



Encapsulación de moléculas pequeñas mediante la precipitación salina de poliuretanos catiónicos

Borja Fernández-d'Arlas[†], María-Ángeles Corcuera, Arantxa Eceiza*

Grupo "Materiales + Tecnologías" (GMT), Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente, Escuela Politécnica. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Pza. Europa 1, 20018 Donostia-San Sebastián, España

[†]borja.fernandezdarlas@ehu.es; bortx_bidegain@hotmail.com; *arantxa.eceiza@ehu.es

Recibido: 10/08/2014

Revisado: 06/10/2014

Aceptado: 14/10/2014

Resumen

En este trabajo se estudia un copolímero de poliuretano catiónico (PU) con alta proporción de uretano como agente encapsulante de fármacos modelos (FM) mediante la encapsulación inducida por precipitación salina del PU y FM a $\text{pH} < \text{pI}$ del PU. Mediante espectroscopia UV-Vis se ha estimado el porcentaje de encapsulación de varios FMs proponiéndose un modelo semi-empírico para determinar la distribución observada en las eficiencias de encapsulación, E , en función de su volumen molar y carga. Se han estimado los parámetros del modelo mediante la linealización de los datos experimentales de E en función de la densidad de carga del FM (z/V_{mol}) y se ha comparado el modelo con los datos experimentales. El modelo, aunque con algunas desviaciones, describe la tendencia general de E en función del volumen molar y la carga del FM. Se ha confirmado la encapsulación de fluoresceína mediante microscopia de epifluorescencia y se ha determinado su cinética de liberación en función del tiempo y pH.

Palabras clave: Encapsulación de fármacos; liberación controlada de fármacos; poliuretanos catiónicos

Abstract

In this work a high urethane rich cationic polyurethane (PU) copolymer is studied as encapsulating agent of model drugs (FM) by salting-out the PU into a high ionic strength solution at a $\text{pH} < \text{pI}$ of the cationic PU. The encapsulating efficiency, E , for different FMs was studied by UV-Vis spectroscopy and a semi-empirical model is proposed to predict the observed efficiency distributions as function of FM molar volume and charge. The model parameters were determined by linearization of the model E as function of FM charge density (z/V_{mol}) and by the linear fit of the experimental E vs. z/V_{mol} . Although with some deviations the model describes the general tendency of E as function of molar volume and charge of the FM. The encapsulation of fluorescein has been confirmed by epifluorescence microscopy and its release kinetics as function of time and pH has been determined.

Keywords: Cationic polyurethanes; controlled drug release; drugs encapsulation

El desarrollo de sistemas especializados de transporte y liberación de fármacos puede ser una alternativa para el tratamiento de algunas enfermedades mediante el suministro sostenido en el tiempo de principios activos. De esta manera el encapsulado de fármacos en micro o nanopartículas es considerado actualmente un método prometedor para su vehiculización, vectorización y liberación controlada en tejidos específicos que sufran de alguna patología en particular^{1,2} aunque también puede ser interesante en otros campos como el de la industria alimentaria, perfumes, fertilizantes o tintes^{3,4}.

El estudio de nuevos polímeros capaces de encapsular eficientemente distintos fármacos mediante tecnologías sencillas puede suponer un avance importante para la producción a menor coste de medicamentos con capacidad de liberación vectorizada y sostenida⁵. Entre los

polímeros sintéticos, los poliuretanos (PU) son atractivos para aplicaciones biomédicas debido a la posibilidad de desarrollar formulaciones biocompatibles⁶ o estructuras macromoleculares que traten de mimetizar el comportamiento de las proteínas⁷. A su vez, la coacervación es un método que se basa en la separación de fases inducida por la incompatibilidad química de un polímero y un no-solvente particular^{4,8}. La precipitación salina es un método habitual empleado en la separación de proteínas^{9,10} y ha sido empleada recientemente para la obtención de partículas de fibroína de seda de gusano de tamaños variados y en su posterior empleo como sistemas de liberación controlada¹¹.

En este trabajo presentamos los resultados del análisis de la encapsulación inducida por una alta fuerza iónica (precipitación salina) de distintos fármacos modelos (FM) en un nuevo poliuretano catiónico. La eficiencia de

encapsulación de distintos FMs con distinta carga y volumen molar, así como la liberación de fluoresceína a pH = 1 y 7, se ha determinado mediante espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis), técnica que permite la cuantificación de concentraciones moleculares en cantidades inferiores al $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ con precisiones de $< 1\%$ ¹². Otras técnicas empleadas en la caracterización han sido la cromatografía de exclusión por tamaños y microscopía de epifluorescencia. Este trabajo presenta además un modelo semi-empírico para predecir la eficiencia de encapsulación observada para diversos FMs con diferente carga y volumen molar.

Parte experimental

Materiales

Para la síntesis del poliuretano se ha empleado 1,4-butanodiol (BD, Sigma-Aldrich, Madrid, España), N-metildietanol amina (MDEA, Sigma-Aldrich, Madrid, España) y 1,6-hexametilen diisocianato (HDI, Bayer, Leverkusen, Alemania).

Se han analizado como fármacos modelo moléculas que al pH de trabajo (pH = 1) presenten bien carga positiva, neutra o negativa. Los FMs con carga neutra han sido el ácido salicílico (Ác. Sal.⁰, Scharlau, Sentmenat, España), ácido ferúlico (A. F.⁰, Fluka, Stenheim, Alemania), ácido *p*-cumárico (Ác. *p* Cum.⁰, Fluka, Stenheim, Alemania), ácido sirínquico (Ác. Sir.⁰, Fluka, Stenheim, Alemania) y la fluoresceína (Flu.⁰), sintetizada a partir de resorcinol (Fluka,

Stenheim, Alemania) y anhídrido ftálico (Panreac, Barcelona, España)^{13,14}. Como FMs con carga negativa se han empleado el azul de hidroxinaftol (A³⁻, Merck, Darmstadt, Alemania), el negro de eriocromo-T (N¹⁻, Fluka, Buchs, Alemania) y el ácido *p*-toluensulfónico (Ác. *p*.Sulf.⁻, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Como FM con carga positiva se han empleado la rodamina B (R_B¹⁺, Aldrich), rojo de metilo (R_m¹⁺, Panreac, Barcelona, España), naranja de metilo (N_m¹⁺, Daesder, Barcelona, España), violeta cristal (V_c²⁺, Panreac, Barcelona, España), azul de metileno (A_m²⁺, Panreac, Barcelona, España). El NaCl ha sido suministrado por Panreac (Barcelona, España).

