



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**"PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN BIOGEL CON ALBÚMINA DE
SUERO BOVINO INMOVILIZADA POR EL MÉTODO SOL-GEL Y SU ESTUDIO
PRELIMINAR EN SISTEMAS EN FLUJO POR CLAR".**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. ERIKA GARCIA SALGADO



Ciencias
Químicas

TUTOR: Dra. LUZ ELENA VERA ÁVILA

2005

M: 349734



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INTEGRANTES DEL JURADO

Presidente

Dra. Guadalupe Albarrán Sánchez

Vocal

Dra. Josefina de Gyves Marciniak

Secretario

Dra. Evangelina Camacho Frías


Primer suplente

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

Segundo suplente


Dr. Juan Carlos Vázquez Lira

El trabajo se realizó en el Laboratorio 115 de Cromatografía de Líquidos, Departamento de Química Analítica. División de Estudios de Posgrado. Facultad de Química. Edificio B. UNAM.



Tutor

Dra. Luz Elena Vera Ávila



Sustentante

Q.F.B Erika García Salgado

AGRADECIMIENTOS

Dr. Jorge Alcaraz Cienfuegos. Análisis por Adsorción de Gases (BET). Departamento de Ingeniería Química Posgrado. Laboratorio de Investigación en Procesos Lab-223, Conjunto E. Facultad de Química, UNAM.

M. en C. Margarita Portilla Bauza y Q. Elvia del Socorro Reynoso Herrera. Análisis Térmicos por DSC (Termoporometría). Laboratorio de Análisis Térmicos, USAI. Facultad de Química, UNAM.

I.Q. Iván Puente Lee. Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido. Laboratorio de Microscopía Electrónica, USAI. Conjunto E, Facultad de Química UNAM.

Dra. Josefina de Gyves Marciniak. Laboratorio 113. División de Estudios de Posgrado. Facultad de Química. UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología **CONACYT** por la beca otorgada durante los estudios de Maestría.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado **DGEP** por la beca otorgada durante los estudios de Maestría.

A la Dirección Adjunta de la Investigación Científica del **CONACYT**, por el apoyo financiero concedido a través del proyecto 46558: *“Desarrollo de Nuevos Materiales con Sitios de Reconocimiento Específico para la Separación de Compuestos de Interés Ambiental o Farmacéutico de Matrices Complejas”*.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo excepcional.

NOMBRE: Erika García

Salgado

FECHA: 28 de Octubre de 2008

FIRMA: 

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio 115 de Cromatografía de Líquidos del Departamento de Química Analítica, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM. Bajo la asesoría de la Dra. Luz Elena Vera Ávila y fue presentado en los siguientes congresos:

- XXXIX Congreso Mexicano de Química y XXIII Congreso Nacional de Educación Química. “*Adsorbente con albúmina de suero bovino encapsulada via sol-gel.*” Del 3 al 7 de Octubre de 2004. Mérida, Yucatán.
- XVIII Congreso Nacional de Química Analítica. “*Preparación de un adsorbente con albúmina de suero bovino (ASB) encapsulada por la técnica de sol-gel y estudio de sus propiedades de retención en sistemas de flujo.*”. 30 de Junio al 02 de Julio de 2004. Pachuca, Hidalgo.

	Página
NOTACIONES EMPLEADAS	<i>i</i>
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	
3.1 Cromatografía de afinidad	7
3.1.1 Principios	7
3.1.2 Soportes	9
3.1.3 Biomoléculas	11
3.1.4 Métodos generales de inmovilización	11
3.2 Proceso Sol-Gel	14
3.2.1 Hidrólisis de precursores	15
3.2.2 Condensación	17
3.2.3 Gelación	19
3.2.4 Maduración y secado	19
3.2.5 Inmovilización de biomoléculas vía sol-gel	21
3.2.5.1 Características del proceso sol-gel para la síntesis de biomateriales	22
3.2.5.2 Interacciones de la biomolécula con su entorno.	25
3.3 Proteínas	27
3.3.1 Clasificación	28
3.3.2 Estructura	29
3.3.3 Desnaturalización	30
3.4 Proteínas plasmáticas	30
3.4.1 Albúmina Sérica Bovina	31
3.4.2 Albúmina Sérica Humana	35
3.4.3 Mecanismo de unión de fármacos a proteínas plasmáticas	36
3.4.3.1 Unión de metabolitos tóxicos a proteínas plasmáticas	39
3.4.4 Significación disposicional de la unión proteica.	40
3.5 Caracterización de materiales	41
3.5.1 Microscopía electrónica	42
3.5.1.1 Microscopio electrónico	42
3.5.1.2 Tipos de microscopios electrónicos	42
3.5.2 Determinación de área superficial y tamaño de poro	46
3.5.2.1 Aspectos generales	46
3.5.2.2 Descripción cualitativa y origen de la estructura porosa	49
3.5.3 Método de adsorción de gases	50
3.5.3.1 Medida de la superficie específica por el método Brunauer-Emmett-Teller (BET)	52
3.5.3 Análisis térmico	54
3.5.4.1 Termoporometría	54
3.6 Caracterización del comportamiento de adsorción de lechos empacados por análisis frontal.	59
IV. OBJETIVOS	63

V. HIPÓTESIS	65
VI. EQUIPO Y MATERIAL	67
VII. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	69
7.1 Inmovilización de ASB por el método sol-gel	69
7.1.1 Inmovilización de ASB a pH 7	69
7.1.2 Inmovilización de ASB a pH 5	70
7.1.3 Agitación mecánica en el proceso de inmovilización de ASB	71
7.2 Caracterización del Material en Sistemas de Flujo	71
7.2.1 Evaluación por Análisis Frontal	71
7.2.2 Evaluación por Carga Discontinua	72
7.3 Caracterización Física del biomaterial con ASB	75
7.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	75
7.3.2 Adsorción de Gases (BET)	75
7.3.3 Análisis Térmico (Termoporometría)	75
VIII. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	77
8.1 Inmovilización de ASB por el método sol-gel a pH 7 y pH 5	77
8.2 Comportamiento de retención del Biogel en Sistemas de Flujo	83
8.2.1 Evaluación por Análisis Frontal	83
8.2.2 Evaluación por Carga Discontinua	89
8.3 Caracterización Física del biomaterial con ASB	99
8.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	100
8.3.2 Adsorción de Gases (BET)	103
8.3.3 Análisis Térmico (Termoporometría)	105
IX. CONCLUSIONES	111
X. PERSPECTIVAS	113
XI. APÉNDICE A	115
XII. APÉNDICE B	117
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

NOTACIONES EMPLEADAS

Å	Ángstrom (Unidad de longitud, 1×10^{-10} m)
ACN	Acetonitrilo
AUFS	Unidades de Absorbancia a Escala Completa
ASB	Albúmina de Suero Bovino
ASH	Albúmina de Suero Humano
BET	Ecuación de Brunauer-Emmet-Teller
C-18	Columna de fase enlazada octadecilsilano
CAAR	Cromatografía de Afinidad de Alta Resolución
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
D.I.	Diámetro Interno
DTP	Distribución de Tamaño de Poro
EFS	Extracción en Fase Sólida
FR	Fase Reversa
GPA	Glicoproteína ácida
K	Grados Kelvin
λ	Longitud de onda
MeOH	Metanol
ODS	Octadecilsilano
SSAF	Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
TEOS	Tetraetoxisilano
TMOS	Tetrametoxisilano
UV	Ultravioleta

I. RESUMEN

La Albúmina de Suero Bovino (ASB) tiene un peso molecular de 66000 daltons y su punto isoeléctrico se encuentra a pH 4.7-4.9; por sus características y amplia disponibilidad esta molécula ha sido empleada como proteína modelo en estudios de enlazamiento de fármacos a proteínas plasmáticas. Asimismo, ha sido utilizada como selector quiral en Electroforesis Capilar y como fase estacionaria quiral (inmovilizada químicamente en soportes de sílice) en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

En el presente trabajo, la ASB se inmovilizó físicamente en geles de sílice por la técnica de bioencapsulamiento sol-gel. Se utilizó como precursor el tetraetoxisilano (TEOS) y catálisis ácida. La relación volúmica TEOS-HCl(0.1 M)-H₂O empleada para obtener los biogeles fue 2.5:0.1:0.4, con 500 a 700 µg de ASB añadida. Se ensayaron dos diferentes valores de pH, 5 y 7, para amortiguar el "sol" con una solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) previo a la introducción de la biomolécula.

Asimismo, con el objeto de optimizar el proceso de síntesis, se variaron diversos parámetros como tiempos de hidrólisis, modo de agitación del sol, concentración de la SSAF y tiempo de adición de la proteína. El hidrogel obtenido se sometió a un secado controlado, para posteriormente ser molido y empacado en cartuchos de plástico o en columnas de acero inoxidable. Para evaluar y comparar las propiedades de retención de los biogeles se realizaron dos tipos de experimentos: 1) estudio de análisis frontal con el biogel empacado en cartuchos, 2) ensayos de cargas discontinuas hasta saturación del biogel empacado en columnas. Para estos últimos experimentos se diseñó un montaje ad-hoc acoplando en línea la columna de biogel a una columna analítica de fase reversa. Como solutos de prueba se emplearon los fármacos naproxeno y propranolol. Todos los análisis se realizaron por CLAR, con detección UV.

El tiempo requerido para la síntesis del material, así como su apariencia y consistencia, no fueron los mismos al usar diferente pH para amortiguar el sol. El tiempo de gelificación a pH 5 fue mayor y la consistencia de los geles obtenidos fue suave y elástica, mientras que los geles preparados a pH 7 fueron rígidos y duros. Los estudios de análisis frontal mostraron que el biogel (preparado a pH 7) presentaba una alta capacidad de enlazamiento del fármaco naproxeno. Bajo condiciones de no saturación (parte lineal de la isoterma de adsorción), se observó una retención de más de tres moles de fármaco por mol de ASB encapsulada.

Por otra parte los ensayos con cargas discontinuas, hasta saturación, revelaron que ambos biogeles (pH 5 y pH 7) eran capaces de retener cantidades importantes de propranolol, pero el biogel preparado a pH 7 retuvo ~50% más de fármaco que el preparado a un pH cercano al punto isoeléctrico de la proteína. Esto demuestra que la configuración de la ASB se preserva mejor cuando ésta es encapsulada en condiciones cercanas a las fisiológicas.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que el proceso sol-gel es idóneo para la inmovilización de moléculas biológicas, como las proteínas, ya que permite preservar en buena medida su estructura tridimensional y con ello sus propiedades de retención. Además, el material obtenido tiene una gran superficie específica (288 m²/g, determinada por el método BET de adsorción de N₂) combinada con una buena porosidad (intervalo de diámetro de poro de 5-30 nm, determinado por termoporometría), lo que permite el acceso no restringido de pequeñas moléculas como los fármacos. Estas propiedades de los biomateriales sol-gel los hacen un excelente medio para el estudio de interacciones fármaco-proteína, de gran importancia en la investigación médica y farmacológica.

II. INTRODUCCIÓN

Por mucho tiempo, las sílices funcionalizadas por enlazamiento químico de grupos orgánicos han sido ampliamente utilizadas como soportes para cromatografía y como adsorbentes para extracción en fase sólida; las partículas organofuncionalizadas presentan propiedades mecánicas y morfológicas de un soporte inorgánico y su comportamiento químico está relacionado con los grupos orgánicos inmovilizados en su superficie. Sin embargo, en años recientes se ha encontrado otra vía para obtener este tipo de materiales mediante un proceso denominado sol-gel. Este proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente usando alcoxisilanos $R-Si(OR)_3$ como precursores y puede ser descrito de manera general por tres reacciones: hidrólisis, condensación y policondensación. El proceso presenta la ventaja de poder incorporar moléculas biológicas dentro del soporte con funcionalidades muy particulares aportadas por la molécula dopante.

El desarrollo de nuevos adsorbentes y, a su vez, la búsqueda de procesos de bioinmovilización más eficientes en los últimos 40 años, ha resultado en una revolución en el uso de biomoléculas para la extracción selectiva, liberación, separación, conversión y detección de analitos. Los nuevos adsorbentes con propiedades específicas de retención y separación representan un campo de investigación muy activo. Actualmente, se ha demostrado que las biomoléculas inmovilizadas por el método sol-gel presentan una alta estabilidad ya que el propio poro que las encierra restringe su movimiento y disminuye la posibilidad de desnaturalización; por ello conservan por mayor tiempo su funcionalidad biológica y actividad característica con respecto a cuando se encuentran libres en solución. Además, la estructura porosa de la matriz permite la rápida difusión de los analitos o sustratos que pueden así interactuar con la biomolécula encapsulada. Por sus características estos materiales tienen amplias perspectivas de aplicación en muchas áreas como biosensores, bioreactores, implantes artificiales, etc.

El proceso sol-gel en general involucra los siguientes pasos: 1) la hidrólisis del alcoxisilano, 2) la condensación de los grupos silanol para formar el enlace siloxano ($Si-O-Si$), y 3) la policondensación de las cadenas de polisiloxano para formar oligómeros cíclicos, lineales o ramificados. Durante esta última etapa, mientras las cadenas se están formando van atrapando a la molécula dopante, (ver *figura 2.1*). Se ha encontrado que factores como el pH, fuerza iónica y el precursor empleado tienen influencia sobre la velocidad de gelificación y las propiedades físicas del material resultante. Esto permite controlar y optimizar el proceso de síntesis en función de la

aplicación a la que está destinado el material (bioseparaciones, liberación controlada de fármacos, ingeniería de tejidos, entre otros).

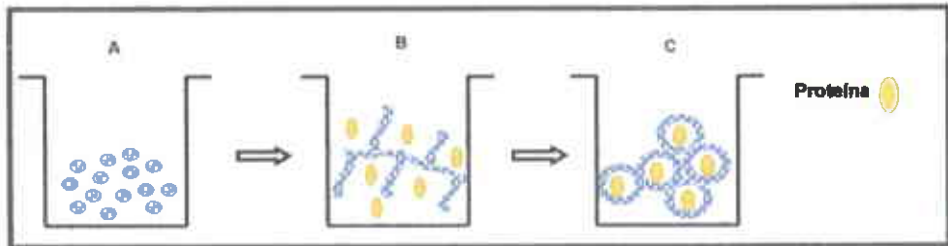


Figura 2.1 Esquema de la encapsulación en una matriz de sílice durante el proceso sol-gel. A) formación de partículas de sol durante la hidrólisis y la condensación. B) adición de la proteína al sol. C) crecimiento de las cadenas de sílice que atrapan a la proteína.

Las matrices de sílice son químicamente inertes, hidrofílicas, presentan una alta estabilidad mecánica y térmica, compatibilidad con el empleo de disolventes orgánicos y en términos de costos son mucho más baratas que otro tipo de soportes; por ello han sido comúnmente utilizadas como soportes de afinidad. Las biomoléculas inmovilizadas en cromatografía de afinidad son generalmente de carácter proteico como anticuerpos, enzimas y proteínas plasmáticas, dado que las interacciones que presentan son altamente específicas. El mantenimiento de la conformación nativa de la proteína es esencial para su capacidad de enlace.

La bioencapsulación por el método sol-gel permite la incorporación de proteínas en el soporte, como un componente integral de la red polimérica que se forma en dicho proceso. Por naturaleza muchas moléculas biológicas son altamente específicas, reconocen sustratos y catalizan reacciones en medios biológicos. Esta característica es muy atractiva para procesos de separación, de síntesis o bien para estudios básicos como es el caso del estudio de interacciones fármaco-proteína. Esta última aplicación es de gran interés ya que el enlace a proteínas plasmáticas es un proceso muy importante que determina el comportamiento de los fármacos después de su administración.

En este trabajo se probaron diferentes condiciones para el encapsulamiento de una proteína plasmática, la albúmina de suero bovino (ASB), en una matriz de sílice. Asimismo, se optimizaron etapas del proceso sol-gel buscando reducir el tiempo requerido para la obtención del biogel. Por otra parte, se diseñaron dos métodos para evaluar la interacción de la proteína inmovilizada, usando como solutos de prueba dos fármacos de uso común. Los resultados obtenidos representan una

contribución útil para mejorar la eficacia y la eficiencia de los procesos de bioencapsulamiento. Además los métodos de evaluación desarrollados pueden servir como base para trabajos futuros avocados al estudio de interacciones fármaco-proteína y la determinación de constantes de enlace.

III. ANTECEDENTES

3.1 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

3.1.1 Principios. La Cromatografía de Afinidad es un tipo de cromatografía de líquidos que emplea un agente biológico para la purificación o análisis de los componentes de interés en una muestra. La retención de solutos en esta técnica está basada en el mismo tipo de interacciones que se encuentran en sistemas biológicos, tales como el enlace de una enzima a un sustrato o de un anticuerpo con un antígeno. Estas interacciones son aprovechadas en la Cromatografía de Afinidad, ya sea por inmovilización física o por enlazamiento químico de una de las moléculas del par que interactúa sobre un soporte sólido, empleando este último como fase estacionaria. Esta molécula inmovilizada es denominada ligando de afinidad y da a la columna la capacidad de enlazar a un compuesto en particular presente en una muestra o a una familia de compuestos estructuralmente relacionados. Además del ligando de afinidad otro factor importante en la cromatografía de afinidad es el material empleado para soportar el ligando dentro de la columna. Idealmente, el soporte debe tener pocas interacciones inespecíficas con los componentes de la muestra, debe ser fácil de modificar para enlazar al ligando y debe ser estable bajo las condiciones de velocidad de flujo, presión y disolventes que serán empleados en el análisis^[1].

El primer reporte del uso de la cromatografía de afinidad fue en 1910, cuando Starkenstein utilizó un soporte de almidón insoluble para purificar la enzima α -amilasa. En 1951, Campbell y colaboradores, fueron los primeros en usar ligandos inmovilizados -antígenos- en una columna de afinidad, para la purificación de anticuerpos.

