan sensores contruidos de materiales con una alta energía de superficie, como el platino o el iridio que aseguran un completo mojado del sensor y una fácil y reproducible limpieza. La interpretación matemática de los datos de fuerza obtenidos dependen del tamaño y la forma del sensor. Existen dos sistemas para este fin: el anillo de DuNouy y el plato de Wilhelmy. En este trabajo de tesis se utilizó el primero de ellos construido íntegramente de platino. En esta metodología el anillo se sumerge en el líquido susceptible a la medición y posteriormente es levantado el sistema hasta llegar a la superficie, lográndose un menisco. Posteriormente se comienza a elevar el sensor hasta logra medir el máximo de fuerza necesario para vencer este menisco siguiendo la secuencia que se observa en la figura II.9 y descriptos abajo.

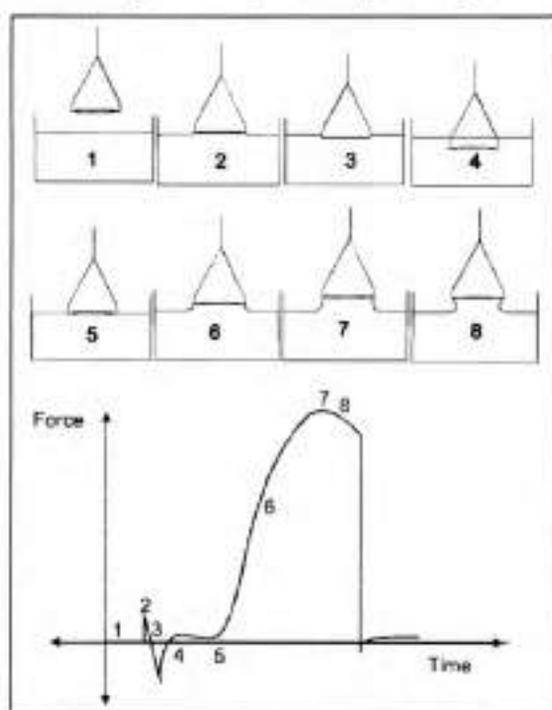


Figura II.9. Secuencia de eventos que suceden en la determinación de la tensión superficial.

- 1) El anillo se encuentra por encima de la superficie por lo que la fuerza es cero.

2) El anillo es colocado sobre la superficie registrándose una fuerza positiva por la interacción del sensor con la superficie.

3) El anillo es forzado a penetrar el líquido por lo que se puede registrar una fuerza negativa en este punto.

4) Se registra una pequeña fuerza positiva debido a que el anillo se encuentra sumergido.

5) Se comienza a levantar el sensor y se determina un aumento de la fuerza

6) La fuerza aumenta hasta...

7) que la fuerza máxima es alcanzada.

8) Después de determinar el máximo se registra una pequeña disminución antes de que el sistema colapse y el sensor se levante de la superficie. Este fenómeno es aprovechado por el aparato para determinar máximos sucesivos pasando del punto 8 al 6 y del 6 al 8 hasta conseguir un resultado reproducible sin levantar el sensor.

En la presente tesis se utilizó esta metodología para determinar la concentración micelar crítica (CMC), ver capítulo 3, propiedades de agregación.

8. PDB

La potenciometría diferencial de barrido (PDB) es una técnica desarrollada en nuestro grupo de trabajo que se basa en la medición del área delimitada por la curva de un gráfico ΔpH vs. V_{MOH} donde el ΔpH se define como la diferencia de pH entre una corrida de referencia R (ácido fuerte AH - base fuerte MOH) y corrida problema P a la que se le agrega una pequeña cantidad de una muestra S (ácido o base) antes de titular (AH + S + MOH).

Debe destacarse que en esta técnica, un sustrato con grupos básicos origina un área positiva A^+ , mientras que los grupos ácidos originan un área negativa A^- .