Síntesis del poliuretano cuaternizable

La síntesis del poliuretano cuaternizable se ha llevado a cabo en masa en un reactor de 5 bocas, tal y como se ha descrito anteriormente⁷. Brevemente, se introduce el BD y el HDI en un reactor introducido en un baño de hielo a 0 °C. A continuación se ha adicionado el MDEA poco a poco y, tras la homogenización, el reactor se ha retirado del baño alcanzándose entonces temperaturas superiores a 50 °C. El PU ha sido sintetizado con un estequiometría BD:MDEA:HDI de 2:3:5. La reacción se ha llevado a cabo durante 40 min, tras lo cual la mezcla se ha vertido en un molde metálico recubierto de film de vidrio y politetrafluoroetileno adhesivo (PTFE, Poliflúor S.L, Altuna, España) y se ha curado en prensa (Santec, Delhi, India) a 100 °C y 50 bar durante 10 h. La figura 1a muestra el esquema general de la estructura del PU obtenido.

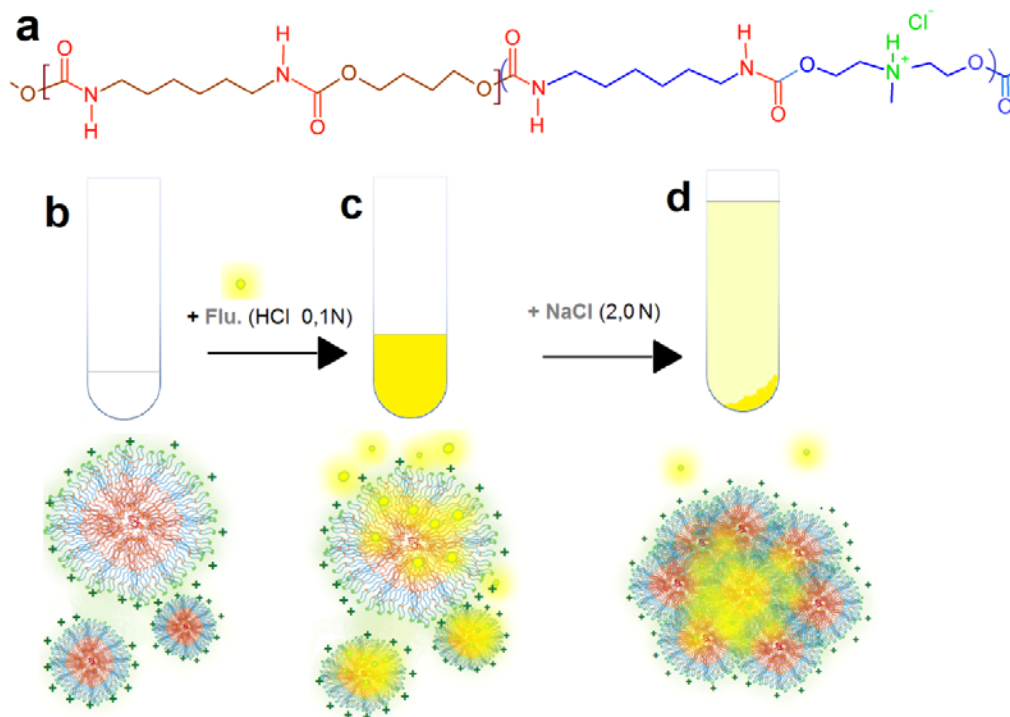


Figura 1: Estructura y precipitación salina del PU. a) Estructura molecular del poliuretano catiónico estudiado. b) Dispersión y esquema de la estructura micelar del PU en HCl 0,1 N. c) Adición de fármaco modelo (ej.: fluoresceína). d) Precipitación salina (inducida por NaCl) del PU y encapsulación del fármaco modelo.

Caracterización de poliuretano

El peso molecular del PU sintetizado se ha determinado a 40 °C mediante cromatografía de exclusión de tamaños (HPSEC Jasco, Japón) usando patrones de poliestireno monodisperso (266-70.000 g·mol⁻¹, Sigma-Aldrich) como referencia, dimetilformamida + 0,1 % masa LiBr como eluyente y un detector de índice de refracción (RI-2031 Plus). Los poliuretanos también han sido caracterizados mediante espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (Nikolet-Nexus, Madison, EE.UU) y calorimetría diferencial de barrido (Mettler-Toledo DSC822e, Schwerzenbach, Suiza).

El punto isoeléctrico del PU (que coincide con su pK_a) ha sido determinado mediante valoración potenciométrica (Crison GLP22, Alella, España), partiendo de pH ácido (Panreac, HCl 0,1 N) y midiendo el pH tras la adición de pequeños volúmenes de NaOH (Panreac, 0,05 N). El tamaño micelar de las dispersiones de 1 % masa PU en HCl 0,1 N y tras la precipitación salina ha sido analizado mediante dispersión dinámica de luz (Brookhaven BI9000AT, Nueva York, EE.UU).

Dispersión del poliuretano en HCl 0,1 N

El PU ha sido dispersado en HCl 0,1 N (Panreac). En estas condiciones todos los grupos amino del MDEA se encuentran cuaternizados y cargados positivamente (R₃NH⁺). Para los ensayos de encapsulación se ha preparado una dispersión al 2 % masa en HCl 0,1 N con el PU con fracción molar de MDEA de 0,6.