La cromatografía de afinidad es uno de los métodos de separación más selectivos, pues emplea las interacciones biológicas para la separación de un analito. Aquí, la columna está diseñada para retener un analito específico o analitos muy estrechamente relacionados, mientras todo lo demás en la muestra no es retenido. Posteriormente, el analito de interés se eluye de la columna y se cuantifica. La retención del soluto en este método está basada en las mismas interacciones específicas y reversibles que ocurren en los sistemas biológicos, como lo son el acoplamiento de una enzima con un sustrato o bien un anticuerpo con un antígeno. El método más comúnmente utilizado para realizar cromatografía de afinidad se muestra en la *figura 3.1*. La muestra que contiene el compuesto de interés se inyecta a la columna de afinidad en presencia de la fase móvil con el pH y

fuerza iónica adecuados. A medida que la muestra pasa a través de la columna con la fase móvil, los compuestos que son complementarios en afinidad a los ligandos inmovilizados se irán enlazando a ellos. Debido a la alta selectividad en estas interacciones otros solutos en la muestra tienden a eluir de la columna, ya que no son retenidos. Después de que todos los compuestos no retenidos han salido de la columna, los solutos retenidos son eluidos por la aplicación de una fase móvil que desplace o promueva la disociación del complejo “soluto-ligando”. El soluto de interés eluido de la columna, puede ser colectado o enviado directamente al detector para su cuantificación^[2].

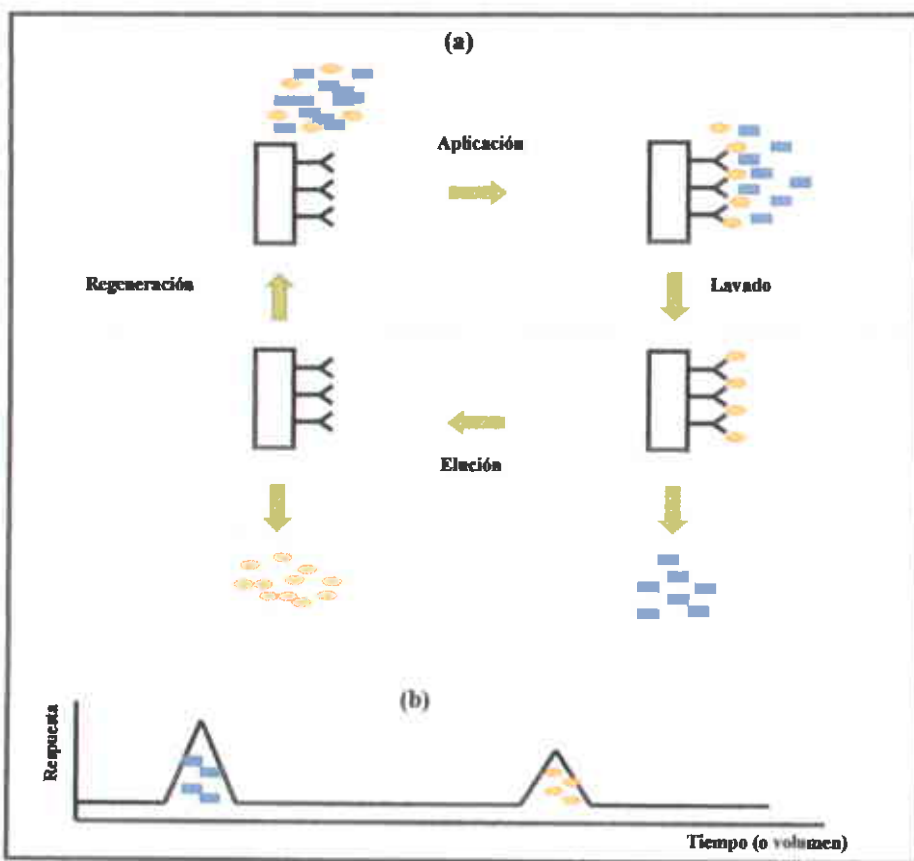


Figura 3.1 (a) Separación típica por cromatografía de afinidad (b) Cromatograma representativo de un análisis por cromatografía de afinidad ^[2].

Varios factores son importantes en los procesos de retención y elución de un compuesto en una columna de afinidad, estos factores incluyen:

- La fuerza de la interacción soluto-ligando (depende de la naturaleza de la biomolécula inmovilizada)
- La cantidad de ligando inmovilizado activo en la columna (depende del método de inmovilización)
- Cinética de asociación y disociación del complejo soluto-ligando, ver figura 3.2.

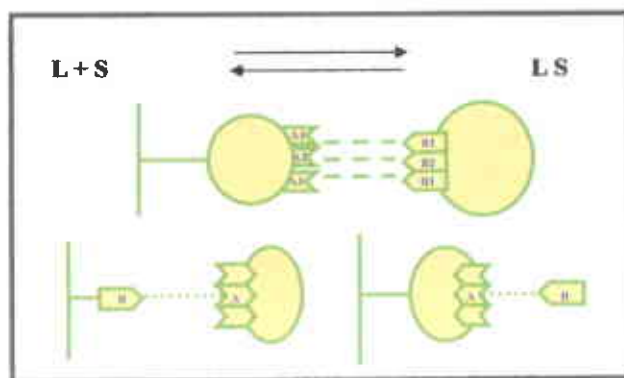


Figura 3.2 Mecanismo de formación del complejo soluto-ligando (LS) e interacciones específicas entre los ligandos (L) inmovilizados en la fase estacionaria y el analito o molécula afin (S); A y B representan los sitios de unión del ligando inmovilizado y del analito, respectivamente^[1,3].

3.1.2. Soportes. La cromatografía de afinidad de alta resolución (CAAR) está caracterizada por un soporte constituido por partículas pequeñas y rígidas capaces de soportar altas velocidades de flujo y alta presión. Los soportes más frecuentemente empleados son: sílice modificada, azalactona y medios de poliestireno hidroxilados; la estabilidad y eficiencia de estos soportes permiten su uso en equipos estándar de CLAR (Cromatografía de Líquido de Alta Resolución). Los requerimientos instrumentales en CLAR hacen de la CAAR una técnica más cara que la cromatografía de afinidad de baja resolución, sin embargo la mejor precisión y velocidad de la CAAR la hacen preferible para aplicaciones analíticas; una de estas aplicaciones es el estudio del enlace de fármacos a proteínas. Cuando las columnas de afinidad son empleadas como herramienta para estudiar las interacciones soluto-ligando, estos estudios se denominan: cromatografía analítica de afinidad, cromatografía de afinidad cuantitativa o biocromatografía^[1].

Un factor importante a considerar en esta técnica es la elección del material inerte que funcionará como soporte para enlazar la biomolécula, entre las características más importantes que debe poseer el soporte están^[2]:

- Química y mecánicamente estable
- Rígido y poroso, para permitir una buena velocidad de flujo.
- Poseer grupos funcionales adecuados para el acoplamiento con el ligando de afinidad.
- Ser hidrofílico
- Tamaño de partícula uniforme

El soporte ideal debe poseer una muy baja afinidad por los componentes de la muestra, permitir un rápido y fácil enlazamiento del ligando, así como ser estable a velocidades de flujo, presión y a las condiciones del disolvente empleado para el análisis. Los soportes más comúnmente empleados son sílica, agarosa, vidrio poroso, dextrán, poliacrilamida, etc. Dependiendo de qué tipo de material de soporte se use, la cromatografía de afinidad puede ser caracterizada como de baja o alta resolución^[2].

- Baja resistencia a la presión

Su estabilidad es limitada pues a presiones altas se compactan, sin embargo son apropiados para procesos de inmunoeextracción fuera de línea. Agarosa, celulosa y polimetacrilato presentan buena estabilidad química y son fáciles de derivatizar para introducir ligandos, por ejemplo Sefarosa-CNBr.

- Resistentes a la presión

Incluye sílice derivatizada, cuentas de vidrio, polímeros orgánicos hidrofílicos. La sílice es la más apropiada, por su estabilidad a la presión y la velocidad de flujo, sin embargo su intervalo de pH es limitado.

Los soportes con receptores biológicos inmovilizados, actualmente han encontrado aplicación en diversos campos como biosensores, catalizadores, reactores enzimáticos, bioremediación, diagnóstico médico y cromatografía de afinidad. Sin embargo, uno de los mayores retos en el desarrollo de este tipo de materiales, es precisamente la inmovilización de la molécula biológica preservando su funcionalidad^[1, 4, 5].

3.1.3. Biomoléculas. Un factor clave en la cromatografía de afinidad es el tipo de ligando inmovilizado en la fase estacionaria. Los ligandos comúnmente utilizados se enlistan en la *Tabla 3.1*; la mayoría de los ligandos son de origen biológico, sin embargo también pueden emplearse moléculas sintéticas. Los ligandos se clasifican en dos categorías^[2]:

- **Alta especificidad.** Se refiere a compuestos que se enlazan solo con una o con un restringido grupo de moléculas, se emplean cuando se desea analizar o purificar un soluto específico. En este tipo se encuentran las enzimas, anticuerpos y ácidos nucleicos.
- **Ligandos generales o de grupo.** Son compuestos que se enlazan a una familia o clase de compuestos, estos ligandos son empleados cuando se quiere aislar una clase de compuestos estructuralmente similares que pueden o no ser de origen biológico. Ejemplos de estos ligandos son: proteína A, proteína G, lecitinas, boronatos y quelatos metálicos inmovilizados.

Tabla 3.1 Ligandos empleados en Cromatografía de afinidad^[2].

Soluto a separar	Molécula inmovilizada
Enzima	Inhibidor, cofactor
Antígeno	Anticuerpo
Anticuerpo	Antígeno
Proteínas -SH	Compuesto organomercurial
Polinucleótidos	Polinucleótidos complementarios
Esteroides enlazado a una proteína	Esteroides

Por su naturaleza, muchas moléculas biológicas son capaces de reconocer compuestos específicos o bien, catalizar distintos procesos en sistemas biológicos acuosos. Estas características hacen de las biomoléculas candidatos ideales para su inmovilización y explotación, pero los medios acuosos que son necesarios para su supervivencia y la expresión de su funcionalidad limitan su viabilidad comercial. Drásticos cambios en la composición del medio originan la parcial o total desnaturalización y por lo tanto su pérdida de actividad^[6].

3.1.4. Métodos de inmovilización de biomoléculas. Numerosas técnicas como la adsorción física, el enlace covalente, el atrapamiento y encapsulación en matrices poliméricas orgánicas e inorgánicas han sido exploradas con el propósito de encontrar un proceso de inmovilización con buenos rendimientos en la síntesis del material, reproducible, robusto y que preserve al mismo tiempo la actividad de la biomolécula^[7, 8, 9].

El método de adsorción, en el cual la molécula de interés se adhiere al soporte por fisiorción, es el más simple. Sin embargo, la vida útil del material resultante es relativamente corta ya que el agente adsorbido tiende a perderse progresivamente, con lo cual las propiedades o funcionalidad característica del biomaterial disminuyen en el tiempo. El enlazamiento covalente permite eliminar este problema puesto que la biomolécula queda firmemente unida al soporte por un enlace químico. El soporte más utilizado para este fin es la sílice ya que los grupos hidróxilo de su superficie proporcionan sitios ideales para la unión covalente de moléculas orgánicas mediante reacciones de silanización. Sin embargo la preparación de biomateriales por enlazamiento covalente es generalmente larga y complicada. Las reacciones químicas involucradas en este proceso pueden provocar la inactivación de una fracción importante de las biomoléculas por distorsión o pérdida de su estructura terciaria. Adicionalmente la molécula enlazada puede quedar mal orientada, bloqueando así el acceso de los sustratos a los sitios de reconocimiento específico. Una vía alternativa para la inmovilización de moléculas sensibles es su encapsulamiento en los poros del soporte sólido por medio de la técnica sol-gel. Este método combina las mejores ventajas de los dos anteriores, es decir, inmovilización prácticamente permanente de la biomolécula y simplicidad de preparación del biomaterial. Desde los trabajos pioneros de Braun, Yamanaka, Ellerby, Wang^[10-13] y otros en los inicios de la década pasada, una gran variedad de moléculas biológicas como DNA, RNA, enzimas, anticuerpos, células animales y vegetales han sido encapsuladas en matrices de sílice u otros óxidos metálicos, organosiloxanos y otros polímeros híbridos de sol-gel^[14].

La sílice organofuncionalizada ha sido empleada desde hace mucho tiempo como material adsorbente para extracción en fase sólida y también como fase estacionaria en numerosas técnicas cromatográficas. Las partículas de sílice organofuncionalizadas presentan propiedades mecánicas y morfológicas de soportes inorgánicos pero su comportamiento químico general está relacionado con los grupos orgánicos inmovilizados en la superficie^[7]. Las matrices de sílice son químicamente inertes, hidrofílicas y su síntesis es relativamente barata y sencilla. Comparadas con otros materiales poliméricos presentan la ventaja de alta resistencia a la fuerza mecánica, estabilidad térmica y además soportan el empleo tanto de disolventes orgánicos como acuosos sin cambio de volumen (hinchamiento) apreciable. De hecho la matriz de sílice también puede actuar como un reservorio para el agua, lo que en el caso de los biomateriales es de gran interés pues ayuda a preservar la actividad biológica de las biomoléculas inmovilizadas. Otras de las ventajas de los soportes de sílice incluyen la biocompatibilidad y la resistencia al ataque microbiano. Por otra parte, la naturaleza

amorfa de la sílice no imparte una geometría ordenada a la estructura porosa tridimensional; esto resulta de interés en el encapsulamiento de biomoléculas por sol-gel, ya que muchas de las características del estado líquido son retenidas en el microambiente que rodea a la molécula atrapada en el sólido^[6, 15].

Algunos de los factores a considerar en la inmovilización de biomoléculas son los siguientes:

- Empleo de medios acuosos
- pH 4-9 (a un pH de 0.5-2 unidades del punto isoeléctrico de la biomolécula)
- Temperatura de 4-25°C
- Tiempos de reacción cortos (menos de 16 h)

Durante los procesos de inmovilización se presentan inconvenientes que hacen que la biomolécula no siempre este disponible y con actividad para llevar a cabo su función en el soporte, los problemas más frecuentes se ilustran en la *figura 3.3*.

Una vez que se ha inmovilizado la biomolécula se determina qué cantidad queda en la fase estacionaria de manera activa. La capacidad bioadsorbente está definida como el número total de biomoléculas activas inmovilizadas. Puede determinarse midiendo la cantidad de analito adsorbido después de haberlo hecho pasar a través de la columna^[2, 4].

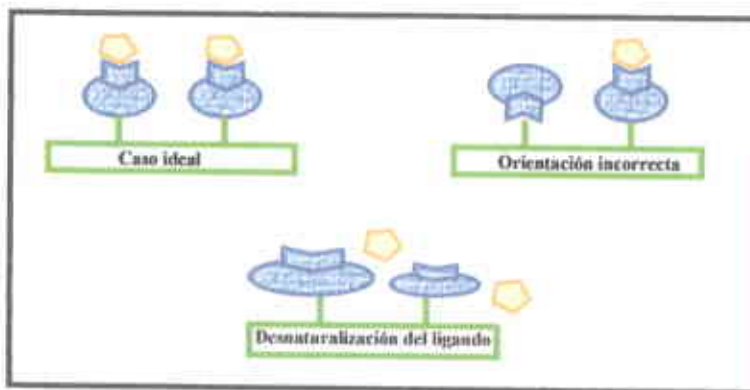


Figura 3.3 Problemas durante la inmovilización de biomoléculas^[4].

3.2 PROCESO SOL-GEL

La primera síntesis de un material por la vía sol-gel fue descrita por Ebelmen en 1944 y la producción comercial de un vidrio por sol-gel tuvo lugar al inicio de los años 60's. Sin embargo el desarrollo de la ciencia de sol-gel comenzó realmente con el "1er Taller sobre vidrios y cerámicas a partir de geles" en 1981. El proceso sol-gel es ahora ampliamente utilizado para la síntesis de multicomponentes cerámicos y materiales para nanotecnología. Uno de los mayores avances en el proceso sol-gel fue la síntesis de materiales híbridos de naturaleza orgánica e inorgánica ⁽⁶⁾. Una forma de obtener materiales de silicio funcionalizados mediante el método sol-gel es empleando alquilalcoxisilanos $R-Si(OR)_3$ y tetraetilortosilicato (TEOS) o tetrametilortosilicato (TMOS) como precursores. La policondensación del alcoxisilano es realizada a temperatura ambiente y puede ser descrita por tres reacciones:

- i) hidrólisis
- ii) condensación de los grupos silanol
- iii) condensación de grupos silanol-alcohol⁽¹⁷⁾

El proceso sol-gel involucra bajas temperaturas de hidrólisis de precursores monoméricos y es por ello muy recomendable para la inmovilización de una gran variedad de moléculas que no pueden ser sometidas a intervalos altos de temperatura. La matriz de sílice es usualmente formada por la hidrólisis de un alcóxido precursor seguida de la condensación para obtener una red polimérica de SiO_2 . En el proceso, las moléculas de alcohol formadas durante las reacciones de condensación también se encuentran presentes en el medio⁽¹³⁾.

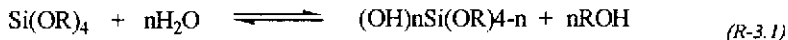
El primer paso es la formación de un sol. Un sol es una suspensión coloidal¹ de especies sólidas en un líquido, el sol se convierte en un gel a través de una policondensación. Un gel es un medio bifásico en el cual hay una isotrópica y progresiva densificación, esto es, una red porosa en un líquido. Los hidrogeles son formados a partir de una solución acuosa, mientras que los alcogeles parten de una solución alcohólica. El proceso de gelificación comienza con la agregación de partículas o polímeros en paquetes con un arreglo fractal, luego los paquetes se extienden y finalmente se unen para formar una red infinita. Los xerogeles son formados por evaporación del

¹ Coloide es una suspensión en la cual la fase dispersa es tan pequeña (~1-1000 nm) que las fuerzas gravitacionales son despreciables y las interacciones están gobernadas por fuerzas como las de Van der Waals y cargas superficiales

líquido y los aerogeles son usualmente obtenidos por remoción de solvente en condiciones supercríticas. En un aerogel de sílice hay menos del 2% de dióxido de silicio y 98% de aire^[17, 18].