El hecho de que la PDB produzca áreas como respuesta en lugar de puntos de inflexión, le confiere algunas ventajas frente a la potenciometría ácido-base convencional, principalmente en aquellas situaciones donde los puntos de inflexión son total o parcialmente enmascarados. La comparación frente a la potenciometría convencional muestra una mayor sensibilidad tanto en lo que respecta a la concentración como a la fuerza ácido-base de la muestra a determinar. La automatización le confiere a la PDB la

reproducibilidad necesaria para convertirla en una técnica analítica atractiva. Esto se logra acoplando una bureta automática, a un pHmetro y a una computadora.

La técnica de PDB se aplicó para determinaciones de concentraciones y estimaciones de pKa. En el campo del análisis farmacéutico se aplicó a la determinación de muestras de diferentes condiciones analíticas tales como: control de identidad y/o pureza química de drogas puras, control de estabilidad, sales de ácido débil – base débil, determinación de especies poco solubles y en el análisis de formulaciones. Por otra parte se extendió la aplicación a la determinación de macromoléculas tales como ρ - globulina, albúmina y carboximetilcelulosa sódica, con el objeto de explorar posible aplicaciones en otras áreas relacionadas.

En el presente trabajo de tesis se utilizó la metodología de la PDB para estudiar el comportamiento ácido-base de la sal sódica del palmitato de ascorbilo ($Asc_{16}Na$). Por un lado se utilizó para determinar si tenía un comportamiento como sal de un ácido débil y por otro lado comprobar que el sólido obtenido no tenía como impurezas restos ácidos provenientes de la obtención a partir de Asc_{16} .

Bibliografía utilizada en el presente anexo

Valls O y Del Castillo B, (1998). **Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud**. 4ta Edición. Piro Ed. Barcelona. España.

Luna ED, (1989). **Potenciometría Diferencial de Barrido**. Tesis Doctoral, *Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, UNC.*

Gelbart WM, Ben-Shaul and Roux D. (1994). **Micelles, Membranes, Microemulsions, and Monolayers**. Springer, Eds. San José. USA.

BibliografíaA

Allen LV, Levinson RS, Robinson C, and Lau A. (1981). **Effect of Surfactant on Tetracycline Absorption Across Everted Rat Intestine.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 70 (3): 269-271

Ashcroft, DM., Wan Po L and Griffiths CE. (2000). **Therapeutic Strategies for Psoriasis.** *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 25:1-10.

Austria R, Semenzato A, and Bettero A. (1997). **Stability of Vitamin C Derivatives in Solutions and Topical Formulations.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 15: 795-801

B

Baba, H., Takemura, T. (1968). **Spectrophotometric Investigations of the Tautomeric Reaction Between Anthrone and Anthranol.** *Tetrahedron* 24:4779-91

Banker GS and Rhodes CT. (1990). **Modern Pharmaceutics.** 2nd Ed., Marcel Dekker Ed., New York

Barry BW. (1974). **Rheology of Pharmaceuticals and Cosmetic Semisolids.** In, Bean HS, Beckett HA and Carless JE, editors. *Advances in Pharmaceutical Sciences*, Vol. 4, Academic Press Ed., New York, pp1.

Becher P. (1967). **In Nonionic Surfactants,** Schick MJ Ed, Marcel Dekker, New York, chapter 5.

Berkò S, Regdon G, Ducza E, Falkay G and Eròs I. (2002). **In Vitro and In Vivo Study in Rats of rectal Suppositories Containing Furosemide.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 53: 311-315

Breimer DD. (1998). **Future challenges for drug delivery research.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 33: 265-268.

Bunkin NF, Kiseleva OA, Lobeyev AV, Movchan TG, Ninham BW, Vinogradova, OI (1997). **Effect of Salts and Dissolved Gas on Optical Cavitation near Hydrophobic and Hydrophilic.** *Langmuir* 13 (11): 3024-3028

Bunkin NF, Kochergin AV, Lobeyev AV, Ninham BW, Vinogradova OI. (1996). **Existence of charged submicrobubble clusters in polar liquids as revealed by correlation between optical cavitation and electrical conductivity.** *Colloids & Surfaces A*, 110: 207-212.