Incubación del PU con los fármacos modelo

Se han tomado 0,75 mL de disolución de PU 2 % masa en HCl 0,1 N y se ha mezclado con 0,75 mL de una disolución 0,57 mM de distintos FM en HCl 0,1 N y las mezclas se han incubado durante al menos 5 min a temperatura ambiente. De esta manera la relación molar entre PU y los fármaco modelo ha sido de aproximadamente 1 ([PU]/[FM] ≈ 1). A pH = 1, los FM presentan distinta carga neta debido a sus distintos equilibrios ácido-base. Las estructuras de los FMs y su carga neta se describen más adelante y se muestran en la tabla 1.

Precipitación salina y encapsulación de fármacos modelo

Se han tomado 0,3 mL de la disolución previamente preparada y se han añadido a un tubo de centrifuga de 1,5 mL relleno con 0,7 mL de NaCl 2,0 N. La coacervación del PU es prácticamente instantánea. Las muestras se han mantenido en frigorífico a 5 °C durante al menos 10 min previamente a su centrifugación (Selecta Meditronic BL-S, Barcelona, España) durante 15 min a 10000 rpm. Los ensayos se han llevado a cabo por triplicado y además se ha realizado un blanco sin PU. El proceso de incubación y encapsulación mediante precipitación salina se representa en la figura 1 para el caso de la fluoresceína.

Liberación sostenida de fluoresceína

Los ensayos de liberación de fluoresceína se han llevado a cabo empleando partículas preparadas mediante la precipitación salina descrita en el apartado anterior. El sobrenadante se ha descartado y las partículas se han lavado con 0,5 mL de H₂O desionizada, y recogido mediante centrifugación durante 5 min a 10000 rpm. Con una micropipeta se ha retirado 0,3 mL del sobrenadante y las partículas se han mantenido en el frigorífico durante 12 h previamente a la adición de 0,8 mL de solución ácida de pH = 1 ([HCl] = 0,1 N; [NaCl] = 70 mM; [KCl] = 1,7 mM) y tampón de pH = 7,4 ([KH₂PO₄] = 1,8 mM; [Na₂HPO₄] = 10 mM; [NaCl] = 137 mM; [KCl] = 2,7 mM). En ambos casos la fuerza iónica del sistema ha sido de ~170 mM, considerada como isotónica respecto a condiciones fisiológicas. Tras la adición del tampón las muestras se han incubado en un agitador orbital (IKA KS4000i control, Staufen, Alemania) a 37 °C y 120 rpm. A distintos tiempos las suspensiones han sido enfriadas a 5 °C durante al menos 10 min, centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 min, y extraído 0,8 mL del sobrenadante para su análisis mediante UV-Vis (Shimadzu UV3600, Japón). El volumen total se ha restablecido mediante la adición de 0,8 mL de nuevo tampón. El porcentaje cumulativo de liberación se ha obtenido a partir de la comparación de los valores de absorbancia obtenidos a cada tiempo con los de un blanco preparado con la cantidad de fluoresceína encapsulada dispersada en 1 mL de disolución. Los ensayos se han realizado por triplicado.

Determinación de la eficiencia de encapsulación y liberación mediante UV-Vis.

La eficiencia de encapsulación, *E* (%), se ha determinado midiendo las absorbancias de los sobrenadantes tras la precipitación salina, *A_f*, y comparándola con las obtenidas con un blanco preparado sin PU, *A_o*, mediante la siguiente relación:

$$E(\%) = 100(A_o - A_f)/A_o \quad (1)$$

La absorbancia ha sido tomada en los valores de longitud de onda mostrados en la Tabla 1. Como referencia en el espectrofotómetro en todos los casos se ha empleado una muestra de HCl 0,03 N.

La liberación de la fluoresceína se ha monitorizado tomando los valores de absorbancia del sobrenadante a distintos tiempos. El valor cumulativo liberado a cada tiempo se ha calculado teniendo en cuenta que en cada tiempo de muestreo únicamente se extraía 0,8 mL, dejando por lo tanto 0,2 mL en el vial. De esta manera el porcentaje liberado a un tiempo *t_n* se ha estimado como:

$$\sum_0^{t_n} \text{Lib}(\%) = \frac{0,8(A_1 + A_2 + \dots + A_{n-1}) + A_n}{A_{T\text{ot}}} 100 \quad (2)$$

donde A_n es la absorbancia del sobrenadante a un tiempo t_n y A_{Tot} la absorbancia correspondiente a la cantidad de fluoresceína encapsulada dispersada en 1 mL de tampón.

Resultados y discusión

La síntesis de este poliuretano se ha llevado satisfactoriamente y las propiedades físicas y mecánicas de este material han sido discutidas en otra publicación⁷. También se ha determinado que debido a la baja masa molecular de la unidad semiflexible de MDEA el material se encuentra altamente asociado por puentes de hidrógeno. El nitrógeno terciario de las unidades MDEA se protona en medio ácido quedándose el copolímero parcialmente cargado con cargas positivas¹⁵. Es por ello que, como se ha determinado en este trabajo, estos copolímeros con una fracción molar de MDEA de 0,6 respecto a BD, son dispersables en medio acuosos ácidos. Mediante dispersión dinámica de luz se ha determinado que el diámetro efectivo micelar de dispersiones

al 1 % masa de PU en HCl 0,1 N es de 60 ± 8 nm. Se ha observado que el tamaño micelar medido inmediatamente tras la diálisis frente a H_2O hasta pH = 6-7 es el mismo que a pH = 1, pero con el tiempo comienzan a aparecer agregados de mayor tamaño debido a la pérdida parcial de carga superficial como consecuencia de la desprotonación parcial del nitrógeno terciario por el pH del medio, cercano a su pK_a . Por ello, en este trabajo la incubación con fármacos modelo se ha llevado a cabo a pH = 1.