3.2.1 Hidrólisis de Precursores. Los precursores en el proceso sol-gel para la obtención de matrices de sílice son generalmente alcóxidos de silicio, los cuales pueden ser obtenidos en un alto grado de pureza, mientras que otros posibles precursores como el silicato de potasio son muy difíciles de purificar.

Los alcóxidos de metales o metaloides reaccionan espontáneamente con el agua, hidrolizándose parcial o totalmente de acuerdo con la siguiente reacción:



donde $n = 1-4$

La hidrólisis de alcóxidos silanos se lleva a cabo por medio de un ataque nucleofílico del oxígeno de la molécula de agua sobre el átomo de silicio. La velocidad de hidrólisis depende de diversos factores mutuamente relacionados. Los principales son:

- La relación molar agua-alcóxido silano en la mezcla reaccionante
- La adición de catalizadores y su tipo o naturaleza
- La adición de un cosolvente a la mezcla de reacción
- El tamaño y propiedades químicas de los sustituyentes unidos al átomo de silicio.

En principio, y de acuerdo con la reacción *R-3.1*, un aumento en la cantidad de agua agregada al precursor debería fomentar y acelerar la reacción de hidrólisis. Sin embargo la cantidad de agua también influye sobre otros factores (como se discutirá más adelante) y en otras etapas del proceso como la condensación. De hecho el agua tiene un efecto importante en el número y tamaño de las micelas o núcleos que se forman en las primeras etapas del proceso, cuando la mezcla de reacción inicial se transforma en un sol.

El proceso sol-gel generalmente se lleva a cabo en presencia de catalizadores para favorecer la reacción de hidrólisis. Con este fin se han utilizado tanto compuestos ácidos (HCl, HF, ácido acético, etc.) como básicos (NH₃, aminas, NaF, KOH), sin embargo, se ha encontrado que los ácidos aceleran la hidrólisis en mayor medida que las bases. En la catálisis ácida un grupo alcoxi se protona provocando que la densidad electrónica del enlace Si-O se desplace hacia el oxígeno protonado, lo que vuelve al silicio más susceptible al ataque nucleofílico por la molécula de agua. Durante este

proceso, se forma un intermediario de silicio pentacoordinado y, al liberarse finalmente la molécula de alcohol, se produce una inversión de la configuración (figura 3.4).

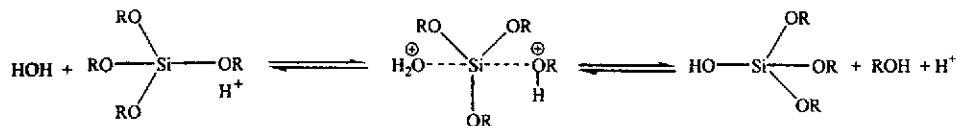


Figura 3.4 Mecanismo de hidrólisis de alcóxidos de silicio por catálisis ácida.

Los efectos estéricos son muy importantes en este mecanismo, por lo cual la hidrólisis es más rápida a medida que el grupo R del alcóxido es más pequeño y menos ramificado. Así, la velocidad de hidrólisis del TMOS en medio ácido es aproximadamente el doble que la del TEOS y este último, a su vez, se hidroliza casi dos veces más rápido que el TPOS (tetrapropil ortosilicato).

Por otra parte, el efecto catalizador de un ácido, como HCl, depende no sólo de la proporción HCl-alcoxisilano sino también del grado de dilución del ácido, es decir de la proporción HCl-H₂O^[19, 20]. Se ha observado que, para una relación dada HCl-precursor, el efecto de catálisis es mayor (hidrólisis más rápida y completa) a medida que el pH del medio es más ácido, es decir, a medida que la concentración de HCl en la fase acuosa aumenta. Desde este punto de vista, un exceso de agua resulta contraproducente para la hidrólisis. Por ello, en muchos trabajos se utilizan relaciones molares H₂O-alcóxido entre 2:1 y 3:1. Aunque esta proporción de agua es menor a la que muestra la estequiometría de la reacción R-3.1 para la hidrólisis total del alcóxido, es necesario considerar que en la etapa de condensación se genera agua y que ambas etapas, hidrólisis y condensación, coexisten en el tiempo.

Los alcóxidos de silicio y el agua no son miscibles, por ello en la técnica convencional de sol-gel se establecía como un requerimiento la adición de un cosolvente (tetrahydrofurano, acetato de etilo o un alcohol) a la mezcla de reacción para facilitar el contacto entre los reactivos y por tanto la hidrólisis. Sin embargo, el cosolvente es un agente nocivo para las biomoléculas por lo cual este paso generalmente se omite en los protocolos de síntesis de biogeles. Se ha demostrado que manteniendo la mezcla agua-precursor-catalizador en un baño de ultrasonido o bajo agitación constante al inicio del proceso permite que la reacción de hidrólisis comience y con ello se genera una cantidad de alcohol suficiente para homogenizar la mezcla^[21]. Por otra parte, dado que las reacciones de hidrólisis y condensación son parcialmente reversibles, la presencia de un exceso de alcohol (u otro

cosolvente) puede promover la esterificación de las especies ya hidrolizadas o impedir su polimerización.

Las propiedades donador-receptor de electrones de los grupos unidos al átomo de silicio también influyen en su reactividad (figura 3.5). Bajo condiciones de catálisis ácida, la presencia de un grupo alquílico en la molécula del precursor (por ejemplo alquiltrialcoxisilano) favorece por sus efectos inductivos la protonación de los grupos alcoxi y por tanto la reacción de hidrólisis. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el tamaño del sustituyente es fundamental. Por ejemplo, Rodríguez y Colon^[22] encontraron que la velocidad de hidrólisis del octiltrietoxisilano era significativamente menor que la del TEOS, lo cual es sin duda debido al voluminoso grupo octilo.

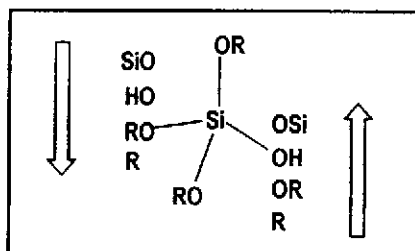
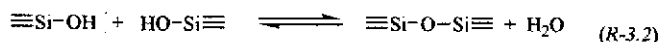


Figura 3.5 Características de donador-receptor de electrones de los sustituyentes unidos al átomo central de silicio. La flecha a la izquierda indica el incremento del carácter electrodonador, la flecha a la derecha indica el carácter electroceptor^[23].

3.2.2 Condensación. Los alcoxisilanos parcial o totalmente hidrolizados son bastante reactivos y empiezan a condensar desde los inicios del proceso sol-gel, de acuerdo con las siguientes reacciones:



En un estudio sobre la hidrólisis de TEOS en medio ácido, se observó que la concentración de especies hidrolizadas comenzaba a disminuir a partir de los 30 min de iniciado el proceso, indicando con ello el comienzo de la condensación. La cantidad de TEOS no hidrolizado en este punto era todavía superior al 45% de la cantidad inicial^[22]. Este hecho demuestra la coexistencia de las reacciones de hidrólisis y condensación desde una etapa temprana del proceso.

Contrariamente a la hidrólisis, las reacciones de condensación son lentas en medio ácido y se ven favorecidas en medio neutro o alcalino. El mecanismo de condensación en estos medios involucra el

ataque nucleofílico de un silanol desprotonado sobre un silicato neutro, como se muestra en las siguientes reacciones:



la relación de las constantes de velocidad de hidrólisis y condensación es un factor clave que determina en gran medida la morfología del material final. Dependiendo de la importancia relativa de estos dos procesos, el crecimiento de las cadenas siloxano puede producir entidades relativamente lineales, ramificadas o particuladas. Inicialmente se forman pequeñas micelas (también llamadas partículas elementales) de 10 a 20 nm de diámetro a través de un proceso de nucleación, cuya velocidad depende de las condiciones del medio de reacción. Entre más rápida es la nucleación mayor es el número de núcleos o micelas formadas y menor es su tamaño. En este punto, la mezcla de reacción inicial se ha transformado en un sol.

Los núcleos pueden crecer en forma independiente generando partículas homogéneas y esféricas que eventualmente se separan del medio (proceso utilizado para la fabricación de algunas fases estacionarias para CLAR), o bien, los núcleos pueden interaccionar unos con otros formando una red tridimensional, la que finalmente dará origen a un gel. En este último caso, el proceso de crecimiento ocurre a través de la agregación progresiva de micelas. Dependiendo de las condiciones de reacción, los agregados pueden estar conformados por largas cadenas de polímero con bajo grado de entrecruzamiento (red flexible) o por una estructura compacta de cadenas relativamente pequeñas, muy ramificadas y entrecruzadas^[24].

Es bien conocido que las características físicas del gel final dependen en gran medida del tamaño de las partículas elementales formadas al inicio del proceso. Los núcleos grandes, al agregarse, dan lugar a geles de sílice altamente porosos y para promover la formación de grandes núcleos es necesario aumentar el tiempo de hidrólisis reduciendo la velocidad de condensación^[25]. Como se mencionó anteriormente, la condensación es lenta en medio ácido y rápida en medio neutro o alcalino, por lo tanto, manteniendo el sol en medio ácido es posible prolongar el tiempo de hidrólisis, mientras las micelas se agregan lenta y progresivamente hasta alcanzar el punto de gelación. Un largo tiempo de hidrólisis también se traduce en un mayor rendimiento de la reacción porque permite que una mayor proporción de moléculas de precursor sean totalmente hidrolizadas y se incorporen por condensación a la estructura de la red polimérica.

3.2.3 Gelación. La gelación o punto de transición sol-gel corresponde a aquél en donde dos o más grandes coloides se unen por condensación formando una molécula gigante que se extiende por todo el medio y la solución deja de fluir. La transición sol-gel es un proceso irreversible y, en este punto, la monofase líquida (el sol) se transforma en un sistema bifásico constituido por un esqueleto sólido poroso y el líquido intersticial atrapado en él. La gelación va precedida por un fuerte cambio en las propiedades reológicas de la solución; así, el aumento de viscosidad del sol es un buen indicador de la inminente gelación.

Cabe anotar que en el momento de la gelación existen todavía muchos agregados no unidos a la estructura principal que se encuentran dispersos en la fase líquida. Estos oligómeros continúan enlazándose entre sí y/o con los silanoles de superficie del esqueleto sólido a través de reacciones de condensación. Así mismo, en la propia estructura sólida, los silanoles contiguos condensan provocando sinéresis de los poros y densificación del material. Por ello, las propiedades del gel recién formado (hidrogel) continúan evolucionando en el tiempo. De hecho, Dunbar y colaboradores^[25] detectaron cambios en el microambiente de los poros de una película sol-gel hasta un mes después de ocurrida la gelación. Este proceso de evolución del gel recibe el nombre de maduración.

3.2.4 Maduración y Secado. La maduración consiste en una reestructuración y densificación del gel como resultado de reacciones de policondensación. En esta etapa, el grado de entrecruzamiento de la red polimérica aumenta y su estructura se consolida y refuerza. Al mismo tiempo el gel se contrae y parte del líquido es expulsado de los poros. El grado de encogimiento del gel depende de las condiciones de maduración así como de las condiciones previas a la gelación; es decir del tamaño, grosor y grado de entrecruzamiento de los agregados poliméricos antes de la transición sol-gel. Típicamente un hidrogel se contrae entre 5 y 20% de su volumen original durante la maduración^[26] sin embargo la mayor parte del agua y el alcohol generado en las etapas de hidrólisis y condensación permanecen en los poros del gel; así, un gel madurado es un sólido con una estructura porosa bien desarrollada que contiene una fase líquida intersticial. Durante el secado del gel, las fuerzas capilares originadas por la tensión superficial de la fase líquida tienden a densificar aún más al sólido, comprimiendo y cerrando la red polimérica, reduciendo el volumen poroso y destruyendo las partes más frágiles de la estructura tridimensional. La reducción del volumen en esta etapa puede llegar hasta el 85-87% respecto al volumen del hidrogel inicial. Aunque las propiedades

mecánicas y la resistencia química del gel secado (xerogel) son muy superiores a las del hidrogel, el fuerte colapso de los poros es indeseable para muchas aplicaciones^[26].

Idealmente, la morfología creada durante la etapa de gelación debería ser mantenida cuando el gel pasa al estado de xerogel, por ello se han propuesto diversas soluciones para minimizar el encogimiento del material y el excesivo colapso de los poros durante el secado. Los materiales sol-gel provenientes de alcóxidos de silicio son particularmente propensos a estos indeseables fenómenos por la alta tensión superficial de la mezcla agua-alcohol contenida en los poros del hidrogel.

Una propuesta es la de sustituir la mezcla agua-alcohol de los poros del gel formado por un solvente orgánico de menor tensión superficial. Si esto se combina con un secado a presión y temperatura arriba de los valores críticos del solvente sustituto, es posible obtener un aerogel, cuyo volumen será prácticamente igual al del gel húmedo original. Los aerogeles se caracterizan por una alta porosidad (3-6 cm³/g), gran superficie específica (250-450 m²/g) y baja conductividad térmica. Evidentemente, el solvente sustituto óptimo es el CO₂ supercrítico^[24, 27]. Las desventajas de esta propuesta son: la mayor complejidad del procedimiento, su costo más elevado y la dificultad para escalarlo a nivel industrial.

Otra vía alternativa se basa en la modificación de las especies formadas en etapas muy tempranas del proceso. Los oligómeros o micelas resultantes del proceso de nucleación se recuperan por evaporación del sol y se someten a una reacción de transesterificación con glicerol. Posteriormente, estos nuevos precursores de poligliceroxisilano se disuelven en agua o ácido diluido para continuar la hidrólisis y condensación hasta que se produce la gelación. Durante la etapa de secado, el glicerol (liberado en la hidrólisis) actúa como un aditivo de control de secado, permitiendo efectuar un secado rápido del gel a temperatura ambiente sin que se produzca un excesivo colapso de poros o un notable encogimiento del material^[26].

Las propuestas antes mencionadas implican pasos extra y mayor complicación en la técnica sol-gel. En secciones anteriores se indicó que las propiedades mecánicas del hidrogel y por ende su resistencia al encogimiento y colapso de poros durante el secado pueden ser optimizadas seleccionando apropiadamente las condiciones experimentales previas a la gelación y durante la maduración. En efecto, la resistencia de la red se incrementa cuando las cadenas poliméricas que la constituyen están conformadas por grandes partículas elementales. Esto se logra mediante un proceso de nucleación lento, es decir, en condiciones donde la velocidad de hidrólisis es mucho mayor a la velocidad de condensación (o sea en medio ácido). Por otra parte, la resistencia de la red

también depende de su grado de interconexión o entrecruzamiento y éste queda determinado por las condiciones del medio existente justo antes de la gelación y durante la maduración. Se ha reportado que un medio básico en estas etapas favorece la formación de una red altamente ramificada y entrecruzada^[24].

3.2.5 Inmovilización de Biomoléculas vía sol-gel. Por mucho tiempo se pensó que la técnica sol-gel no era apropiada para la inmovilización de biomoléculas, ya que las condiciones del proceso y la contracción de la matriz podrían provocar la desnaturalización de estas frágiles moléculas y la inactivación de su funcionalidad biológica característica. Sin embargo, desde mediados de la década de los 80's, los trabajos de Venton y colaboradores^[28] y Glad y colaboradores^[29] mostraron que enzimas, anticuerpos y aún células vivas podían ser inmovilizadas en polímeros sol-gel reteniendo su capacidad de reconocimiento específico y sus propiedades de enlazamiento o catálisis particulares. Así, estos investigadores establecieron las bases del bioencapsulamiento demostrando que: 1) la técnica clásica podía ser modificada para hacer factible el encapsulamiento del material biológico, 2) el biomaterial obtenido desplegaba la actividad característica de las especies atrapadas y 3) la matriz del polímero era suficientemente permeable para permitir la difusión de pequeñas moléculas en su interior sin que las biomoléculas atrapadas pudieran fugarse^[14]. Estos trabajos pioneros aislados fueron seguidos años después por una intensa actividad de investigación en esta área, que arrancó a partir de la publicación de Braun y colaboradores^[10] en 1990 sobre el encapsulamiento sol-gel de diversas enzimas. Las amplias posibilidades de aplicación de este tipo de materiales han quedado ya bien establecidas. Por ejemplo, Lan y colaboradores^[26] reportaron que metaloproteínas como citocromo-c, mioglobina y hemoglobina podían ser encapsuladas en matrices sol-gel y empleadas para la detección de pequeñas moléculas como O₂, NO y CO. La inmovilización de estas proteínas no afectó su reactividad química aún después del secado de los geles a temperatura ambiente, quedando así demostrado que el xerogel dopado retiene suficiente agua para proveer un medio acuoso que previene la desnaturalización de las biomoléculas. La glucosa oxidasa atrapada en sol-gel es otro ejemplo, muy bien estudiado, de un biomaterial con aplicaciones en el campo de la medicina^[11] y la industria alimenticia.

Otras moléculas más grandes como los anticuerpos (peso molecular ~150,000 daltons) han sido también inmovilizadas en sol-gel^[13, 28, 30]. Se ha demostrado que la interacción antígeno-anticuerpo puede realizarse dentro de la matriz sólida y que bajo condiciones óptimas, las constantes de enlace

del complejo pueden llegar a alcanzar valores de hasta $10^{12} M^{-1}$. Incluso se ha reportado que especies todavía más grandes, como el protozoario *Leishmania donovani infantum*, han sido inmovilizadas en matrices sol-gel para aplicaciones médicas; en particular este protozoario se usó como antígeno para pruebas de sangre. Por medio de la microscopía de transmisión electrónica se demostró que la organización celular del parásito fue bien conservada y que el plasma de la membrana no fue alterado durante el proceso de encapsulamiento^[16].