C

Capuzzi G, Kulkarni K, Fernandez J, Vincieri J, and Lo Nostro P. (1997). **Mixture of ascorbyl-stearate and vitamin D₃: a monolayer study at the gas-water interface.** *Journal of Colloid and Interface Sciences.* 186: 271-279

Capuzzi G, Lo Nostro P, Kulkarni K, Fernandez J, and Vincieri J. (1996)^b. **Interactions of 6-O-stearoylascorbic acid and vitamin K₁ in mixed langmuir films at the gas-water interface.** *Langmuir* 12 (22): 5413-5418.

Capuzzi G, Lo Nostro P, Kulkarni K, Fernandez J. (1996)^b. **Mixtures of Stearoyl-6-O-ascorbic Acid and α -Tocopherol: A Monolayer Study at the Gas/Water Interface.** *Langmuir*, 12, 3957-3961.

Cassin G, de Costa C, Van Duynhoven JPM, and Agterol Wgm. (1998). **Investigation of the Gel to Coagel Phase Transition in Monoglyceride-water Systems.** *Langmuir* 14: 5757-5763.

Castedo A, Del Castillo JL, Suarez-Fillooy MJ and Rodriguez JR (1997). **Effect of Temperature on the Mixed Micellar Tetradecyltrimethylammonium Bromide – Butanol System.** *Journal of Colloid and Interface Science* 196: 148-156

Chowhan ZT, and Pritchard R. (1978). **Effect of Surfactants on Percutaneous Absorption of Naproxen I: Comparisons of Rabbit, Rat, and Human Excised Skin.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 67 (9): 1272-1274

Christian SD and Scamehorn JF. (1995). **Solubilization in Surfactant Aggregates.** Marcel Dekker, Inc. New York. USA.

Clint J editor. (1992). Blackie and Son Ltd.Ed.. **Surfactant Aggregation**, London, pp: 147.

Collet JH, Koo I. (1975). **Interaction of Substituted Benzoic Acid with Polysorbate 20 Micelles.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64, 1253.

Correia AN, Gouveia ST, Araújo EF, De Lima Nieto EF, and Belmino-Romero EF. (1995). **Determination of the Critical Micelle Concentration in Aqueous Medium Using Different Techniques.** *Annals Assoc. Bras. Quim.* 44(2), 9-14

Craig VS, Ninham BW, and Pashley RM. (1993). **The Effect of Electrolytes on Bubble Coalescence in Water.** *Journal of Physical Chemistry* 97 (39): 10192-10196.

D

David SS. (1974). **Is pharmaceutical rheology dead?.** *Pharm. Acta Helv.* 49(5-6), 161-168.

Dawson JE, Hajratwala BR, and Taylor H. (1977). **Kinetics of Indomethacin Degradation II: Presence of Alkali plus Surfactant.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 66 (9): 1259-1263

De Boer AG, and Breimer DD. (1997). **Hepatic First-pass Effect and Controlled Drug Delivery Following Rectal Administration.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 28: 229-237

E

Elworthy PH and Lipscomb FJ. (1968). **The Effect of some Non-ionic Surfactants and a Polyoxyethylene Glycol on the Dissolution Rate of Griseofulvin.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 20: 923-93.

Elworthy PH, Florence AT, MacFarlane CB. (1968). in **Solubilization by Surface-Active-Agents**, Chapman & Hall Eds., London.

F

Farkas E, Zelkò R, Németh Z, Palinkàs J, Marton S and Ràcz I. (2000). **The Effect of Liquid Crystalline Structure on Chlorhexidine Diacetate Release.** *International journal of Pharmaceutics* 193: 239-245.