Mediante dispersión de luz dinámica se ha observado que tras la precipitación salina el tamaño micelar medio aumenta hasta 250 ± 50 nm. Esto puede relacionarse con la estabilización termodinámica surgida para balancear las interacciones hidro-lipofílicas entre macromoleculares y el medio, estabilizando las partículas micelares en estructuras secundarias de mayor tamaño, tal y como se ha descrito para el caso de la precipitación salina de la proteína de la seda de gusano¹¹.

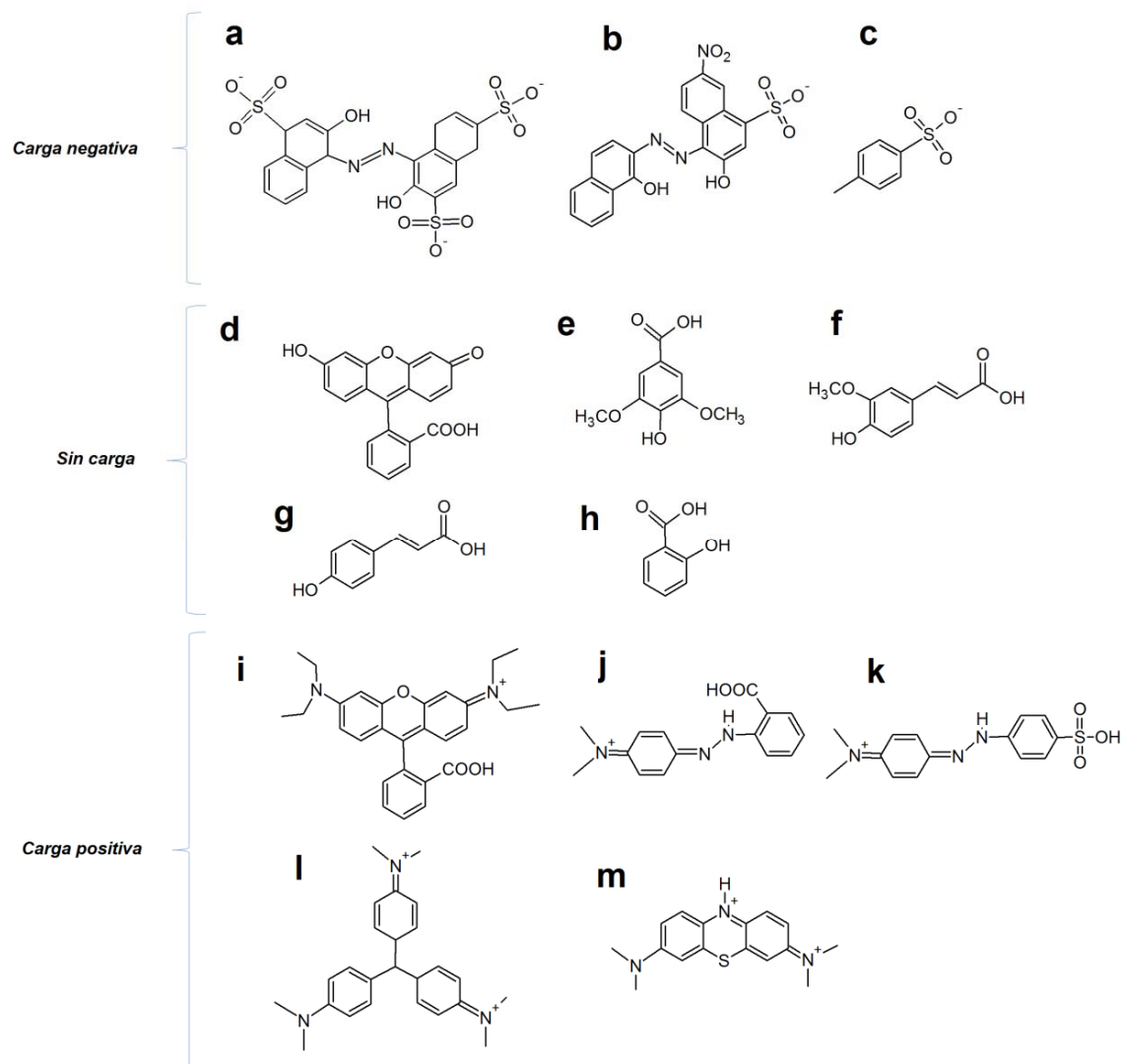


Figura 2: Fármacos modelo estudiados y su carga en las condiciones de pH estudiadas. a) Azul de hidroxinaftol, b) Negro de eriocromo-T, c) Ácido-*p*-toluensulfónico, d) Fluoresceína, e) Ácido siríngico, f) Ácido ferúlico, g) Ácido cumárico, h) Ácido salicílico, i) Rodamina B, j) Rojo de metilo, k) Naranja de metilo, l) Violeta cristal, m) Azul de metileno.

En la figura 1 se esquematiza el proceso seguido para la encapsulación inducida por precipitación salina, que se ha estudiado en las mismas condiciones, para las moléculas mostradas en la figura 2. La figura 2 muestra las moléculas en el estado iónico en que se encuentran mayoritariamente a $\text{pH} = 1$ ¹⁶⁻¹⁹. Para este estudio se han analizado distintas moléculas con la misma carga pero con distinto volumen molar para determinar cuál es la influencia tanto de la carga como del volumen molar. A $\text{pH} = 1$ los grupos ácido sulfónico ($-\text{SO}_3\text{H}$) se encuentran ionizados debido a que el $\text{p}K_a$ del ácido sulfónico es de $-2,8$ ²⁰. Los ácidos carboxílicos ($-\text{COOH}$) son más débiles, el ácido salicílico presenta un $\text{p}K_a \sim 3$ ²¹ y el ácido ferúlico, el ácido *p*-cumárico, el ácido sirínquico y la fluoresceína presentan un $\text{p}K_a > 4$ ²². La fluoresceína se protona en valores de pH inferiores a $\text{pH} = 2$ y, debido a que durante la precipitación salina el pH asciende como consecuencia de la dilución y el $\text{p}K_a$ desciende como consecuencia del aumento de la fuerza iónica^{23,24}, se ha considerado que aproximadamente la mayor parte de la fluoresceína no está cargada en el momento de la precipitación salina.