La técnica convencional de sol-gel involucra, generalmente, valores de pH extremos y altas concentraciones de alcohol que afectan la estabilidad de las biomoléculas. El TMOS ha sido frecuentemente utilizado como precursor en procesos de bioencapsulamiento debido probablemente a su cinética de hidrólisis más rápida que la de otros alcóxidos y, en segundo lugar, a que el metanol producido tienen una polaridad más cercana a la del agua por lo que, en principio, se pensaba que podría provocar menor desnaturalización de las biomoléculas. Sin embargo, es sabido que el metanol es un alcohol más tóxico para los seres vivos que otros alcoholes como el etanol o propanol. En un estudio reportado por Wang y colaboradores^[13] se comparó la afinidad de un anticuerpo por su antígeno en solución amortiguadora (pH 8) y en mezclas etanol-solución amortiguadora y metanol-solución amortiguadora; el resultado observado fue que ambas mezclas alcohólicas provocaban una fuerte disminución de la constante de afinidad del complejo antígeno-anticuerpo con respecto a la obtenida en solución amortiguadora solo, pero la disminución fue notablemente mayor en presencia de metanol. Debido a estos efectos indeseables de los alcoholes, el proceso sol-gel tuvo que ser modificado eliminando la adición de un cosolvente. Otro cambio consistió en la adición de una solución amortiguadora después de la reacción de hidrólisis y previo a la incorporación de la biomolécula a inmovilizar. La solución amortiguadora tiene dos efectos, por una parte, impone al sol un valor de pH biológicamente compatible neutralizando al ácido (o la base) agregado como catalizador, por otra parte, diluye el alcohol generado durante la hidrólisis disminuyendo sus efectos nocivos sobre las biomoléculas. En efecto, es sabido que los alcoholes inducen la agregación de biomoléculas, y por lo tanto su desdoblamiento y desnaturalización, cuando su concentración en el medio es superior al 60% (v/v)^[21]. Con las modificaciones mencionadas se hizo factible el uso de la técnica sol-gel para la síntesis de biomateriales a temperatura ambiente, con características químicas, térmicas y dimensionales estables^[6].

3.2.5.1 Características del Proceso Sol-Gel para la Síntesis de Biomateriales. De acuerdo con lo discutido anteriormente, la preparación de materiales dopados con biomoléculas por la vía sol-gel requiere de un cuidadoso control de varios parámetros a lo largo del proceso^[31-34].

Primero, se debe minimizar la presencia de alcohol en el medio, lo que implica omitir la adición de cosolvente a la mezcla de reacción y sustituirla por agitación continua o sonicado al inicio del proceso. Algunos autores proponen realizar una prehidrólisis del precursor, separar las partículas coloidales formadas y transferirlas a una nueva solución, totalmente acuosa, para continuar la hidrólisis; de esta manera se elimina una buena parte del alcohol que es generado en mayor proporción en la etapa inicial del proceso (es decir, durante la prehidrólisis)^[6, 35].

Segundo, la reacción debe ser compatible con el intervalo de pH y fuerza iónica requerido para mantener la estabilidad y funcionalidad de las biomoléculas. Para la mayor parte de las proteínas el intervalo de pH es de 4-10 y la fuerza iónica de 0.01-1 M. Dado que estas condiciones no son adecuadas para obtener un material con características óptimas (como porosidad y buena resistencia mecánica), es necesario iniciar el proceso en condiciones convencionales (ácidas o básicas) y posteriormente adicionar una solución amortiguadora al sol previo a, o junto con, la adición de la biomolécula. Tercero, el proceso debe ser llevado a cabo a temperatura ambiente para mantener a las proteínas en su configuración nativa^[36].

Algunas de las características del material resultante, indispensables para su aplicación exitosa son las siguientes:

- Debe tener una estructura altamente porosa, donde los poros o cavidades estén interconectados por canales lo suficientemente grandes para permitir la entrada de sustratos o analitos a la matriz y su difusión no restringida a través de la estructura hasta llegar a los sitios que contienen la biomolécula atrapada. Sin embargo, el poro que aloja a la biomolécula debe tener características tales que impidan su lixiviado.
- Las propiedades del material deben permitir la modificación del ambiente interno para maximizar la actividad de la biomolécula inmovilizada.
- El material final debe tener transparencia óptica o ser un buen conductor eléctrico para permitir mediciones espectroscópicas o electroquímicas, respectivamente, cuando su aplicación ulterior es en el desarrollo de biosensores.

- Finalmente, deberá obtenerse un material robusto, de fabricación sencilla y reproducible, pero al mismo tiempo lo suficientemente flexible para ser manufacturado en una amplia variedad de formatos, incluyendo lentes, película delgada, columna monolítica, fibra, polvos, etc^[8].

En la *figura 3.6* se presenta un esquema general para la síntesis de biomateriales sol-gel que cumple con los puntos anteriormente mencionados. El proceso comienza con la parcial o completa hidrólisis de un precursor para formar un sol acuoso. Los precursores pueden ser tetralcoxisilanos, mono- o dialquilalcoxisilanos o pueden contener grupos funcionales como alquenal, aril, amino, carboxil, tio u otros grupos con propiedades redox como flavonas o quinonas. Otros centros metálicos como el Al, Ti, V o Ce también pueden ser empleados para modificar las propiedades del material. La reacción de hidrólisis puede ser catalizada por un medio ácido o básico y puede ser seguida de transesterificación con aditivos como el glicerol para formar poli(gliceril)silicatos los cuales son más biocompatibles que los típicos alcoxisilanos^[8].

Después de la hidrólisis, el sol puede ser empleado inmediatamente o puede ser almacenado por varias semanas para permitir la evolución de sus partículas. Durante este tiempo, debido a las reacciones de hidrólisis y condensación resulta un amplio intervalo de polisilicatos coloidales lineales y ramificados. El precursor hidrolizado se mezcla luego con una solución acuosa amortiguadora que contiene a la biomolécula y puede además contener algún tipo de catalizador, aditivos para el control del secado, polímeros, especies redox u otras sustancias que pueden ser requeridas para modificar las propiedades del material. El cambio en el valor de pH y la presencia de las sales adicionadas promueve a gran escala las reacciones de polimerización en un periodo de tiempo que puede ir de minutos hasta horas, resultando en la gelificación del sol y el atrapamiento o inmovilización de la biomolécula^[8].

El gel inicialmente es suave y tiene un alto contenido de agua (50-80%) y poros de gran tamaño (arriba de 200 nm de diámetro). La maduración de cadenas de sílice con un alto contenido de agua favorece la condensación y fortalece las redes. Durante esta fase, una parte del alcohol atrapado y el agua resultante de las reacciones de hidrólisis y condensación iniciales serán removidos de la matriz, causando encogimiento del 10 al 30%, los poros disminuyen de tamaño en una proporción del 25% y la proporción relativa de los grupos siloxano y silanol se incrementa.

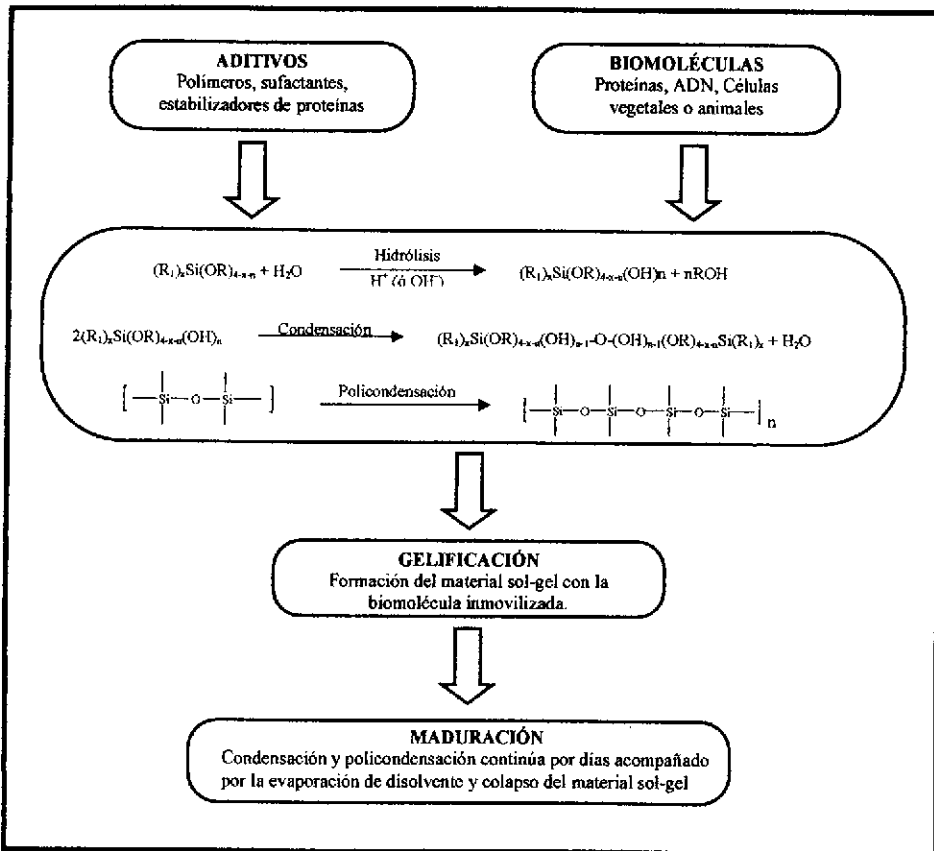


Figura 3.6 Método empleado para inmovilizar biomoléculas dentro de matrices orgánicas e inorgánicas por la vía sol-gel^[8].

Finalmente, el material es parcialmente secado resultando en la pérdida de la mayoría del agua intersticial, además del entrecruzamiento de la matriz, colapso de los poros hasta un intervalo de 2-20 nm y un encogimiento global del material que puede llegar hasta 85% del volumen inicial^[8].

3.2.5.2 Interacciones de la Biomolécula con su Entorno. El material finalmente obtenido, ya sea en el estado de hidrogel o de xerogel, está constituido por un esqueleto sólido nano o microestructurado dentro del cual están confinadas las biomoléculas. El esqueleto está permeado por una estructura porosa conformada por cavidades o jaulas en forma de botella, interconectadas por canales de dimensiones variables^[37]. Los estudios realizados han demostrado que, dependiendo de los precursores y protocolo empleados, es posible encapsular irreversiblemente pequeñas proteínas

de peso molecular entre 8000 y 15000 daltons (elipsoides de 1.3-1.7 nm de diámetro). Las hipótesis para explicar el atrapamiento de estas pequeñas moléculas suponen que, al adicionar la proteína al sol, se establecen un gran número de interacciones proteína-oligómeros a través de los múltiples grupos con propiedades donador-receptor de protones en la superficie de la biomolécula y los grupos silanol de los agregados poliméricos. De esta manera, las moléculas dopantes sirven como núcleos de condensación acelerando la formación de la red y actuando como una plantilla o templante estructural, alrededor del cual se desarrolla el esqueleto del gel dejándolas atrapadas en una jaula de polímero inorgánico. En la etapa de secado, el gel se encoge y los poros se contraen, pero aquellos que contienen proteína se comportan de manera diferente. Estos poros reducen su tamaño en menor proporción conformándose a las dimensiones de la molécula dopante. Al mismo tiempo, la biomolécula sufre ligeros cambios conformacionales a medida que se adapta al nuevo microambiente que la rodea^[21].

Las observaciones realizadas sugieren que la estructura de un gel dopado con biomoléculas es tal que éstas quedan capturadas en su poro respectivo, sin posibilidad de difundir o realizar movimientos globales (plegamientos, desplegamientos, rotación), pero con suficiente holgura para llevar a cabo transiciones conformacionales locales. En efecto, se ha demostrado que el encapsulamiento estabiliza a las biomoléculas manteniéndolas en el estado que tenían al momento de la gelación; así, si éstas estaban en el estado plegado o conformación nativa, se mantienen en esta configuración aún en presencia de agentes desnaturalizantes como el metanol o al ser sometidas a temperaturas elevadas (hasta 70°C) por cortos periodos de tiempo^[21, 26, 38, 39]. Así mismo, se ha confirmado que la agregación de las proteínas no ocurre cuando el gel dopado se sumerge en alcohol puro. La reducida movilidad de las biomoléculas encapsuladas es sin duda la causa de su mayor estabilidad. Sin embargo, dado que la movilidad segmental no está impedida, la funcionalidad biológica característica de la proteína (catálisis, enlazamiento de sustratos, etc.) puede expresarse. Por otra parte, las dimensiones de los poros, aún en el caso de los xerogeles densos (poros de 0.5-4 nm de diámetro), junto con la gran conectividad de la estructura porosa, permiten la entrada y el tránsito de solutos pequeños al interior del material. Con xerogeles con poros más grandes (2-20 nm de diámetro) y con hidrogeles (4-100 nm de diámetro) es posible la difusión de especies mucho más grandes como proteínas, anticuerpos, RNAasas, e incluso de partículas tan grandes como los virus. Es importante subrayar que, aún en este último caso, la biomolécula encapsulada no se fuga de su poro. Esto hace suponer que existe interpenetración de algunas partes de la molécula dopante y el

esqueleto del polímero, además, probablemente existen interacciones de enlazamiento (puentes de H) entre la molécula y los silanoles superficiales de la pared del poro^[14, 21].

En resumen el modelo que se propone para explicar las propiedades y comportamiento observados en geles dopados con biomoléculas es el siguiente^[14, 21, 40]:

- 1) La especie biológica reside en una cavidad del polímero cuyo interior ha sido estructurado de tal forma que se adapta física y químicamente a las características superficiales de la molécula dopante.
- 2) Existe una interpenetración sustancial de segmentos de la biomolécula y el esqueleto del polímero sol-gel dando como resultado grados variables de inmersión.
- 3) La molécula se encuentra rodeada o solvatada por una capa de solvente que la separa de la pared del poro.
- 4) La rotación y transiciones conformacionales globales de la biomolécula están más o menos restringidos dependiendo del grado de contracción del poro durante la maduración y secado del gel y de las interacciones dopante-polímero que se establecieron.
- 5) La accesibilidad al sitio activo de la biomolécula y la libertad para que ésta efectúe algunos rearrreglos conformacionales locales son suficientes para permitir la entrada, reconocimiento y procesamiento de sustratos, de manera similar a como actúa la biomolécula libre en solución.

3.3 PROTEÍNAS

Las proteínas son las moléculas orgánicas que más abundan en los animales y juegan un papel importante en todos los aspectos de la estructura y función celular. Las proteínas son biopolímeros de los α -aminoácidos y sus propiedades físicas y químicas están determinadas por la secuencia de aminoácidos que las constituyen. Las subunidades individuales de aminoácidos se unen por enlaces amida, llamados enlaces peptídicos^[41].

Las proteínas tienen una amplia gama de propiedades estructurales y catalíticas como resultado de una gran diversidad en la secuencia de los aminoácidos que las forman. Pueden clasificarse de acuerdo a su composición química, su función o forma. Las proteínas se agrupan en simples y conjugadas de acuerdo a su composición química. Las proteínas simples son aquellas que se hidrolizan para dar solo aminoácidos (*Tabla 3.2*).

Tabla 3.2 Ejemplos de proteínas simples^[42].

PROTEINA	PROPIEDADES	EJEMPLOS
Albúminas	Son solubles en agua y coagulables por calor.	Ovoalbúmina en la clara del huevo Albúmina sérica en sangre
Globulinas	Son insolubles en agua, pero solubles en soluciones salinas diluidas y coagulables por calor	Globulina sérica en sangre
Albuminoides	Solo se disuelven por ebullición en ácidos fuertes.	Queratinas del pelo y tejidos córneos Elastinas de los tendones y las arterias Colágenos de la piel y los tendones.
Histonas	Son de reacción básica, solubles en agua e insolubles en amoníaco diluido y muy poco coagulables por calor.	Histona del timo Hemoglobina

En tanto que las proteínas conjugadas están enlazadas con un grupo no peptídico como azúcares, ácidos nucleicos, lípidos o algún otro tipo de molécula. La parte no peptídica de una proteína conjugada se llama grupo prostético, en la *Tabla 3.3*, se muestran algunos ejemplos de proteínas conjugadas^[41].

3.3.1 Clasificación^[41] Las proteínas se clasifican en proteínas fibrosas y proteínas globulares según la forma que adoptan: filamentos largos o enrollamiento sobre sí mismas. Las proteínas fibrosas son largas y delgadas, tenaces y, por lo general, insolubles en agua. Funcionan principalmente como partes estructurales de los organismos, tal es el caso de la queratina de las uñas y el colágeno de los tendones. Las proteínas globulares están enrolladas en forma casi esférica, funcionan como enzimas, hormonas o proteínas de transporte, como el caso de la insulina, la ribonucleasa, las albúminas y la hemoglobina, entre otras.

Tabla 3.3 Clases de proteínas conjugadas.

CLASE	GRUPO PROSTÉTICO	EJEMPLO
Glucoproteínas	Carbohidratos	Globulina γ , Interferón
Nucleoproteínas	Ácidos nucleicos	Ribosomas, Virus
Lipoproteínas	Grasas, Colesterol	Lipoproteína de alta densidad
Metalproteínas	Metal complejo	Hemoglobina, Citocromos

3.3.2 Estructura. Las proteínas constan de un esqueleto formado por la secuencia repetida de los grupos nitrógeno-carbono alfa y carbonilo. Los enlaces que se forman y la secuencia de residuos de aminoácido y puentes disulfuro en cada proteína se conocen como su estructura a nivel primario. Esta se debe a los enlaces covalentes de la molécula. Todas las propiedades de las proteínas están determinadas, en forma directa o indirecta, por la estructura primaria. Cualquier doblez, puente de hidrógeno o actividad catalítica depende de la estructura primaria adecuada, ver *figura 3.7*.

El esqueleto central es semejante en todas las proteínas y, por tanto, el problema de cómo proporcionarle forma en el espacio tiene aspectos que son comunes a todas las proteínas. Este problema puede abordarse con énfasis en el plegamiento de cada residuo de aminoácido respecto de sus vecinos cercanos, lo que da una idea de los acomodos locales de los átomos. Las cadenas peptídicas tienden a formar arreglos ordenados unidos por puentes de hidrógeno. En especial los átomos de oxígeno del grupo carbonilo forman puentes de hidrógeno con los hidrógenos de la amina (N-H). Hay dos disposiciones en las que puede presentarse un arreglo ordenado de puentes de hidrógeno: la hélice α y la hoja plegada. Estos arreglos, en caso de estar presentes, forman la estructura secundaria de la proteína. El esqueleto covalente de una proteína posee una secuencia de enlaces que restringe de modo importante su movilidad a diferencia de otros polímeros.