Federman, D. G., Froelich, C. W., Kirsner, R. S. (1999). **Topical Psoriasis Therapy.** *American Family Physician* 59:957-67.

Forland GM, Samseth J, Gjerde MI, Hoiland H, Jensen AO, and Mortensen K. (1998). **Influence of Alcohol on the Behavior of Sodium Dodecylsulfate Micelles.** *Journal of Colloid and Interface Science* 203: 328-334

Funke AP, Schiller R, Motzkus HW, Günther C, Müller RH, and Lipp R. (2002) **Transdermal Delivery of Highly Lipophilic Drugs: In Vitro Fluxes of Antiestrogens, Permeation Enhancers, and solvents from Liquid Formulations.** *Pharmaceutical Research* 19(5): 661-668

G

Gelbart WM, Ben-Shaul and Roux D. (1994). **Micelles, Membranes, Microemulsions, and Monolayers.** Springer, Eds. San José. USA.

Gibaldi M, and Feldman S. (1970). **Mechanisms of Surfactant Effects on Drugs Absorption.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 59 (5): 579-589

Goon P, Manohar C and Kumar VV (1997). **Determination of Critical Micelle Concentration of Anionic Surfactants: Comparison of Internal and external Fluorescent Probes.** *Journal of Colloid and Interface Science* 189: 177-180

H

Hiemenz PC. (1986). **Principles of Colloids and Surface Chemistry**, 2nd Edition, Dekker, New York, USA.

Hirata H, Ohira A, and Limura N (1996). **Measurements of the Krafft Point of Surfactant Molecular Complexes: Insights into the Intricacies of "solubilization"**. *Langmuir* 12 (25): 6044-6052

Hirata H, Yagi Y, and Limura N. (1995). **Solution Behavior of Crystalline Surfactant Molecular Complexes: Electric Conductivity Measurements of Aqueous Solutions of Molecular Complexes Between Cationic Surfactant and Aromatic Additive Systems**. *Journal of Colloid and Interface Science* 173: 151-158

Hirata H. (1997). **Several Topics Concerning the Surfactant Molecular Complex Formation: the Important Clues to Reconsideration to the Theory of Solubilization and some Applications**. *Current Topics in Colloids and Interface Sciences* 2: 1-35.

I

Israelachvili JN, Mitchell DJ, Ninham BW. (1976). **Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers**. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions. (2)* 72, 1525-1568.

K

Kaneshina S and Yamanaka M. (1989). **A Differential Scanning Calorimetric Study of the Thermotropic Phase Behavior of Surfactant assemblies in Water**. *Journal of Colloid and Interface Science* 131: 493-497

Kaneshina S, Kamaya H, and Ueda I. (1981). **Transfer of Anesthetics and Alcohols into Ionic Surfactant Micelles in Relation to Depression of Krafft Point and Critical Micelle Concentration, and Interfacial Action of Anesthetics**. *Journal of Colloid and Interface Science* 83: 589-597

Kaneshina S. (1989). **Thermotropic and Pressure-Induced Phase Behavior in a Dodecylammonium Bromide-Water System**. *Langmuir* 5: 1383-1387

Kawaguchi T, Hasegawa T, Kazuhiko J, and Seki T. (1991). **Rectal Absorption of Zidovudine**. *International journal of Pharmaceutics* 77: 71-74

Kodama M, and Seki S. (1991). **Thermodynamical Investigations on Phase Transitions of Surfactant-water Systems: Thermodynamic Stability of Coagel and Coagel Phases and the Role of Water Molecules in the Appearance**. *Advances in Colloid and Interface Science* 35: 1-30

Kodama M, Kuwabara M, and Seki S. (1981). **Thermal Study on the Interaction of Crystalline Surfactant with Water: the Dioctadecyldimethylammonium Chloride-water System.** *Thermochimica Acta* 50: 81-91

Köhler U, Yang PW, Weng S, and Mantsch HH. (1988). **Structure and Polymorphic Phase Behavior of Ascorbyl Palmitate in Water.** *Canadian Journal of Spectroscopy* 33 (5) 122-127.