La figura 3a presenta dos viales de centrifugación del sistema con fluoresceína tras la precipitación salina y centrifugación, sin y con PU, bajo luz ultravioleta. Se aprecia visualmente que tras la precipitación parte de la fluoresceína se concentra en el precipitado, mientras que en el sobrenadante la coloración debido a la presencia de fluoresceína disminuye. Esta disminución de la concentración de fluoresceína tras la precipitación ha sido cuantificada mediante UV-Vis (figura 3b) empleando la ecuación (1) para determinar la cantidad de fluoresceína encapsulada. Las partículas con fluoresceína encapsulada han sido lavadas con agua, y una pequeña cantidad se ha redispersado en agua y depositado en un portamuestras de vidrio para ser observadas en el microscopio de epifluorescencia. La fluoresceína presenta un decaimiento muy rápido de la fluorescencia¹⁷ por lo que las imágenes de la figura 3c,d han sido tomadas inmediatamente tras el enfoque. En ellas se aprecia que la fluoresceína aparece concentrada en glóbulos de tamaño micro o submicro-métrico lo cual se puede asociar a la encapsulación de la fluoresceína en partículas poliméricas.

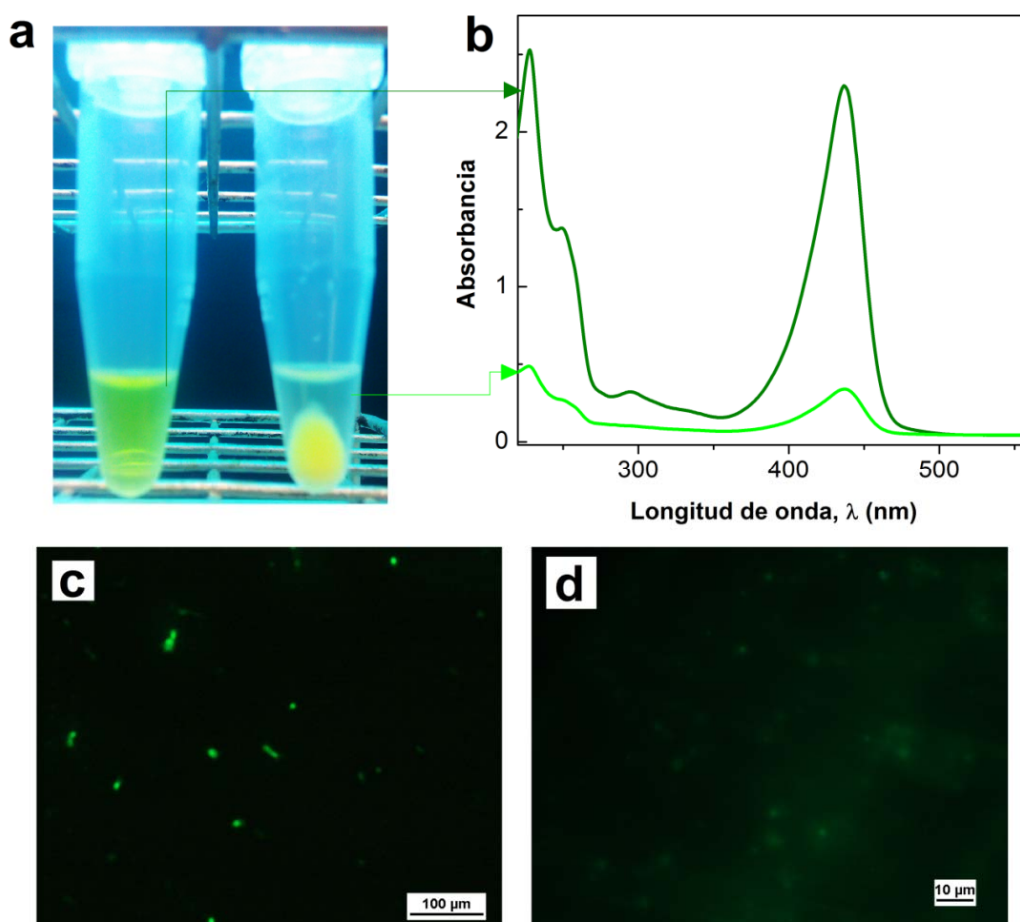


Figura 3: Encapsulación de la fluoresceína. a) Viales con fluoresceína en disolución salina sin PU y con PU, tras la precipitación salina y centrifugación. b) Espectro UV-Vis del blanco de fluoresceína y del sobrenadante obtenido tras la precipitación salina. c) Micrografía de epifluorescencia a $\times 10$ aumentos de partículas de PU con fluoresceína. d) Micrografía de la misma muestra que en (c) pero a $\times 50$ aumentos.

Se han realizado medidas de eficiencia de encapsulación con distintas moléculas disueltas en HCl 0,1 N a la misma concentración de 0,57 mM e incubadas en una relación 1:1 con disoluciones al 2 % masa de PU. Los valores de eficiencia de encapsulación, E (%), se muestran en la tabla 1.