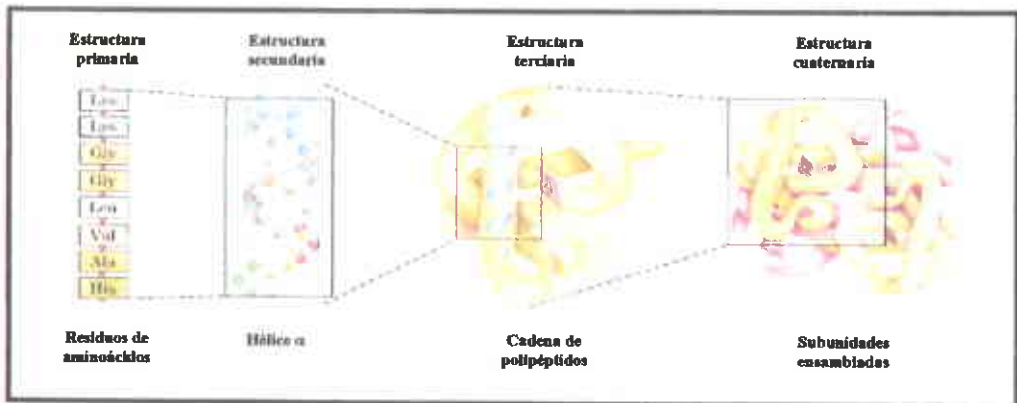


Figura 3.7 Comparación esquemática de los niveles de estructura de una proteína. La estructura primaria se refiere a los enlaces covalentes, incluyendo la secuencia de aminoácidos y los puentes disulfuro. La estructura secundaria se refiere a las zonas de hélice α , hoja plegada o espiral al azar. La estructura terciaria se refiere a la conformación general de la molécula. La estructura cuaternaria es la asociación de dos o más cadenas peptídicas para formar la cadena activa.

La estructura terciaria de una proteína es su conformación tridimensional completa y comprende a la estructura secundaria y a las transiciones entre ella.

La estructura cuaternaria se refiere a la asociación de dos o más cadenas peptídicas en la proteína completa. Por ejemplo, la hemoglobina, que es el portador de oxígeno en la sangre de los mamíferos, consiste de cuatro cadenas peptídicas acopladas entre sí para formar una proteína globular.

3.3.3 Desnaturalización de las proteínas^[41]. Para que una proteína sea biológicamente activa, debe tener la estructura correcta en todos los niveles. La secuencia de aminoácidos debe ser correcta, con los puentes disulfuro correctos uniendo las cisteínas de las cadenas. Las estructuras secundaria y terciaria también son importantes. La proteína debe estar plegada en su conformación natural, con las zonas adecuadas de hélice α y de hoja plegada. Para una enzima el sitio activo debe tener la conformación puntual, con los grupos funcionales de las cadenas laterales en sus posiciones correctas. Las proteínas conjugadas deben tener los grupos prostéticos adecuados, y las proteínas formadas por varias cadenas polipeptídicas la combinación exacta de polipéptidos individuales. Con excepción de la estructura primaria covalente, todos los niveles de estructura se mantienen por solvatación débil y por las fuerzas de los puentes de hidrógeno. Cambios pequeños en el ambiente pueden generar un cambio químico o conformacional que origina la desnaturalización: pérdidas de la estructura normal y de la actividad biológica. Muchos factores pueden ocasionar la desnaturalización, pero los más comunes son la temperatura y el pH.

3.4 Proteínas Plasmáticas

Las proteínas plasmáticas son un grupo de proteínas al cual pertenecen las albúminas, globulinas y el fibrinógeno, dichas proteínas participan en la nutrición, el equilibrio electrolítico y ácido-base, los mecanismos de transporte, la coagulación, la inmunidad y la acción enzimática^[42]. La albúmina es el nombre con el cual se denomina a la albúmina sérica o albúmina plasmática, también es un término empleado para definir a un grupo de proteínas solubles en agua.

Las albúminas séricas son las proteínas más abundantes en el plasma sanguíneo, conforman cerca del 60% de las proteínas totales con una concentración de 42 g/L y contribuyen hasta en un 80% a la presión osmótica de la sangre. Se ha determinado que la albúmina es la principal responsable del pH sanguíneo^[43]. Las albúminas han sido usadas como un modelo de proteína para diversos estudios biofísicos, bioquímicos y fisicoquímicos, ya que tienen interesantes propiedades de enlace a varios ligandos hidrofóbicos tales como ácidos grasos, bilirrubina, warfarina, triptofano, esteroides, anestésicos, etc^[44].

3.4.1 Albúmina Sérica Bovina. La albúmina sérica es la proteína más abundante en el sistema circulatorio. Las funciones fisiológicas más importantes son: regular la presión osmótica y el pH de la sangre, transportar una amplia variedad de compuestos exógenos y endógenos entre los cuales se encuentran ácidos grasos, metales, aminoácidos esteroides y fármacos. Dadas sus características, ha sido aislada de varias fuentes. La conformación de la ASB (albúmina de suero bovino) es muy parecida a la de la ASH (albúmina de suero humano) debido a que el 76% de la secuencia de aminoácidos es homóloga. Es importante destacar que la función biológica de una proteína depende de su conformación^[1, 45].

Desde el punto de vista estructural una de las principales diferencias entre las dos proteínas es que la ASB tiene dos residuos de triptofano (W131 y W214), mientras que la ASH tiene solo uno (214). El residuo adicional de triptofano en la ASB es una parte hidrofóbica que sirve para acercar la superficie de la molécula de albúmina en la segunda hélice α y el primer dominio. Su peso molecular es de 66 000 daltons. La albúmina en mamíferos es sintetizada inicialmente como preproalbúmina en el hígado; después de remover un péptido se obtiene a la proalbúmina, de ésta se remueven seis residuos de propéptido, para formar un nuevo enlace con un grupo amino y obtener finalmente a la albúmina (figura 3.8). La albúmina liberada en la circulación tiene una vida media de 19 días.

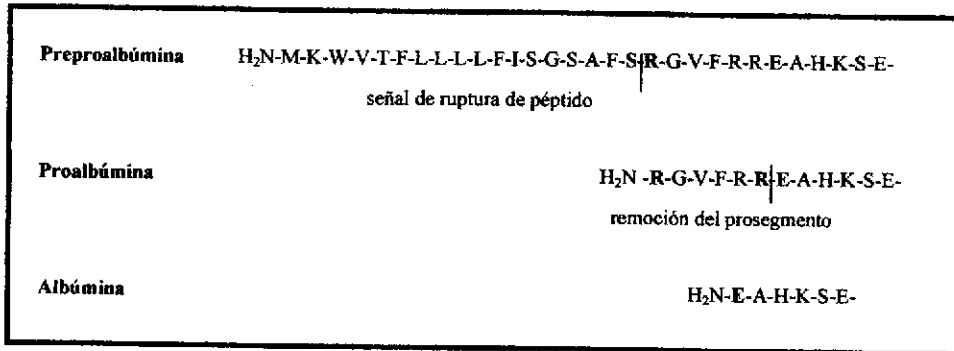


Figura 3.8 Proceso esquematizado de la síntesis de la albúmina.

Estructura de la Albúmina Sérica Bovina. De acuerdo con varios experimentos hidrodinámicos y análisis de rayos X, se postuló que la ASB tiene una estructura elipsoidal con dimensiones de 140 x 40 Å (figura 3.9).

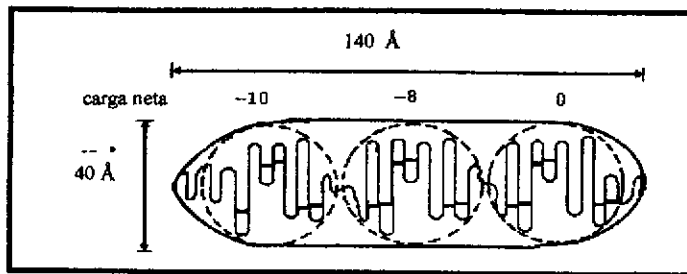


Figura 3.9 Estructura de la albúmina sérica bovina

Composición de Aminoácidos. Las albúminas se caracterizan por un bajo contenido de triptofano y metionina y un alto contenido de cisteína y aminoácidos cargados como ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y arginina. El contenido de glicina e isoleucina en la ASB es muy bajo en promedio comparado con otras proteínas

Estructura primaria, secundaria y terciaria. La molécula de ABS está formada por 606 residuos de aminoácidos y contiene al primer residuo de triptofano en la posición 131, en el subdominio IB de la molécula, el segundo residuo de triptofano está en la posición 214, en el subdominio IIA^[47]. La molécula de la albúmina sérica bovina posee tres dominios (I, II, III, figura 3.10) los cuales están divididos en nueve pliegues (L1-L9) por 17 enlaces disulfuro, las vueltas en cada dominio forman un triplete. Cada dominio en turno es el producto de dos subdominios (IA, IB, etc.). La estructura primaria de albúmina es rara entre las proteínas extracelulares ya que posee un solo grupo sulfihídrido (Cys-34) libre.

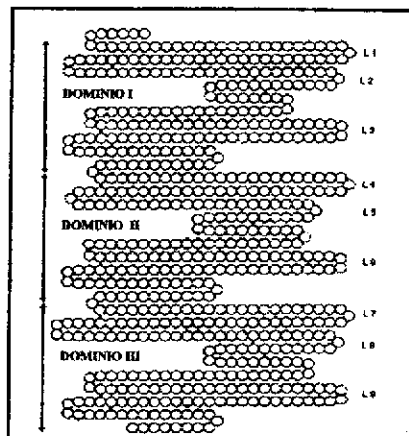


Figura 3.10 Representación de la ASB.

De acuerdo con estudios cristalográficos por rayos X, la estructura de la albúmina es predominantemente de α -hélice (67%) (*figura 3.11*). Cada uno de los dominios puede estar dividido en 10 segmentos helicoidales, 1-6 para el subdominio A y 7-10 para el subdominio B. El subdominio A se muestra en la *figura 3.12* y el subdominio B en la *figura 3.13*. Los dominios (I y II) y (II y III) están unidos creando dos largas hélices en la albúmina^[48, 49].

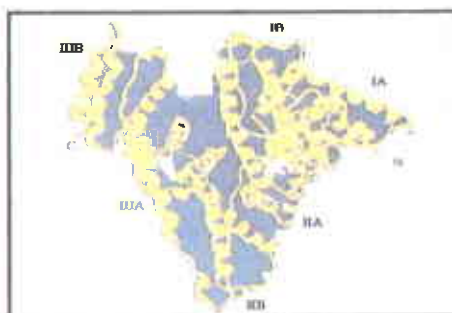


Figura 3.11 Estructura helicoidal de la ASB.



Figura 3.12 Subdominio A de la ASB



Figura 3.13 Subdominio B de la ASB

Enlaces disulfuro. En la ASB los enlaces disulfuro están localizados en las siguientes posiciones:

(1) 77-86; (2) 99-115; (3) 114-125; (4) 147-192; (5) 191-200; (6) 223-269; (7) 268-276; (8) 288-302; (9) 301-312; (10) 339-384; (11) 383-392; (12) 415-461; (13) 460-471; (14) 484-500; (15) 499-510; (16) 537-582; (17) 581-590.

Los pares de enlaces disulfuro están localizados solo exclusivamente entre los segmentos helicoidales (*figura 3.14*). Ninguno de los enlaces disulfuro es accesible para agentes reductores en el intervalo de pH de 5-6, pero pueden convertirse en sitios disponibles si el pH se incrementa o disminuye fuera de este intervalo^[48, 49].

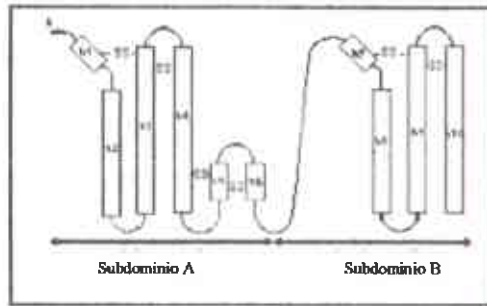


Figura 3.14 Localización de los enlaces disulfuro.

Propiedades fisicoquímicas. La molécula de la albúmina no está uniformemente cargada dentro de la estructura primaria. A pH neutro, la carga neta calculada es de -10, -8 y 0 para los dominios I, II y III respectivamente, la distribución de cargas en la superficie de la albúmina sérica bovina se muestra en la *figura 3.15*.

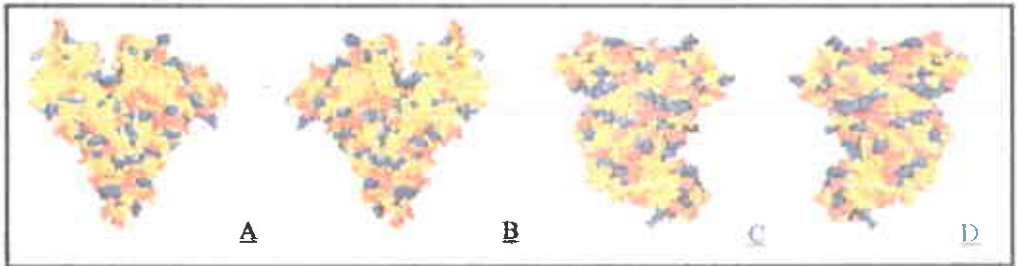


Figura 3.15 Modelo de distribución de cargas en la molécula de albúmina sérica bovina. Residuos básicos en color azul, residuos ácidos en rojo y sitios neutros en amarillo (A) vista delantera, (B) vista trasera, (C) lado izquierdo, y (D) lado derecho^[50].

Al contrario de la distribución de carga asimétrica en la estructura primaria, la distribución en la estructura terciaria parece bastante el uniforme.

Viscosidad. La viscosidad de la proteína en solución depende de sus características intrínsecas, como peso molecular, tamaño, volumen, forma, carga y facilidad de deformación. Además la viscosidad es influenciada por factores ambientales, tales como pH, fuerza iónica y temperatura. Para la albúmina sérica ha sido reportado un valor de viscosidad intrínseca de 3.7-4.2 mL/g^[46].

Efecto del calor. Cuando la albúmina sérica es tratada con calor puede pasar por dos etapas estructurales, la primera etapa es reversible, mientras que la segunda es irreversible, pero no necesariamente resulta en una completa destrucción de la estructura ordenada. Calentando por

debajo de 65°C puede conservarse en la primera etapa, sin embargo si se continúa aumentando la temperatura se pasa a la segunda etapa^[51]. La temperatura de desnaturalización reversible es de 62°C.

3.4.2 Albúmina Sérica Humana. De todos los componentes de la sangre que podrían tomar parte en la formación de complejos el más importante y más estudiado es la albúmina sérica^[44, 52]. La concentración normal de ASH en sangre es muy alta 3.5-4.5 g/100 mL y la concentración puede variar con la edad, el estrés, el ejercicio y el estado de salud. Es una proteína muy estable y consiste de 585 residuos de aminoácido, con un peso molecular calculado de 66439 daltons y una carga neta de -15 unidades a pH 7.

La AHS consta de 585 residuos de aminoácidos con solo un triptofano localizado en la posición 214 a lo largo de la cadena en el subdominio A^[53]. Su estructura secundaria está formada por un 75% de hélice α y 17 puentes disulfuro, la estructura tridimensional de la albúmina sérica humana determinada por cristalografía de rayos X revela que tiene tres dominios (I, II y III) que le confieren una forma de corazón aplastado; cada dominio está constituido por dos subdominios (IAB, IC, IIAB, IIC, IIIAB, IIIC) cada subdominio es único y presenta cierto grado de especificidad de enlace. La albúmina juega un papel importante en el transporte de ligandos endógenos y xenobióticos principalmente a través de la formación de complejos no covalentes en sitios específicos de enlace, actuando en la regulación de su concentración plasmática. La constante de disociación para el enlace de fármacos a la ASH presenta valores de 10^{-3} - 10^{-6} M^[54].

3.4.2.1. Sitios de unión. Actualmente se han caracterizado en la albúmina diferentes sitios o locus para la unión de fármacos, reconociéndose hasta cuatro locus diferentes, que se resumen en la *Tabla 3.5*.

Existe la posibilidad de que varios fármacos compitan por un mismo lugar de fijación o locus en las proteínas plasmáticas dando lugar a desplazamiento y aumento en la fracción libre de fármaco, lo que podría originar peligrosas interacciones medicamentosas.

Tabla 3.5 Locus* o sitios para la unión de fármacos en la ASH^[55].

LOCUS I (WARFARINA)	LOCUS II (DIACEPÁN)	LOCUS III (DIGOXINA)	LOCUS IV (TAMOXIFENO)
Warfarina	Benzodicepinas	Digoxina	Tamoxifeno
Nicumalona	Ibuprofeno	Acetildigitoxina	
Dicumarol	Ácido salicílico		
Clorotiazida	Naproxeno		
Furosemida	Dicloxacilina		
Bumetanida	Probenecid		
Sulfonamidas	Triptofano		
Azidocilina			
Ácido nalidixico			
Fenitoína			
Bilirubina			
Salicilamida			
Acido salicílico			
Indometacina			
Naproxeno			
Giblenclamida			

*El nombre del locus se define por el nombre del fármaco que se une de forma más selectiva.