Kono K. (2001). **Thermosensitive Polymer-modified Liposomes.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 53: 307-319.

Krafft P. (1899). "Titulo desconocido". Ber. Deutsch. Chem. Gessel., 32.

L

La Mesa C (1990). **Dependence of Critical Micelle Concentration on Intensive Variables: a Reduced Variables Analysis.** *Journal of Physical Chemistry* 94, 323.

Lebwohl M, and Ali S. (2001). **Treatment of Psoriasis. Part 1. Topical Therapy and Phototherapy.** *Journal of American Academy of Dermatology* 45 (4): 487-498

Lee J and Kellaway IW. (2000). **In Vitro Peptide Release from Liquid Crystalline Buccal delivery Systems.** *International journal of Pharmaceutics* 195: 29-33

Lee J, and Kellaway IW. (2000). **Combined Effect of Oleic Acid and Polyethylene Glycol 200 on Buccal Permeation of (D-Ala, D-Leu) Enkephalin from a Cubic Phase of Glyceryl Monooleate.** *International journal of Pharmaceutics* 204: 137-144.

Leontidis E. (2002). **Hofmeister Anion Effects on Surfactant Self-assembly and the Formation of Mesoporous Solids.** *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 7, 81-91.

Lieberman HA, Rieger MM and Banker GS. (1996). **Pharmaceutical Dosage Forms. Disperse Systems, Volume 1.** Marcel Dekker, inc. New York. EEUU.

Lim JK and Chen CC (1974). **Effect of Selected Surfactants, above and below the CMC, on Aspirin Solubility.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 63 (4): 559-562.

Lo Nostro P, Lopes JR, Ninham B, and Baglioni P. (2001). **Effect of Cations and Anions on the formation of Polypseudorotaxanes.** *Journal of Physical Chemistry* 102 (21): 1234-1240.

Lo Nostro P, Ninham B, Fratoni L, Palma S, Manzo R, Allemandi D, and Baglioni P. (2003). **Effect of Water Structure on the Formation of Coagels from Ascorbyl-Alkanoates** *Langmuir* 19, 3222-3228.

Lo Nostro, P (1997). **Supramolecular Aggregates from Vitamin C Derivatives: Structure and Properties**. Internet Journal of Science-Biological Chemistry, <http://www.netsci-journal.com/97v4/index.htm>.

M

Mahrle, G. (1997). **Dithranol**. *Clinics in Dermatology* 15: 723-37

Mantsch HH, Kartha VB, and Cameron DG. (1984). **Surfactants in Solutions**. Mittal and Lindman Eds, vol 1 pp 673, New York, USA.

Manzo R and Luna E. (1886). **Differential Scanning Potentiometry**. *Analytical Chemistry*, 58, 1055-1057.

Martin AN editor (1993). **Physical Pharmacy: Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences**, fourth ed., Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 415.

Matsuki M, Ichikawa R, Kaneshina S, kamaya H and Ueda I. (1996). **Differential Scanning Calorimetric Study on the Krafft Phenomenon of Local Anesthetics**. *Journal of Colloids and Interface sciences*. 181 (2): 362-369.

Matsuki M, Maruyama S and Kaneshina S. (1995). **Effect of pressure on the colloidal solution behavior of aqueous local anesthetic tetracaine solutions**. *Colloids and Surfaces A* 97: 21-26.

Matzuki H, Ichikawa R, Kaneshina S, Kamaya H and Ueda I. (1996). **Differential Scanning Calorimetric Study on the Krafft Phenomenon of Local Anesthetics**. *Journal of Colloid and Interface Science* 181: 362-369

Mittal KL (1972). **Determination of CMC of polysorbate 20 in Aqueous Solution by Surface Tension Method**. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 61 (8): 1334-1335

Miyazaki S, Yokouchi C, Nakamura T, Hashiguchi N, Hou W and Takada M (1986). **Pluronic F-127 as a Novel Vehicle for Rectal administration of Indomethacin**. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 34 (4): 1801-1808.