Se observa que, salvo algunas excepciones, la eficiencia de encapsulación tiende a aumentar con el volumen molar del FM. A su vez se observa que, en líneas generales, la eficiencia también depende de la carga del FM siendo mayor cuanto más negativa es la carga del FM (máxima encapsulación con el azul de hidroxinaftol) y menor cuanto más positiva es la carga. Otros autores han observado la alta capacidad de algunos polímeros como el quitosano de interaccionar con colorantes cargados negativamente retirándolos del medio acuoso donde se encuentran disueltos, debido a interacciones electrostáticas surgidas a consecuencia del intercambio iónico²⁵. En este caso, algunos sistemas con carga positiva y con alto volumen molar, tales como la rodamina B, presentan valores de E (%) relativamente altos, lo cual puede asociarse a la encapsulación favorecida por su elevado volumen molar. Estos resultados sugieren que el volumen molar puede contrarrestar parcialmente el efecto de la repulsión electrostática entre el $PU^{(+)}$ y el FM cargado positivamente. Este fenómeno es similar al de la difusión molecular a través de una membrana semipermeable, que

es proporcional a una exponencial inversa dependiente del volumen. A su vez la probabilidad de encontrar un ión cargado en las proximidades de otro ión viene dada por una relación exponencial función de la carga²⁶. Todo ello conlleva a proponer una ecuación que prediga la eficiencia en función de un coeficiente de difusión, dependiente del volumen molar, y otro coeficiente electrostático, dependiente de la carga neta del FM:

$$E(\%) = 100 - \beta(n)^{-V_{mol}} e^{\alpha z} \quad (3)$$

Donde β es un coeficiente de proporcionalidad, n un factor de eficiencia dependiente del volumen molar del FM en la encapsulación, V_{mol} es el volumen molar del FM, α es un coeficiente de proporcionalidad que dependerá de la temperatura, de la fuerza iónica y de la constante dieléctrica del medio, y z es la carga del FM. Para $z = 0$ la ecuación (3) se puede expresar de la siguiente manera:

$$\ln[100 - E(\%)] = \ln\beta - V_{mol}\ln(n) \quad (4)$$

La figura 4a muestra el ajuste a la ecuación (4) de los datos de $\ln[100 - E(\%)]$ frente al volumen molar estimado empleando el programa ChemSketch-ACS, para las moléculas no cargadas en las condiciones de precipitación salina. De la ordenada en el origen se ha determinado el coeficiente $\beta = 634$, mientras que de la pendiente se ha determinado el valor de $n = 1,017$. Por otro lado, para $z \neq 0$,

Tabla 1: Propiedades de los fármacos modelo estudiados. Fórmula molecular, peso molar del ion, volumen molecular, carga neta del ión al pH estudiado, longitud de onda empleada y eficiencias de encapsulación para los fármacos modelo estudiados.

Fármaco modelo	Fórmula	M_m , ion ($g \cdot mol^{-1}$)	V_{mol} ($cm^3 \cdot mol^{-1}$)	Carga (q/e)	$\lambda_{análisis}$ (nm)	Eficiencia encapsulación (%)
Azul de hidroxinaftol	$C_{20}H_{11}N_2S_3O_{11}Na_3$	551,5	297 ± 7	-3	537	98 ± 1
Negro de eriocromo T	$C_{20}H_{12}N_3O_7SNa$	438,4	267 ± 7	-1	331	91 ± 5
Ácido <i>p</i> -toluenosulfónico	$C_7H_8SO_3$	171,2	128 ± 3	-1	255	4 ± 1
Fluoresceína	$C_{20}H_{12}O_5$	332,3	216 ± 5	0	473	87 ± 1
<i>p</i> -Ácido cumárico	$C_9H_8O_3$	164,2	123 ± 3	0	308	38 ± 1
Ácido salicílico	$C_7H_6O_3$	138,1	100 ± 3	0	280	5 ± 1
Ácido ferúlico	$C_{10}H_{10}O_4$	194,2	147 ± 3	0	320	34 ± 1
Ácido síringuico	$C_9H_{10}O_5$	198,2	148 ± 3	0	273	16 ± 2
Naranja de metilo	$C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$	305,3	237 ± 7	0	504	3 ± 1
Rodamina B	$C_{28}H_{31}ClN_2O_3$	444,0	365 ± 5	+1	490	86 ± 1
Rojo de metilo	$C_{15}H_{15}N_3O_2$	270,3	230 ± 7	+1	517	4 ± 1
Violeta cristal	$C_{25}H_{30}N_3Cl$	373,5	342 ± 5	+2	630	2 ± 1
Azul de metileno	$C_{16}H_{18}N_3ClS$	285,3	242 ± 7	+2	665	3 ± 8