3.4.3. Mecanismo de unión de fármacos a proteínas plasmáticas. El estudio de la unión de fármacos a proteínas plasmáticas es importante para determinar la actividad de un fármaco^[56], para describir esta interacción se puede establecer que la unión del fármaco a la proteína es un estado variable de equilibrio de enlace, mismo que involucra el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico en el organismo una vez que el fármaco ha sido administrado^[57]. El rol más importante de una proteína en un sistema biológico es su asociación con moléculas específicas y distinguir selectivamente entre varias de ellas^[58]. Esta capacidad de las proteínas puede ser evaluada determinando sus propiedades de enlace con cada ligando. Para una solución en equilibrio de proteína-ligando el primer punto básico sería obtener el número de sitios de enlace y las constantes de equilibrio para esta interacción. El método gráfico más popular para ello es el de Scatchard. Dicho gráfico usualmente proporciona el número de sitios idénticos e independientes para la asociación de ligandos en una macromolécula y su constante de disociación.

En general la albúmina sérica tienen una extraordinaria capacidad de enlace para un amplio intervalo de ligandos y muchos estudios acerca de su papel como acarreadora de sustancias fisiológicas o medicinales se han llevado a cabo.

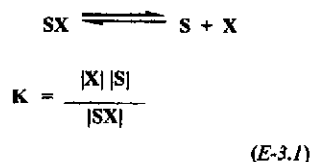
La cinética de acumulación y la información estructural de los sitios de enlace para muchas sustancias pueden contribuir al desarrollo de nuevos fármacos. Por esta razón los ligandos exógenos han sido empleados para estudiar este comportamiento. Nakamaru y Sato^[60] establecieron que el enlace de ligandos individuales se explica por la existencia de uno o dos sitios de enlace de alta afinidad (primarios) y un gran número de sitios con bajas constantes de enlace. Estos investigadores también describieron en detalle el desarrollo del modelo conceptual de tres dominios para la albúmina sérica^[59, 60].

Se sabe que la actividad farmacológica de un fármaco está estrechamente relacionada con su fracción libre en sangre, esto permite ajustar la dosis terapéutica óptima y es además un dato relevante para conocer la naturaleza de la unión fármaco-proteína^[59]. Dentro de las proteínas que juegan un rol importante en este proceso se encuentran: la Albúmina de Suero Humano y la α_1 -glicoproteína ácida (α_1 -GPA, 0.5-1.0 mg/mL en plasma, peso molecular: 40 000 daltons). La ASH es la principal responsable del enlace de fármacos de carácter ácido, mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. La α_1 -glicoproteína ácida solo tiene un sitio de enlace, que interactúa con fármacos neutros y básicos y dicho enlace está basado en interacciones hidrofóbicas^[56, 60].

En la sangre, los fármacos pueden encontrarse en estado libre, fijados a los eritrocitos o unidos a las proteínas plasmáticas. La fracción unida a las proteínas plasmáticas es inactiva y puede considerarse como fármaco en depósito. La interacción fármaco-proteínas plasmáticas disminuye la difusión y retarda la eliminación; con fármacos de intensa unión a proteínas plasmáticas se alcanzan niveles más altos en plasma cuando se administran por vía oral que por vía parenteral, ya que en este caso se fijan fuertemente a los tejidos. La combinación de los fármacos con las proteínas plasmáticas es semejante a la interacción fármaco-receptor, pudiendo considerarse a aquellas como receptores silenciosos.

Las fuerzas de unión fármaco-proteínas plasmáticas son las mismas que las de interacción fármaco-receptor: enlace covalente, enlace iónico, enlace dipolo-dipolo, puente de hidrógeno, fuerzas de Vander Waals, combinación con los grupos sulfidrilos (metales pesados). Si el fármaco se combina con un cierto número de sitios (n) en cada proteína, suponiendo que todos ellos tienen la misma afinidad por la sustancia y que no hay ningún efecto cooperativo sobre la afinidad (por ejemplo la combinación del fármaco en un punto no afecta la afinidad para el siguiente), es posible aplicar la ley de acción de masas para describir la relación entre la fracción de fármaco combinado y libre en estado de equilibrio.

Considerando el siguiente equilibrio:



donde X representa al fármaco, S es cada sitio de enlace (sitio receptor) en la proteína, SX es el complejo formado fármaco-proteína y K es la constante de disociación del complejo (las barras verticales en la ecuación (E-3.1) indican concentración de las especies respectivas). Llamando $|P|$ a la concentración total de proteína con n sitios de unión por molécula, se tendrá al equilibrio:

$$|S| = n |P| - |SX| = \text{concentración de sitios libres} \quad (E-3.2)$$

Sustituyendo (E-3.2) en (E-3.1) y acomodando:

$$\frac{|SX|}{n |P|} = \frac{|X|}{K + |X|}$$

(E-3.3)

Sea $r = |SX|/|P|$, el número de moles de fármaco combinado por mol de proteína. En el equilibrio se tendrá :

$$r = \frac{N |X|}{K + |X|}$$

(E-3.4)

La relación (E-3.4) es la ecuación típica de una isoterma de Langmuir (ver Apéndice B). Esta curva se obtiene representando en abscisas la concentración del fármaco libre y en ordenadas los moles de fármaco combinado por mol de proteína. De acuerdo con esto, la unión de fármacos a proteínas puede visualizarse como un equilibrio de distribución del fármaco entre una solución (el plasma) y un adsorbente (la proteína). Por otra parte graficando en abscisas el logaritmo de la concentración de fármaco libre y en ordenadas $100^* r/n$, se obtiene la típica curva sigmoide análoga a la curva dosis-respuesta. La ecuación correspondiente es :

$$y = 100^* r/n = \exp_{10} [\log (|X| / K + |X|)] \quad (E-3.5)$$

Generalmente se prefiere trabajar con relaciones lineales, tipo representación doble recíproca de Lineaweaver-Burk, que en el caso presente conduce a la ecuación:

$$\frac{1}{r} = \frac{K}{n(X)} + \frac{1}{n}$$

(E-3.6)

Esta ecuación permite obtener fácilmente los parámetros "n" y "K" a partir de la ordenada al origen y la pendiente de la gráfica.

Evidentemente, para que un fármaco se combine con las proteínas plasmáticas se requiere que la estructura terciaria de éstas esté intacta^[55]. Por lo tanto, si una fracción de moléculas de la proteína está desnaturalizada, la constante de disociación del complejo (K) determinada experimentalmente no reflejará la verdadera afinidad entre el fármaco y la proteína.

La mayoría de los fármacos se unen de manera reversible a un número de sitios específicos de la albúmina y hay evidencia de cambios conformacionales en la proteína inducidos por su interacción con fármacos de bajo peso molecular, estos cambios afectan aparentemente la estructura secundaria y terciaria de la albúmina^[47]. La albúmina parece ser una molécula apreciablemente flexible y capaz de adaptar la forma de sus sitios receptores a la forma molecular del ligando que se une a ella. Existen múltiples sitios de fijación, pero el número accesible parece depender del ligando particular y no todos los sitios son equivalentes. La principal interacción para formar los complejos es la hidrófoba y los compuestos hidrófobos como los ácidos grasos de cadena larga se fijan ávidamente a la albúmina humana^[42]. Por ello inicialmente fue considerada como un acarreador universal para compuestos con poca solubilidad en agua^[61].

3.4.3.1 Unión de metabolitos tóxicos a proteínas plasmáticas. La albúmina sérica bovina y la albúmina sérica humana, son proteínas que juegan un papel importante en el transporte y almacenamiento de fármacos en los vertebrados. Sin embargo, dada su capacidad de enlace, no solo puede unirse a fármacos sino también a sustancias tóxicas como pesticidas, tal es el caso del metil paratión un pesticida organofosforado ampliamente utilizado en la agricultura. Este compuesto es potencialmente tóxico y puede ser peligroso para la salud humana, puede causar una crisis colinérgica aguda por inhibición sináptica de acetilcolinesterasa. El enlace de pesticidas a proteínas plasmáticas tiene importancia toxicológica, ya que la fracción libre, y la concentración activa, da como resultado el grado y tiempo de acción en el cuerpo, así como la duración e intensidad de sus efectos. La concentración libre disponible para la acción tóxica puede ser efectivamente reducida

para pesticidas con un alto enlace a proteínas plasmáticas, aunque la afinidad de pesticidas a proteínas plasmáticas es más baja que para enzimas blanco. La competencia entre sustancias xenobióticas y endógenas por el enlace a proteínas plasmáticas puede afectar severamente la disposición de ambas sustancias, con severas consecuencias fisiológicas; en algunos casos el enlace de pequeñas moléculas es el responsable del rol protector de este tipo de proteínas, como por ejemplo la unión de la bilirrubina a toxinas exógenas reduciendo su toxicidad. El pesticida paratión (etil paratión) presenta una alta afinidad a la ASH y la ASB^[47].

3.4.4. Significación disposicional de la unión proteica. El complejo proteína-fármaco es un sistema de tránsito farmacológicamente inactivo, para el transporte de fármacos a los tejidos. Frecuentemente la concentración total de un fármaco en plasma excede su solubilidad acuosa debido a la unión proteica (por ejemplo, fenitoína, propranolol, bencilpenicilina), de este modo su distribución es más rápida.

El complejo proteína-fármaco actúa como un reservorio que suaviza las fluctuaciones de la concentración de fármaco libre en el agua del plasma y en el lugar de la acción, prolongando su actividad. Cuando la concentración de albúmina en el plasma es baja (síndrome nefrótico, malabsorción, inanición) el efecto de los fármacos disminuye.

Los fármacos ácidos pueden competir por lugares de unión específicos en la albúmina plasmática. Los fármacos ácidos con alta afinidad desplazan a los de menor afinidad provocando un aumento de la $(f_u)^2$ de este último^[62].

Las proteínas del plasma afectan la distribución de algunos fármacos al formar un complejo reversible fármaco-proteína. El fármaco complejado se comporta como una macromolécula y, como tal, no se equilibra con otros tejidos ni interactúa con sus sitios de acción. Los fármacos que se unen con las proteínas plasmáticas suelen ser compuestos liposolubles con peso molecular moderado. Muchos de ellos se unen con la albúmina en el mismo locus, por ello cuando se introducen varios de estos fármacos en el plasma, se presenta una competencia por los sitios de enlace y la cantidad total del fármaco libre aumenta. Cuando esto ocurre la respuesta farmacológica aumenta. En el plasma, la albúmina es el sitio de fijación predominante aunque hay variación considerable entre los fármacos en su grado de unión a proteínas plasmáticas. Algunos no se unen a la albúmina (por ejemplo cafeína) en tanto que otros pueden aproximarse al 100% de fijación (suramina)^[62]. Este proceso de

² Fracción no unida a proteínas plasmáticas.

unión fármaco-proteína es importante en la determinación de la eventual actividad de los fármacos una vez que entran a la circulación, estas interacciones ayudan a controlar la distribución, velocidad de excreción y toxicidad en el cuerpo. La presencia de competencia directa o indirecta entre dos fármacos o un fármaco y un compuesto endógeno (por ejemplo un ácido graso) para los mismos sitios de enlace en la proteína puede ser una fuente importante de interacciones fármaco-fármaco o de efectos de desplazamiento. Por todas estas razones, es importante tener un buen entendimiento de cómo los agentes farmacéuticos se enlazan a proteínas plasmáticas y de cómo estas interacciones son afectadas por otras sustancias^[1, 31, 63-66]. Recientemente se han desarrollado técnicas cromatográficas y electroforéticas para determinar las constantes de enlace fármaco-proteína. El método de cromatografía de afinidad emplea columnas con ASH y GPA inmovilizadas para medir el porcentaje de fármaco enlazado, basado en la correlación del tiempo de retención del soluto en la fase estacionaria con el tiempo de retención de un estándar interno^[67-74]. Sin embargo se ha observado que es difícil estudiar compuestos con muy baja afinidad (<50%) o muy alta afinidad (>95%). La razón de ello son los tiempos de retención muy cortos o muy largos, respectivamente, y la existencia de interacciones inespecíficas de los fármacos con la matriz del soporte^(56, 58, 75).

3.5 Caracterización de Materiales

La caracterización de materiales es uno de los pilares que sostiene el auge en el diseño y desarrollo de nuevas tecnologías y nuevos materiales. En virtud de que muchas de estas nuevas tecnologías están basadas en propiedades de superficie de sólidos, las técnicas de estudio de superficies cumplen un papel primordial en esta área de la investigación^[76, 77]. En efecto, además de las propiedades básicas de los materiales como estructura, morfología, textura, color o propiedades mecánicas, cobran gran importancia en esta revolución tecnológica las propiedades electrónicas, fotoelectrónicas y las propiedades químicas de las superficies, las que han llevado a la invención de sensores, dispositivos electrónicos de orden nanométrico, de superficies antibacteriales, fotocromáticas, magnéticas o autolimpiables. Algunos de estos desarrollos recientes tienen aplicaciones en catálisis, cromatografía (soportes para columnas), preparación de muestras (extracción en fase sólida), monitoreo ambiental (sensores y biosensores), entre otras más^[78, 79].

Entre las técnicas comúnmente empleadas en la caracterización de materiales sólidos se encuentra la adsorción física (o fisisorción) de gases y vapores (adsorbatos) en sólidos (adsorbentes), útil para el estudio de la textura porosa de sólidos de todo tipo, aunque no es la única. Existen otras técnicas

como la porosimetría de mercurio, técnicas calorimétricas, difracción de rayos-X, microscopía electrónica, etc., aunque estas últimas permiten el estudio de la porosidad en un intervalo algo más restringido^[80].

3.5.1 Microscopia Electrónica^[81-84]. La Microscopia Electrónica de Barrido es una de las técnicas más versátiles para la visualización y el análisis de las características microestructurales de muestras sólidas, debido, principalmente, a su elevada resolución (alrededor de 2 nm) y a su gran profundidad de campo, lo que permite una visualización tridimensional. Esta técnica abarca un amplio espectro de las áreas a estudiar, como la determinación morfológica de materiales, estudio de estados de agregación, estudio de microestructura de metales, determinación de cambios de composición, estudio de superficie, capas finas e interfases, identificación de minerales de pequeño tamaño, determinación de estratos en restauración, y un sin fin de aplicaciones.

3.5.1.1 Microscopio Electrónico^[85]. La potencia amplificadora de un microscopio óptico está limitada por la longitud de onda de la luz visible. El microscopio electrónico utiliza electrones para iluminar un objeto. Dado que un haz de electrones tiene una longitud de onda mucho menor que la luz, puede mostrar estructuras mucho más pequeñas. La longitud de onda más corta de la luz visible es de alrededor de 4000 Å. La longitud de onda del haz de electrones que se utiliza en los microscopios electrónicos es de alrededor de 0.5 Å.

Todos los microscopios electrónicos cuentan con varios elementos básicos. Disponen de un cañón que emite los electrones que chocan contra el espécimen, creando una imagen aumentada. Se utilizan lentes magnéticas para crear campos que dirigen y enfocan el haz de electrones, ya que las lentes convencionales utilizadas en los microscopios ópticos no funcionan con los mismos. El sistema de vacío es una parte relevante del microscopio electrónico. Los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire, de forma que debe hacerse un vacío casi total en el interior de un microscopio de estas características. Por último, todos los microscopios electrónicos cuentan con un sistema que registra, o muestra, la imagen que producen los electrones.

3.5.1.2 Tipos de Microscopios Electrónicos^[85, 86]. Hay dos tipos básicos de microscopios electrónicos: el microscopio electrónico de transmisión (MET) y el microscopio electrónico de barrido (MEB). Un MET dirige el haz de electrones hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una

imagen aumentada del espécimen. Para utilizar un MET debe cortarse la muestra en capas finas, no mayores de un par de miles de ángstroms. Se coloca una placa fotográfica o una pantalla fluorescente detrás del objeto para registrar la imagen aumentada. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces. Un microscopio electrónico de barrido crea una imagen ampliada de la superficie de un objeto. No es necesario cortar el objeto en capas para observarlo con un MEB, sino que puede colocarse en el microscopio con muy pocos preparativos. El MEB explora la superficie de la imagen punto por punto, al contrario del MET, que examina una gran parte de la muestra cada vez^[83]. En el nivel más simple, un microscopio electrónico de barrido proporciona imágenes de morfología externa, mientras que el de transmisión informa sobre la estructura interna de los sólidos y permite el acceso a detalles microestructurales o ultraestructurales.

Algunas características que diferencian entre los microscopios ópticos y los electrónicos residen en que las longitudes de onda de la luz y del haz de electrones difieren por un factor de varios miles, por lo que como λ es menor para la microscopía electrónica, la resolución y la profundidad de campo serán mucho mayores. Además, los electrones utilizados para obtener las imágenes son dispersados más fuertemente por los gases que la luz, por lo que es necesario evacuar el camino de los electrones en alto vacío a unas presiones menores de 0.001 Pa. Como las lentes en los microscopios electrónicos son simples campos magnéticos, el paso de los electrones a través de ellos no supone un cambio notable en el índice de refracción. No es posible corregir ni compensar los efectos de las aberraciones cromáticas y acromáticas mediante combinaciones de lentes, aunque pueden ser virtualmente eliminadas utilizando haz de electrones con un intervalo muy pequeño de longitudes de onda. De hecho, utilizando un tamaño óptimo de apertura es posible resolver dos puntos situados a 0.1–0.2 nm, que es aproximadamente la separación de átomos en un sólido y como los electrones tienen carga, se abre la posibilidad de hacer un barrido. El sistema más utilizado para la producción de un haz de electrones es el de la emisión termoiónica desde un filamento caliente, normalmente wolframio a 2700 K. Los electrones emitidos son acelerados mediante una diferencia de potencial de entre 10 y cientos de kilovoltios, para generar un haz de electrones de energía controlada y, por tanto, de longitud de onda perfectamente delimitada. Una característica importante de este tipo de cañón es que los electrones emitidos se cruzan en un punto de su camino por lo que el propio cañón actúa como una lente al focalizar los electrones. El diámetro del haz depende del área del filamento y se puede controlar mediante la diferencia de potencial. El microscopio electrónico de

barrido es similar al de transmisión por el hecho de que ambos emplean un haz de electrones para iluminar las muestras. Esto significa que ciertas características como la fuente de electrones, las lentes condensadoras y el sistema de vacío son similares en ambos instrumentos. Sin embargo, la forma en que las imágenes son producidas y aumentadas es totalmente diferente. Mientras que el microscopio de transmisión proporciona información acerca de la estructura interna de las muestras, el microscopio electrónico de barrido se utiliza principalmente para estudiar la superficie o la estructura cercana a la superficie de muestras más gruesas, por lo que resulta evidente que es mucho más fácil interpretar este tipo de imagen que una de transmisión.