Mueller-Goymann CC, Hamann HJ. (1993). **Sustained Release from Reverse Micellar Solutions by Phase Transformations into Lamellar Liquid Crystals**. *Journal of Controlled Release* 23: 165-174

Muga A, and Casal HL. (1990). **Water Penetration and Phase Behavior of Surfactant Gel Phases and Lipid Bilayers**. *Journal of Physical Chemistry* 94 (18): 7266-7271.

Mulley BA. (1964). in **Advances in Pharmaceutical Sciences**, Academic Press, New York, volumen 1, pp 87-194.

Myers D. (1992). **Surfactant Science and Technology**. VHC Publishers, Inc. New York, EEUU

N

Nakagawa T. (1967). in **Nonionic Surfactants**, Shick MJ, Dekker Eds., New York.

Nesseem D. (2001). **Formulation and Evaluation of Itraconazole Via Liquid Crystal for Topical Delivery System**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 26: 387-399.

Nibu Y and Inoue T. (1998). **Phase behavior of Aqueous Mixtures of Some Polyethylene Glycol Decyl Ethers Revealed by DSC and FT-IR Measurements**. *Journal of Colloid and Interface Science* 205: 305-315

Nibu Y and Inoue T. (1998). **Solid-Liquid Phase Behavior of Binary Mixture of Tetraethylene Glycol Decyl Ether and Water**. *Journal of Colloid and Interface Science* 205: 231-240

Nibu Y, Suoemori T, and Inoue T. (1997). **Phase Behavior of Mixture of Heptaethylene Glycol Decyl Ether and Water: Formation of Phase Compound in Solid Phase**. *Journal of Colloid and Interface Science* 191: 256-263

Nishikido N, Kobayashi H, and Tanaka M. (1982). **Pressure Effect on the Krafft Point of Ionic Surfactants**. *The Journal of Physical Chemistry* 86, 3170-3173.

O

Ober SS, Vincent HC, Simon DE, and Frederick KJ. (1958). **A rheological study of Procaine Penicillin G Depot Preparation**. *American Chemical Society* 18 (9), 667-676.

P

Palma S, Manzo R, Allemandi D, Fratoni L and LoNostro P (2002)^a **Solubilization of hydrophobic drugs in Octanoyl-6-O-Ascorbic Acid micellar dispersions**. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 91 (8) 1810-1816.

Palma S, LoNostro P, Manzo R and Allemandi D (2002)^b **Evaluation of surfactant properties of ascorbyl palmitate sodium salt**. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 16 (1) 37-43.

Palma S, Manzo R, Allemandi D, Fratoni L and LoNostro P (2002)^c **Coagels from Ascorbic Acid Derivatives**. *Langmuir* 18, 9219-9224

Palma S, Manzo R, and Allemandi D. (2002)^d. **Potencial Utilización de Esteres del Acido ascórbico como Surfactantes en Sistemas Portadores de Drogas.** *IX Congreso Argentino de Farmacia y Bioquímica Industrial. Buenos Aires.*

Palma S, Manzo R, Allemandi D, Fratoni L and LoNostro P (2003). **Drugs Solubilization in Ascorbyl-Decanoate Micellar Solutions** *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 212: 163-173.

Peltonen LJ and Yliruusi J (2000). **Surface Pressure, Hysteresis, Interfacial Tension, and CMC of Four Sorbitan Monoesters at Water-Air, Water-Hexane, and Hexane-Air Interfaces.** *Journal of Colloid and Interface Science* 227: 1-6

Perillo M, Yu RK and Maggio B. (1994). **Modulation of Activity of *Clostridium perfringens*.** *Biochim. Biophys. Acta* 1193, 155-164.