*Calculados empleando el programa Chemsketch-ACS

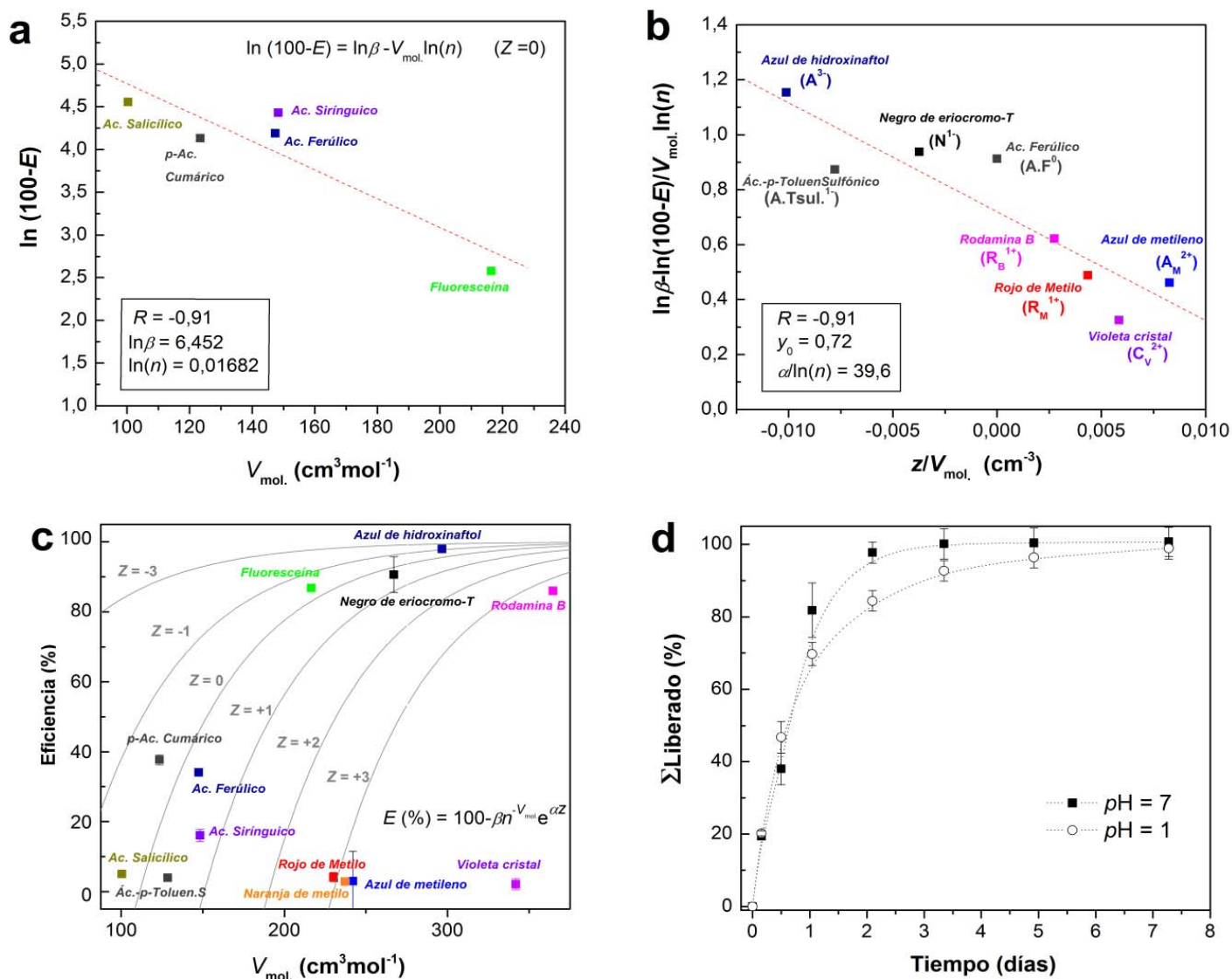


Figura 4: Modelado de la encapsulación y liberación de fluoresceína. a) Influencia del volumen molecular en la eficiencia de encapsulación para fármacos no cargados y su ajuste a la ecuación (4). b) Representación y ajuste lineal a la ecuación (5) de los datos de eficiencia de encapsulación. c) Eficiencia frente a volumen molar y curvas modelo según la ecuación (3) para distintos valores de z . d) Liberación acumulativa de fluoresceína en función del tiempo y pH.

la ecuación (3) puede reajustarse para conseguir una figura de mérito dependiente tanto de la carga como del volumen molar:

$$\frac{\ln\beta - \ln[100 - E(\%)]}{V_{mol} \ln(n)} = 1 - \frac{\alpha}{\ln(n)} \frac{z}{V_{mol}} \quad (5)$$

La ecuación (5) presenta como variable independiente el factor z/V_{mol} que tiene unidades de densidad de carga y puesto que el valor de z está normalizado respecto a la carga del electrón, tiene unidades de inversa de volumen (cm^{-3}). La figura 4b presenta el ajuste de los datos de $E(\%)$ a la ecuación (5) empleando los valores de β y n obtenidos con el ajuste a la ecuación (4). En este ajuste se ha tomado el ácido ferúlico como molécula con $z = 0$ ya que mostró un

valor de $[\ln\beta - \ln(100-E)]/V_{mol} \ln(n)$ más cercano a la unidad. De la pendiente del ajuste lineal de la representación de la figura 4b se obtiene el parámetro $\alpha = 0,67$. Cabe mencionar que si en lugar de un polication el sistema fuese un polianión el coeficiente α presentaría valores negativos.

Con la triada de coeficientes $\{\beta, n, \alpha\}$ que definen la capacidad de encapsulación de $\text{PU}^{(+)}$ en las condiciones experimentales detalladas, en la figura 4c se han representado las curvas de $E(\%)$ vs. V_{mol} predichas para sistemas con distinta carga. Estas curvas se presentan junto con los valores de $E(\%)$ para cada FM estudiado. Como puede observarse, aunque la tendencia general de los FM es pareja a la predicha por la ecuación (3) según la parametrización llevada a cabo mediante los ajuste a las ecuaciones (4) y (5), existen algunas desviaciones notorias

como en el caso del violeta cristal, que con una carga de +2 y un gran volumen molar debería ofrecer una mayor eficiencia que el azul de metileno. El ácido *p*-toluen-sulfónico también se desvía notablemente de la predicción, ya que con una carga neta de -1 debería tener una eficiencia mayor que el ácido cumárico, con parecido volumen molar pero no cargado en las condiciones de pH estudiadas. Las desviaciones observadas pueden deberse a la simplicidad del modelo semi-empírico descrito por la ecuación (3), que no tiene en cuenta otros aspectos como las interacciones de tipo van der Waals (dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, etc.), puentes de hidrógeno, o la geometría molecular, entre otros.

Se ha estudiado también la cinética de liberación de fluoresceína encapsulada en partículas de PU incubadas en medios con distinto pH que simulan las condiciones estomacales (pH = 1,0) y sanguíneas (pH = 7,4), ambos con una fuerza iónica similar. La figura 4d muestra los valores de liberación acumulativa estudiada mediante UV-Vis. Se observa una cinética de liberación similar para ambas condiciones aunque ligeramente más lenta en condiciones de pH = 1. La cinética de liberación más rápida en el caso de pH = 7,4 puede deberse a la mayor solubilidad de la fluoresceína a pH > pK_a lo cual favorece su difusión hacia el medio y su mayor presencia en el sobrenadante.

Conclusiones

Se ha sintetizado un poliuretano con alta densidad de puentes de hidrógeno, capaz de cuaternizarse y autoensamblarse en nanomicelas (~60 nm) en HCl 0,1 N. Estas disoluciones coloidales han sido incubadas con distintos fármacos modelo y posteriormente se ha llevado a cabo una precipitación salina del poliuretano tras la que se ha cuantificado la eficiencia de encapsulación en las partículas de poliuretano de los distintos fármacos modelo. Tras su precipitación salina las micelas se reorganizan en supra-micelas de ~250 nm. Se ha propuesto un modelo semi-empírico para predecir la encapsulación en función del volumen molar y de la carga neta del fármaco. La encapsulación de los fármacos en el poliuretano da lugar a una liberación sostenida que es función del pH del medio.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Gobierno Vasco en el marco del Grupo Consolidado IT-776-13 y al Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España (MINECO) por su financiación. También agradecen a la unidad SGiker "Macroconducta-Mesoestructura-Nanotecnología" de la UPV/EHU por su apoyo técnico.