El microscopio electrónico de barrido, con sus componentes principales consta de un haz de electrones que pasa a través de las lentes condensadoras y de objetivo, el haz recorre la muestra, mientras que un detector cuenta el número de electrones secundarios de baja energía emitidos por cada punto de la superficie. Al mismo tiempo se utiliza el foco de un tubo de rayos catódicos para proporcionar contraste a la imagen, *figura 3.16*.

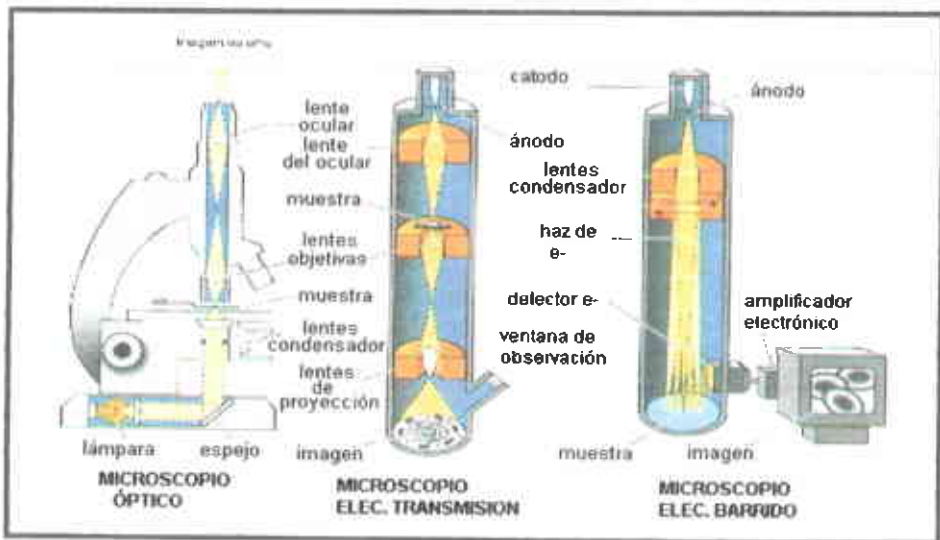


Figura 3.16 Tipos de microscopios^[87]

Se han desarrollado otros tipos de microscopios electrónicos. Un microscopio electrónico de barrido y transmisión (MEBT) combina los elementos de un MEB y un MET, y puede mostrar los átomos individuales de un objeto. El microanalizador de sonda de electrones, un microscopio electrónico

que cuenta con un analizador de espectro de rayos X, puede analizar los rayos X de alta energía que produce el objeto al ser bombardeado con electrones. Dado que la identidad de los diferentes átomos y moléculas de un material se puede conocer utilizando sus emisiones de rayos X, los analizadores de sonda de electrones no sólo proporcionan una imagen ampliada de la muestra, como hace un microscopio electrónico, sino que suministran también información sobre la composición química del material. En los microscopios de sonda de barrido se utiliza una sonda que recorre la superficie de una muestra, proporcionando una imagen tridimensional de la red de átomos o moléculas que la componen. La sonda es una afilada punta de metal que puede tener un grosor de un solo átomo en su extremo. Un tipo importante de microscopio de sonda de barrido es el microscopio de túnel de barrido (MTB) desarrollado en 1981. Este microscopio utiliza un fenómeno de la física cuántica, denominado efecto túnel, para proporcionar imágenes detalladas de sustancias conductoras de electricidad. La sonda se coloca a una distancia de pocos ángstroms de la superficie del material y se aplica un voltaje pequeño entre la superficie y la sonda. A causa de la poca distancia entre el material y la sonda algunos electrones se escapan a través del hueco, generando una corriente. La magnitud de la corriente del efecto túnel depende de la distancia entre la superficie y la sonda. El flujo de corriente es mayor cuando la sonda se acerca al material y disminuye cuando se aleja. A medida que el mecanismo de barrido mueve la sonda por encima de la superficie, se ajusta de modo automático la altura de la sonda para mantener constante la corriente del efecto túnel. Estos ajustes minúsculos permiten dibujar las ondulaciones de la superficie. Después de muchas pasadas hacia adelante y hacia atrás se utiliza una computadora para crear una representación tridimensional del material.

Otro tipo de microscopio de sonda de barrido es el microscopio de fuerza atómica (MFA), que no emplea la corriente de efecto túnel y que por lo tanto puede utilizarse también en materiales no conductores. A medida que la sonda se mueve a lo largo de la superficie de la muestra los electrones de la sonda de metal son repelidos por las nubes electrónicas de los átomos de la muestra. La altura de la sonda se ajusta de modo automático para mantener constante la fuerza recibida. Un sensor registra el movimiento ascendente y descendente de la sonda y entrega la información a una computadora, que a su vez la utiliza para dibujar una imagen tridimensional de la superficie del espécimen.

3.5.2 Determinación de Área Superficial y Tamaño de Poro. La determinación del área superficial y la distribución del tamaño de poro de los sólidos (DTP) son parámetros importantes en la caracterización de materiales sólidos, especialmente para partículas finamente divididas y materiales porosos. Estos materiales tienen valores altos de área superficial específica, por lo que los fenómenos de superficie e interfase (adsorción, adhesión, agregación, reacciones químicas y dispersión en líquidos) están regidos por el área superficial. La determinación del área superficial de un sólido es necesaria para entender las propiedades y los fenómenos de interfase en sólidos. La medida del área superficial es realizada en varios campos industriales como: cerámicas, pigmentos, catalizadores, materiales electrónicos, materiales de construcción, adsorbentes, cosméticos, medicamentos^[89, 90].

La determinación de la DTP de sólidos porosos es importante para el análisis de la estructura de poro, ya que afecta las propiedades de adsorción, permeabilidad, difusión de gases y iones, conductividad térmica y fuerza. Han sido propuestos muchos métodos para determinar la distribución del tamaño de poro y en la actualidad hay equipos automatizados con este fin. Sin embargo, debe tenerse en consideración que la mayoría de los métodos asume el modelo de poro simple, por ejemplo el modelo de poro cilíndrico, aunque en algunos casos sea muy diferente de la forma real de los poros. Además, puesto que todos los métodos tienen un límite de detección inferior y superior para el tamaño de poro, la elección de la técnica para determinar dicho parámetro dependerá de la naturaleza de la muestra de acuerdo con los principios de cada método^[88].

3.5.2.1 Aspectos Generales^[91]. La superficie de los sólidos es una región singular, que es responsable o al menos condiciona muchas de sus propiedades, *figura 3.17*.

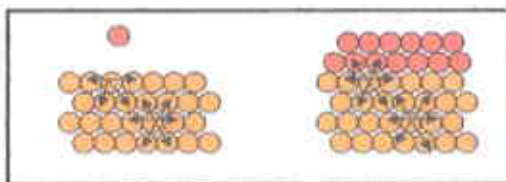


Figura 3.17 Esquema de las fuerzas de cohesión en un sólido y en un sólido con un gas adsorbido.

La *adsorción*, se define como la acumulación de material (denominado *adsorbato*) en una superficie y es muy diferente de la *absorción*, que es un fenómeno de volumen.

Tipos de adsorción:

- i) **Fisisorción:** la especie adsorbida (fisisorbida) conserva su naturaleza química
- ii) **Quimisorción:** la especie adsorbida (quimisorbida) sufre una transformación, más o menos intensa, para dar lugar a una especie distinta.

Otras diferencias:

- i) En la fisisorción, el gas se adsorbe formando capas sucesivas, mientras que en la quimisorción la adsorción queda restringida a una monocapa.
- ii) La energía de adsorción es mayor para la quimisorción que para la fisisorción, *figura 3.18.*
- iii) La fisisorción es un fenómeno más general y menos específico. La transformación química de la especie adsorbida (quimisorción) requiere una cierta energía de activación, que no es necesaria en la fisisorción, por lo que esta última suele ocurrir a temperaturas menores.

La distancia para la cual la energía del sistema respecto a la molécula a ser adsorbida es mínima se conoce como *distancia de adsorción*. Debido a que el potencial de atracción para la especie quimisorbida es mayor que la fisisorbida, la molécula estará más cerca de la superficie. La fisisorción es una etapa previa y necesaria para que ocurra la quimisorción, que tiene una mayor interacción con la superficie y, por lo tanto, menor distancia de adsorción.

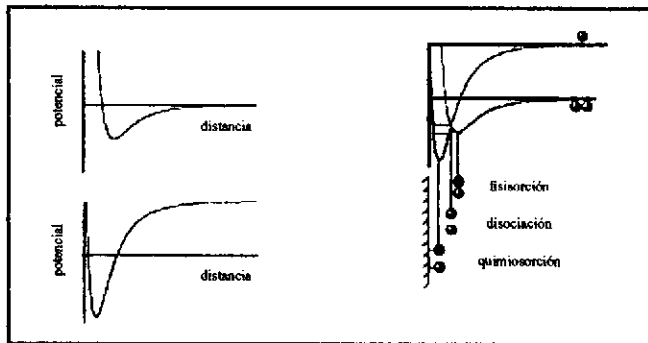


Figura 3.18 Esquema de la evolución de la energía potencial de una molécula de gas acercándose a una superficie plana. a) Fisisorción. b) fisisorción de una molécula disociada, c) fisisorción seguida de quimisorción.

3.5.2.2 Descripción cualitativa y origen de la estructura porosa^[91]. Cualquier material que contenga cavidades, canales o intersticios que son más profundos que anchos, puede ser considerado como poroso.

Terminología:

- **Volumen de poros (V_p):** volumen de los poros medido por un determinado método.
- **Tamaño de poro:** distancia entre dos paredes opuestas del poro
- **Distribución del tamaño de poros:** representado por las derivadas (dA_p/dr_p) o (dV_p/dr_p), como una función de r_p , donde A_p , V_p y r_p son el área de las paredes de los poros, el volumen y el radio de los poros.
- **Área superficial:** extensión de la superficie total determinada por un método particular, bajo ciertas condiciones establecidas.

Clasificación de los poros de acuerdo a su disponibilidad a un fluido externo:

- **Poros cerrados:** totalmente aislados de sus vecinos. Influencian propiedades macroscópicas como la densidad, fortaleza mecánica y conductividad térmica, pero son inactivos en procesos como flujo de fluidos y adsorción de gases.
- **Poros abiertos:** poseen canales continuos de comunicación con la superficie externa del material.

Las geometrías más frecuentes de los poros son (*figuras 3.19 y 3.20*):

- **Poros cilíndricos** (por ejemplo, en alúmina y óxido de magnesio).
- **Poros en forma de rendija o hendidura** (en carbones activados y arcillas).
- **Espacios o huecos** entre esferas de sólido conectadas (en sílice y otros sólidos obtenidos a partir de geles).
- **Poros en forma de bote de tinta** (ink-bottle shaped): el cuerpo del poro es mayor que su boca).
- **Poros en forma de embudo** (funnel shaped): contrario al anterior.

La IUPAC reconoce tres tipos de poros atendiendo a su tamaño:

- **Microporos**, con diámetro inferior a 2 nm.
- **Mesoporos**, con diámetros comprendidos entre 2 y 50 nm.
- **Macroporos**, con diámetros superiores a 50 nm.

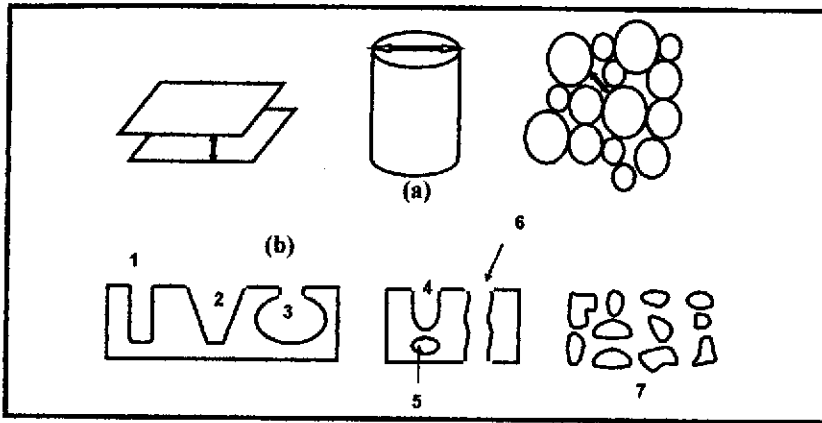


Figura 3.19 (a) Modelos comunes de poros, (b) Tipos de poros: 1. tamaño uniforme; 2. forma de embudo; 3. forma de bote de tinta; 4. poro ciego; 5. poro cerrado; 6. aislado que atraviesa el material; 7. cadena porosa.

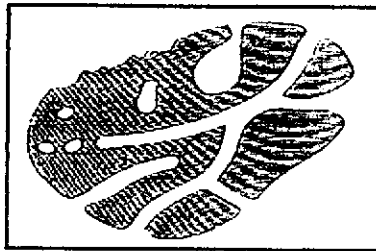


Figura 3.20 Esquema de la sección de corte de un sólido poroso.

La textura porosa surge del método de preparación de los sólidos:

- La precipitación a partir de una disolución origina partículas precursoras que se aglomeran y forman una estructura porosa.
- La cristalización hidrotérmica produce zeolitas u otros sólidos microporosos cristalinos, donde el peculiar ordenamiento de sus unidades de construcción genera cavidades intracristalinas de tamaño molecular.
- La eliminación de materias volátiles durante tratamientos térmicos.
- La disolución selectiva de algunos componentes puede producir poros.

Debe distinguirse entre los siguientes términos:

Agregado es un conjunto de partículas sueltas, no consolidadas.

Aglomerado es un conjunto rígido de partículas consolidadas.

Principales métodos para la caracterización de un sólido poroso.

Esterología. Basada en la observación directa de cortes transversales mediante su estudio por microscopía electrónica u óptica.

Dispersión de la radiación. La dispersión de la radiación por un sólido poroso provoca variaciones en la longitud de onda de la radiación dispersada.

Picnometría. La medida de desplazamiento de fluidos permite estimar la densidad aparente de un sólido.

Flujo de fluidos. Se pretende obtener la estructura porosa de un lecho de material empacado a partir de su permeabilidad a un flujo de fluido.

Métodos calorimétricos. Se basan en estudiar el cambio de entalpía que ocurre cuando una muestra se sumerge en un líquido o absorbe gases o líquidos.

Adsorción de gases. Es un método muy común, se basa en la adsorción física de un gas en una superficie sólida

Otros métodos: *Cromatografía de exclusión; RMN de Xenon.*

3.5.3 Método de Adsorción de Gases^[92]. Las medidas de adsorción de gases se utilizan ampliamente para la caracterización de una gran variedad de sólidos porosos, como óxidos, carbones, zeolitas o polímeros orgánicos. A medida que disminuye el tamaño del poro aumenta el potencial de adsorción. En el caso de que el poro sea suficientemente ancho las moléculas se irán adsorbiendo formando una monocapa y, al aumentar la cantidad adsorbida, el adsorbato se ordena en capas sucesivas (llenado en multicapas), (Figura 3.21).

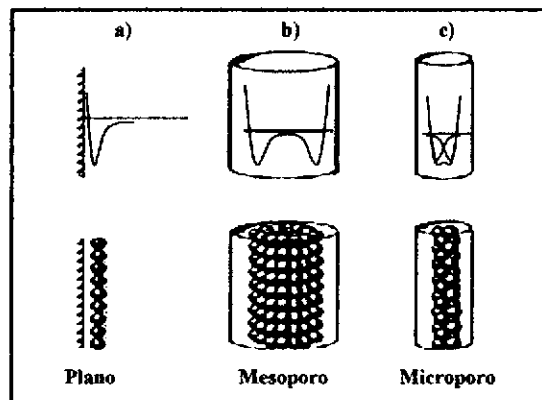


Figura 3.21 Esquema de la adsorción física en a) una superficie plana, b) un mesoporo y c) un microporo.

La cantidad de gas adsorbido a una temperatura dada para distintas presiones relativas de gas se conoce como *isoterma de adsorción*, (figura 3.22).

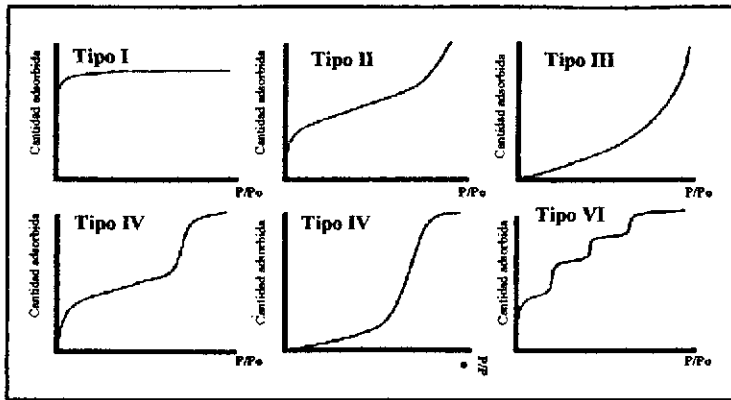


Figura 3.22 Representación esquemática de los seis tipos de isotermas de adsorción.

La isoterma *tipo I* se caracteriza porque la adsorción se produce a presiones relativas bajas. Es característica de los sólidos microporosos.

La isoterma *tipo II* es característica de sólidos macroporosos o no porosos, tales como negro de carbón.

La isoterma *tipo III* ocurre cuando la interacción adsorbato-adsorbente es baja. Ejemplo: adsorción de agua en negro de carbón grafitizado.

La isoterma *tipo IV* es característica de sólidos mesoporosos. Presenta un incremento de la cantidad adsorbida importante a presiones relativas intermedias, y ocurre mediante un mecanismo de llenado en multicapas.