Piret J, Désormeaux A, Cormier H, Lamontagne J, Gourde P, Juhász J, and Bergeron MG. (2000). **Sodium Lauril Sulfate Increase the Efficacy of a Topical Formulation of Foscarnet Against Herpes Simplex Virus Type 1 Cutaneous Lesions in Mice.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (9): 2263-2270

Pisárcik M, Imae T, Devinsky F, Lacko I, and Bakos D. (2000). **Aggregation Properties of Sodium Hyaluronate with Alkanediyl- α,ω -bis(dimethylammonium Bromide) Surfactants in Aqueous Sodium Chloride Solution.** *Journal of Colloid and Interface Science* 228: 207-212

Prins, M. (2002). **Dithranol in Psoriasis Day-Care. The short contact principle.** PhD-Thesis- University Medical Center Nijmegen, Netherlands.

Prins M, Swinkels OQJ, Bouwhuis S, de Gast MJ, Bouwman-Boer Y, Van der Valk PGM, and Van de Kerkhof PCM. (2000). **Dithranol in a Cream Preparation: Disperse or Dissolve?.** *Skin Pharmacology* 13: 273-279

Prins M, Swinkels OQJ, Van de Kerkhof PCM, and Van der Valk PGM. (2001). **The Impact of the Frequency of Short Contact Dithranol Treatment.** *European Journal of Dermatology* 11: 214-218

R

Reddy RK, Khalil SA, and Gouda MW. (1976). **Effect of Dioctyl Sodium Sulfosuccinate and Poloxamer 188 on Dissolution and Intestinal Absorption of Sulfadiazine and Sulfisoxazole in Rats.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 65 (1): 115-118

Reynolds JEF, Martindale W (1989). **The Extra Pharmacopoeia**, 29th ed., The Pharmaceutical Press, London.

S

- Sapper H, Cameron DG, and Mantsch HH. (1981). **The Thermotropic Phase Behavior of Ascorbyl Palmitate: an Infrared Spectroscopic Study.** *Canadian Journal of Chemistry* 59: 2543-2549.
- Satake H, Matzuki H, Kaneshina S (1993). **Colloidal Properties of Aqueous Local Anesthetic Tetracaine Solutions.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 71: 135-140
- Sayam AS, Khalil E, Ibrahim H, and Freij I. (2002). **Formulation of an Oral Dosage Form Utilizing the Properties of Cubic Liquid Crystalline Phases of Glycerol Monooleate.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 53: 343-352
- Schick MJ (1962). **Surface Films of nonionic detergents: 1. Surface Tension study.** *Journal of colloidal Sciences* 17: 801.
- Schneeweis A and Muller-Goymann CC. (1997). **In Vivo and In Vitro Diclofenac Sodium Evaluation After Rectal Application of Soft Gelatine Capsules Enabling Application Induced Transformation (AIT) into a Semisolid System of Cystals (SSLC) for Controlled Release.** *Pharmaceutical Research* 14 (12): 1726-1729
- Schott H (1969). **Surface and Micellar Properties of a Long-chain Nonionic Surfactant.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 58 (12): 1521-1524
- Schott H (1984) **Solubility Parameter and Hydrophilic – Lipophilic Balance of Nonionic Surfactants.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 73 (6): 790-792
- Schott H, Kwan LC, and Felman S (1982). **The Role of Surfactants in the Release of Very Slightly Soluble Drugs from Tablets.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 71 (9): 1038-1045
- Schott H. (1995). Rheology in Gennaro AN, editor. **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**, Volume 1, Nineteenth ed., Mack Publishing Company Ed., Easton, pp. 292.
- Shah VP, Behl CR, Flynn GL, Higuchi WI and Schaefer H. (1992). **Principles and Criteria in the Development and Optimization of Topical Therapeutic Products.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 81 (10): 1051-1054
- Smith GG, Kennedy DR, and Nairn G (1974). **Hydrolysis Kinetics of Benzocaine and Homologs in the Presence of a Nonionic Surfactant.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 63 (5): 712-716
- Swarbrick, J., Siverly, J.R. (1992)^a **The Influence of Liquid Crystalline Phases on Drug Percutaneous Absorption I. Development of a Vehicle.** *Pharm. Res.* 9:1546-9.