Referencias

1. P Couvreur, F Puisieux. Nano and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. **Adv. Drug Delivery Rev.**, **10**, 141-162 (1993).
2. M Murillo, S Espuelas, S Prior, A Vitas, M Renedo, M Goñi, J Irache, C Gamazo. Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas. **Rev. Med. Univ. Navarra**, **45(4)**, 19-34 (2001).
3. C López, F Alex, L Deladino, S Navarro-Alba, M Martino. Encapsulación de compuestos bioactivos con alginatos para la industria de alimentos. **Cienc. Tec. Alim.**, **10(1)**, 18-27 (2012).
4. J Yáñez-Fernández, J Salazar-Montoya, L Chaires-Martínez, J Jiménez-Hernández, M Márquez-Robles y E Ramos-Ramírez. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. **Avance y Perspect.**, **21**, 313-319 (2002).
5. D Ramos-Picos, M Gómez-Carril y D Fernández-Mena. Métodos de obtención de microesferas biodegradables. **Rev. Cubana Farm.**, **35(2)**, 126-135 (2001).
6. K Gorna, S Gogolewsky. Preparation, degradation, and calcification of biodegradable polyurethane foams for bone graft substitutes. **J. Biomed. Mater. Res.**, **67(A)**, 813-827 (2003).
7. B Fernández-d'Arlas, I González, A Eceiza. Hacia la mimesis de la seda de araña a partir de poliuretanos con segmentos cortos de unidades rígidas y semiflexibles. Aceptado en **Rev. Lat.Am. Metal. Mat.**, **35(1)**, (2015).
8. M Martín-Villena, M Morales-Hernández, V Gallardo-Lara y M Ruiz-Martínez. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular prebióticos. **Ars Pharm.**, **50**, 43-50 (2009).
9. F Hofmeister. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. **Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.**, **24**, 247 (1888).
10. T López-León. Efectos Hofmeister en Sistemas Coloidales. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Granada, España (2010).
11. A Lammel, X Hu, S Park, D Kaplan, T Scheibel. Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. **Biomaterials**, **31(16)**, 4583-91 (2010).
12. A Buitrago, L Calderon, A León, R Brunetto, M Galliani. Desarrollo y validación de un método espectrofluorométrico para la determinación de furosemina en formas farmacéuticas sólidas. **Av. Quím.**, **5**, 15-25 (2010).
13. A Bayer. Uebereineue Klasse von Farbstoffen. **Ber. Dtsch. Chem. Ges.**, **4**, 555-558 (1871).
14. Laboratorio QO. Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, UNAM, México. Obtención de Indicadores del tipo de las ftaleínas. Fenolftaleína y Fluoresceína. Química Orgánica III.
Disponible: www.organica1.org/1545/1545_8.pdf. Consultado: 13/10/2014
15. B Fernández-d'Arlas, M Corcuera, J Labidi, I Mondragon, A Eceiza. Poly(urea)urethanes based on amorphous quaternizable hard segments and a crystalline polyol derived from castor oil. **Colloid. Polym. Sci.** **291(5)**, 1247-1254 (2012).

16. A Itoh, K Ueno. Evaluation of 2-Hydroxy-1-(2-hydroxy-4-sulpho-1-naphthylazo)-3-naphthoic Acid and Hydroxynaphthol Blue as Metallochromic Indicators in the EDTA Titration of Calcium. **Analyst**, **96**, 583-589 (1970).
17. J Cenens, A Scoonheydt. Visible spectroscopy of Methylene blue on Hectorite, Laponite B, and Barasym in aqueous suspension. **Clays&ClayMiner.**, **36(3)**, 214-224 (1988).
18. J Paredes-Martínez. Síntesis, fotofísica y aplicación a la espectroscopia de correlación de fluorescencia de derivados xanténicos útiles como sondas fluorescentes "on/off". Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Granada, España (2010).
19. E Adams, L Rosenstein. The color and ionization of crystalviolet. **J. Amer. Chem. Soc.**, **36(7)**, 1452-1473 (1914).
20. J Guthrie. Hydrolysis of esters of oxy acids: pKa values for strong acids. **Can. J. Chem.**, **56**, 2342-2354 (1978).
21. E Serjeant, B Dempsey. Ionization Constants of Organic Acids in Aqueous Solution: IUPAC Chemical Data Series, nº 23. Pergamon Press, Nueva York (1979).
22. A Ramírez-Torres. Evaluación de los extractos de Capsicum annum como antimicrobianos naturales mediante la microbiología predictiva. Tesis Doctoral. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México DF, México (2010).
23. BENTOS: Servicios y equipos marinos Ltda. (USA). Metodologías utilizadas en estudios de dispersión: elección del mejor trazador químico. Informe Técnico, 1-21 (2007).
Disponible: www.bentos.cl/archivos/Uso_de_Rodamina.Pdf
Consultado: 13/10/2014
24. S Smith, W Pretorius. Spectrophotometric determination of pKa values for fluorescein using activity coefficient corrections. **Water SA**, **28(4)**, 395-402 (2004).
25. N Ríos-Donato, R Carranza-Marmolejo, R García-Lemus, A Blanco-Aquino, B García-Gaytán, E Mendizábal-Mijares. Eliminación de colorantes de disoluciones acuosas utilizando sulfato de quitosano. **Rev. Iber. Polím.**, **14(5)**, 256-263 (2013).
26. K Bjerrum. Untersuchungen über Ionenassoziation. **Kgl. Danske Vidensk. Selsk.**, **7(9)**, 1-48 (1926).