Swarbrick, J., Siverly, J.R. (1992)^b **The Influence of Liquid Crystalline Phases on Drug Percutaneous Absorption II. Permeation Studies Through Excised Human Skin.** *Pharm. Res.* 12:1550-5.

T

Thakkar A, and Kuehn PB (1969). **Solubilization of Some Steroids in Aqueous Solutions of a Steroidal Nonionic Surfactant.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 58 (7): 850-852

Tomazyc V, Tuzek-Bozic A, Visnjevac B, Kojic-Prodic and Filipovic-Vincekovic. (2000). **Physicochemical Properties of Dodecylammonium Picrate.** *Journal of Colloids and Interface Science.* 227, 427-436.

Tsuchiya M, Tsujii D, Maki K, and Tanaka T. (1994). **Statistical Mechanical Theory of the Coagel-gel Phase Transition in Ionic Surfactant/Water Systems.** *Journal of Physical Chemistry* 98 (24): 6187-6194.

Tsujii K and Mino J. (1978). **Krafft Point Depression of some Zwitterionic Surfactant by Inorganic Salts.** *The Journal of Physical Chemistry.* 82 (14) 1610-1614

Tsuji A, Miyamoto E, Matsuda M, Nishimura K, and Yamana T. (1982). **Effects of Surfactants on the Aqueous Stability and Solubility of β -Lactam Antibiotics.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 71 (12): 1313-1318

V

Van Hal DA, Bouwstra JA, Van Rensen A, Jeremiasse E, De Vringer T and Junginger HE. (1996). **Preparation and Characterization of Nonionic Surfactant Vesicles.** *Journal of Colloid and Interface Science* 178: 263-273

Verluis P and Van de Pas JC(1997). **Microstructure and rheology of lamellar liquid crystalline phases.** *Lagmuir* 13, 5732-5738.

Vinogradova, O.I.; Bunkin, N.F.; Churaev, N.V.; Kiseleva, O.A.; Lobeyev, A.V.; Ninham, B.W (1995). **Submicrocavity Structure of Water between Hydrophobic and Hydrophilic Walls as Revealed by Optical Cavitation.** *Journal of Colloids and Interface Sciences.* 173: 443-447

Volonte MG, Marano CG y Reinoso MI (1989). **Determinación de la Concentración Micelar Crítica (CMC) de Sales Biliares por el Método de Tensión Superficial.** *Acta Farmacéutica Bonaerense* 8 (1): 31-35

W

Wade A and Weller PJ. (1994). **Handbook of Pharmaceutical Excipients.** 2th Ed. American Pharmaceutical Association, Washington, USA.

Wahlgren S, Lindstrom AL, and Friberg SE. (1984). **Liquid Crystals as a Potential Ointment Vehicle.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 73 (10): 1084-1086.

Wan LSC and Lee FS (1974). **CMC of Polysorbates.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 63 (1): 136-137

Whitefield, M. (1981). **Pharmaceutical Formulations of Anthralin.** *Br. J. Dermatol.* 105:28-32.

Y

Yang L, Chu JS, and Fix JA. (2002). **Colon-specific Drug Delivery: New Approaches and In Vitro/In Vivo Evaluation.** *International journal of Pharmaceutics* 235: 1-15

Yu BG, Okano T, Kataoka K, and Kwon G. (1998). **Polymeric Micelles for Drug Delivery: Solubilization and Haemolytic Activity of Amphotericin B.** *Journal of Controlled Release* 53: 131-136