La isoterma *tipo V*, al igual que la isoterma *tipo III*, es característica de interacciones adsorbato-adsorbente débiles, pero se diferencia de la anterior en que el tramo final no es asintótico.

La isoterma *tipo VI* es poco frecuente. Este tipo de adsorción en escalones ocurre sólo para sólidos con una superficie no porosa muy uniforme. Ejemplo: adsorción de gases nobles en carbón grafitizado^[92].

En la caracterización de la textura porosa de un sólido los parámetros a determinar son el área superficial (o superficie específica) y el volumen y la distribución de tamaño de poros. La distribución del tamaño de poro es una propiedad crítica de muchos materiales, cerámicas, catalizadores y productos farmacéuticos^[93].

Para la determinación de estos parámetros se puede recurrir, entre otros, a la adsorción de un gas (N₂, CO₂, hidrocarburos, etc.) a temperatura constante (para N₂ 77 K, para CO₂ 273 K, etc.), obteniéndose así la isoterma de adsorción. Dicha isoterma puede determinarse gravimétricamente (se mide la ganancia de peso experimentada por la muestra como consecuencia de la adsorción, a cada presión relativa de gas) y/o volumétricamente (la cantidad adsorbida se calcula mediante la aplicación de las leyes de los gases a la presión y volumen de adsorbato antes y después de la adsorción).

El área superficial así como el volumen y distribución de tamaño de poro puede obtenerse a partir del análisis de las isotermas de adsorción, para lo cual se han desarrollado diversos métodos. Mediante la isoterma de N₂ se obtiene información de poros desde 35 Å hasta 4000 Å, mientras que con la isoterma de CO₂ se obtiene información de la microporosidad más estrecha^[80].

3.5.3.1 Medida de la superficie específica método Brunauer-Emmett-Teller (BET)^[92]. La idea central del método BET es conocer la cantidad de gas adsorbido, necesario para formar una monocapa (figura 3.23) y de acuerdo con el área que ocupa una de estas moléculas adsorbidas es posible estimar el área del sólido^[93].

El gas adsorbido necesario para la formación de una monocapa, n_m, puede ser estimado por la siguiente ecuación E-3.7:

$$\frac{P}{n(P_0 - P)} = \frac{1}{n_m C} + \frac{C-1}{n_m} \frac{P}{P_0} \quad (E-3.7)$$

donde: P: Presión, P₀: presión de vapor, C: constante para cada temperatura y cada sistema sólido, n_m: monocapa de gas adsorbido.

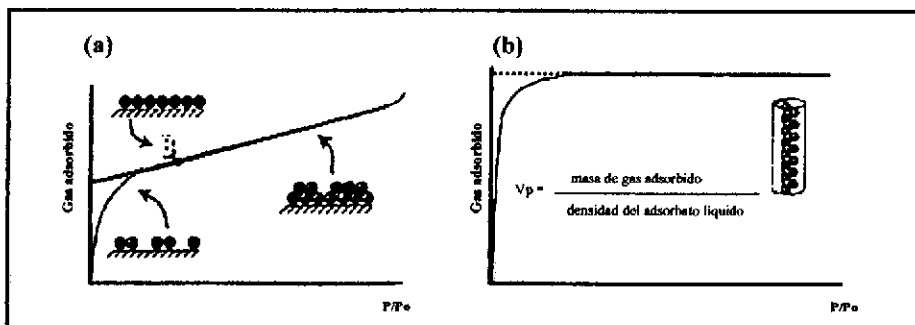


Figura 3.23 a) Isotherma en la que se muestran la zona de llenado de la monocapa, la multicapa y el punto B; y b) Isotherma tipo I en la que se señala cómo calcular el volumen de poro a partir de la cantidad máxima de gas adsorbido.

En el caso de las isothermas tipo I, el volumen de poro puede estimarse de forma sencilla:

masa total de gas adsorbido/densidad de la fase adsorbida

Otro método empleado es el método de Dubinin-Radushkevich (DR) permite obtener el valor del volumen de microporos:

$$W = W_0 \exp\left\{ \frac{K}{\beta^2 (2T \ln(P/P_0))^2} \right\} \quad (E-3.8)$$

donde: W : es el volumen adsorbido a cada presión relativa, W_0 : es el volumen de poros, K : una constante dependiente de la estructura, β : es el coeficiente de afinidad, que es el cociente entre los potenciales de adsorción de dos gases.

Este método y sus extensiones suministran una manera simple de comparar la forma de una isoterma dada con la de un sólido no poroso estándar. En el método original, la cantidad adsorbida se representa frente a t , el grosor correspondiente a la multicapa calculado a partir de la isoterma estándar obtenida con un sólido de referencia no poroso. Es esencial que las isothermas estándar se obtengan con sólidos de referencia que sean no porosos o de estructura superficial conocida. Para estos fines existe una gran variedad de adsorbatos: N_2 , O_2 , Ar, Kr, CO_2 , algunos hidrocarburos como el benceno y algunos alcanos, y alcoholos de cadena corta. Sin embargo, la adsorción de N_2 a 77 °K es la que más se utiliza ya que cubre todo el intervalo de porosidad y el gas N_2 interacciona débilmente con la mayoría de los sólidos. La microporosidad estrecha se estudia con CO_2 a 273 °K. Es necesario emplear una serie de moléculas sonda para establecer fíablemente la distribución del tamaño de microporos. Para el análisis del tamaño de macroporos se emplea la porosimetría de mercurio.

Determinación de las isothermas de adsorción. Procedimiento experimental. Para conseguir una buena limpieza de la superficie se hace fluir un gas inerte sobre el adsorbente a elevadas temperaturas. Posteriormente se realiza una desgasificación del adsorbente por exposición de la superficie a un elevado vacío.

Los procedimientos utilizados para la determinación de la cantidad de gas adsorbido se clasifican en dos categorías:

- i) aquellos que dependen de la medida de la cantidad de gas eliminado (no adsorbido) en la fase gaseosa (*método volumétrico*)
- ii) aquellos que implican la medida del gas retenido por el adsorbente. En la práctica, pueden usarse técnicas estáticas o dinámicas para determinar la cantidad de gas adsorbido.

3.5.4 Análisis Térmico. El término Análisis Térmico engloba una serie de técnicas en las cuales algún parámetro físico del sistema es medido de manera continua en función de la temperatura, mientras es sometido a una variación controlada de temperatura. Con los métodos analíticos térmicos actuales puede medirse la pérdida de peso por calentamiento, los puntos de fusión, el calor y la energía de transiciones, como también los cambios de forma, dimensiones o propiedades viscoelásticas de la sustancia. El análisis térmico tiene amplia aplicación en la caracterización de materiales, la evaluación de la pureza de sustancias medicinales, el estudio de estabildades relativas al calor y propiedades dinámicas relativas a nuevos compuestos, como también la cristalografía, cinética química y generación de diagramas de fase.

La mayoría de los procesos termodinámicos se acompañan de una pérdida de calor o requieren la adición de calor de una fuente externa. El proceso puede ser una transición de fase, la pérdida de un componente volátil o una reacción química. Cada uno de estos cambios puede ser seguido termodinámicamente por medio de la observación de un cambio de la temperatura de la muestra en estudio o de la energía con respecto al tiempo. Si la muestra pierde una sustancia volátil por evaporación, sublimación o conversión química en un gas, también es posible seguir el curso de este proceso por medio de la observación de la pérdida de peso en el tiempo, a medida que la temperatura de la muestra se incrementa a tasa constante.

Las leyes generales de la termodinámica, en especial las que gobiernan la calorimetría, sirven de base para comprender los conceptos teóricos involucrados en los diferentes métodos de análisis térmico. Los instrumentos modernos para los métodos térmicos de análisis se basan en los parámetros de masa, temperatura y flujo de calor^[42]. Los efectos del calor sobre los materiales pueden ser varios y producir cambios en muchas de sus propiedades^[93].

Las dos técnicas más importantes son la Termogravimetría (TG) donde son los cambios en peso los que configuran su base, y el Análisis Térmico Diferencial (DTA) y la Calorimetría Diferencial de barrido (DSC), donde son los cambios de energía los fundamentales^[94].

3.5.3.1 Termoporometría. El método clásico para medir la distribución del tamaño de poro es la adsorción de gas y la porosimetría de mercurio^[88, 95, 96, 97]. Una interesante técnica alternativa es la termoporosimetría que, está basada en la calorimetría de la transición líquido-sólido de un líquido confinado en poros^[88, 98]. Los puntos de congelación y de fusión de líquidos confinados en poros disminuyen si disminuye el tamaño de poro^[88].

Los hidrogeles son cadenas de polímeros que contienen en el interior de su estructura un solvente hidrofílico; basados en esta característica Jun y colaboradores reportaron que la dependencia del punto de congelación sobre el tamaño de los microcristales podría proveer un método para la determinación de la ultraestructura del sistema poroso. Usando este concepto, Defay y colaboradores^[99] establecieron un desarrollo teórico para el comportamiento de fases (equilibrio termodinámico entre las fases gas, sólido y líquido) de un líquido contenido dentro de un material poroso tomando en cuenta el efecto de la curvatura de las interfaces entre las tres fases. La temperatura de punto triple de un disolvente saturando un material poroso depende del tamaño de poro de dicho material. Una forma básica de esta dependencia consiste en emplear la ecuación de Kelvin para la condensación capilar de la transición líquido-sólido^[100, 101] considerando que el cristal induce un perturbación termodinámica sobre el equilibrio de fase; en la misma medida como lo hace una gota de las mismas dimensiones. Bajo esta condición, la ecuación de Kelvin para la transformación líquido-sólido es la siguiente:

$$\ln(T/T_0) = \frac{2v_1\gamma_{ls}}{R_p\Delta H_0} \quad (E-3.9)$$

Esta ecuación también puede ser expresada como sigue:

$$\frac{\Delta T}{T_0} = \frac{2\gamma_{ls}}{\Delta H_0} \frac{v_1}{R_p} \quad (E-3.10)$$

donde, γ_{ls} , v_1 , R_p , ΔH_0 , T , T_0 y ΔT son: la tensión interfacial líquido-sólido, el volumen molar de la fase líquida, el radio de la gota, la entalpía molar de la transición líquido-sólido, la temperatura inicial, la temperatura final y la diferencia de temperaturas. La simplificación de la ecuación es obtenida considerando que γ_{ls} , v_1 y ΔH_0 son constantes en el intervalo ΔT .

Defay y Prigogine obtuvieron una relación rigurosa para la disminución de la temperatura del punto triple. Encontraron que la temperatura del punto triple se puede determinar con la curvatura de dos de las tres interfaces. Sin embargo, en el caso de un equilibrio termodinámico que solo es gobernado por la interface líquido-sólido, el tratamiento de Dafay-Prigogine se reduce a la ecuación de Kelvin. Es importante señalar que en esta teoría se asume que la energía de transición de fase de una sustancia contenida dentro de un material poroso no cambia durante la transformación y permanece igual a la energía de transición de fase de un líquido no confinado en poros. Posteriormente, Brun y colaboradores emplearon los resultados de Defay y Prigogine para trabajar

en la relación entre la curvatura de las fases y el cambio en la temperatura del punto triple tomando en cuenta la energía de transición de la fase condensada en el material poroso. El tratamiento teórico sigue a una caracterización textural cuantitativa de un medio poroso a través del análisis térmico de la transformación líquido-sólido que ocurre dentro del medio^[101].

El equilibrio termodinámico entre las fases de una sustancia dada, puede ser descrito por la ecuación de Gibbs-Duhem.

$$S_i dT - V_i dP_i + n_i d\mu_i = 0 \quad (E-3.11)$$

Donde: S_i , V_i , n_i y μ_i son la entropía, el volumen, número de moles y el potencial químico de la fase i ; i designa gas (g), líquido (l) o sólido (s), respectivamente.

La tensión interfacial, γ_{ij} , entre las fases i y j esta dada por la ecuación de Laplace:

$$P_j - P_i = \gamma_{ij} \cdot k_{ij} \quad (E-3.12)$$

Donde k_{ij} se refiere a la curvatura entre las fases $i-j$. En el caso de una interface planar sólido-gas, la curvatura sólido-gas es igual a cero y la ecuación E-3.12 se aplica únicamente a las fases sólida y líquida, tomando la siguiente forma:

$$P_l - P_s = \gamma_{ls} \cdot k_{ls} \quad (E-3.13)$$

A la temperatura del punto triple, las tres fases de una sustancia pura están en equilibrio, así los tres potenciales químicos son iguales.

Varios mecanismos han sido propuestos para describir el proceso de solidificación en un cuerpo poroso. Los más conocidos incluyen los siguientes:

- a) la nucleación por partículas llamadas embriones, en este mecanismo la solidificación ocurre a partir de núcleos que aparecen espontáneamente y crecen en relación a la disminución de la temperatura.
- b) La solidificación por penetración progresiva de la fase sólida, en este caso, la solidificación procede por penetración progresiva de la fase sólida formada fuera del cuerpo poroso.
- c) La combinación de los dos mecanismos anteriormente descritos^[101].

Cualquiera que sea el mecanismo de solidificación, la interfase sólido-líquido se asume como esférica y la curvatura de la interfase, k_{ls} , está dada por $(-2/R_n)$, siendo R_n el radio de la fase sólida.

El radio de poro, R_p , es luego obtenido por adición a R_n de una película, p_{nc} , de la capa de moléculas que no son afectadas por la solidificación (moléculas, que están en contacto íntimo con las paredes del poro). Para la película p_{nc} , evaluada por Brun y colaboradores, en poros de alúmina con agua como líquido confinado, se encontró un valor aproximado de $8 \text{ \AA}^{(101)}$.

El modelo ilustrado en la *figura 3.24* indica que el agua que existe en el poro puede ser clasificada en dos tipos: *a)* congelable, que puede formar un cristal de hielo y *b)* no congelable, la cual no presenta la fase de transición agua-hielo o hielo-agua durante la determinación por DSC debido a fuertes interacciones con la superficie del poro. El radio de poro puede ser determinado a partir de la suma del radio de un cristal de hielo formado en un poro, R_n y la película de agua no congelable, t_{nc} [102]

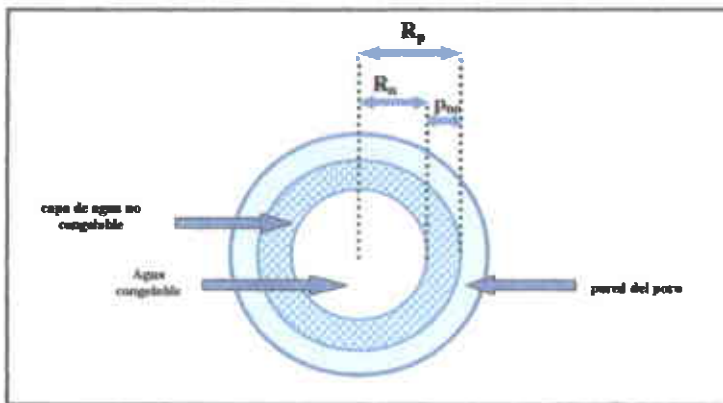


Figura 3.24 Modelo de los tipos de agua confinados en un poro. R_p , radio de poro; R_n , radio de un cristal de hielo formado en un poro; p_{nc} , película de agua no congelable adyacente a la pared del poro [102].

Finalmente el método desarrollado por Brun y colaboradores^[89] determina la distribución del tamaño de poro a partir de los termogramas de solidificación por medio de las relaciones teóricas descritas anteriormente. Las relaciones entre la depresión de los puntos de congelación o de fusión (ΔT) del agua y el radio de poro está dada por la ecuación E-3.14, para congelación y la ecuación E-3.15, para fusión^[89, 103].

$$R_p \text{ (nm)} = - \left(\frac{64.67}{\Delta T} \right) + 0.57 \quad (E-3.14)$$

$$R_p \text{ (nm)} = - \left(\frac{32.33}{\Delta T} \right) + 0.68 \quad (E-3.15)$$

Ishikiriya y colaboradores^[103] después de realizar un estudio con 12 sílicas comerciales caracterizadas por termoporometría, intrusión de Hg y adsorción-desorción de N₂, propusieron las siguientes ecuaciones (3.16 - 3.19) para determinar el radio de poro a partir de curvas de congelamiento:

$$R_p = \frac{\alpha}{|\Delta T|} + \beta \quad (E-3.16)$$

Dado que el agua contenida en el poro consta de una capa de agua adsorbida no congelable de espesor β y la fase líquida congelable, la ecuación E-3.16 permite calcular el radio de poro a partir del abatimiento de la temperatura de fusión del hielo en el poro. Las ecuaciones E-3.17 y E-3.18 fueron obtenidas para el coeficiente α asumiendo un poro cilíndrico^[103].

$$\alpha (T) = 56.36 - 0.9024 |\Delta T| \quad (\text{congelación}) \quad (E-3.17)$$

$$\alpha (T) = 33.30 - 0.3181 |\Delta T| \quad (\text{fusión}) \quad (E-3.18)$$

Los valores de β encontrados por Ishikiriya y colaboradores, para las sílicas en estudio variaban entre 0.3-1.3 nm, siendo poco dependiente de la forma asumida para el poro. Finalmente si se asume un valor de β de 1 nm, sustituyendo este valor y la ecuación E-3.17 en E-3.16, se obtiene^[103, 104]:

$$R_p (\text{nm}) = \frac{56.36}{\Delta T} + 0.1 \quad (E-3.19)$$

Esta ecuación (E-3.19) puede ser utilizada para transformar la escala de temperatura de un termograma en una escala de radio de poro.

El volumen de poro es estimado a partir de la energía aparente (W_a) de congelación o fusión del agua. Estos valores son obtenidos para congelación a partir de la ecuación (E-3.20) y para fusión a partir de la ecuación (E-3.21)^[89].

$$W_a (\text{Jg}^{-1}) = - 5.56 \times 10^{-2} \Delta T^2 - 7.43 \Delta T - 332 \quad (E-3.20)$$

$$W_a (\text{Jg}^{-1}) = - 0.155 \Delta T^2 - 11.39 \Delta T - 332 \quad (E-3.21)$$

Usualmente, el agua es empleada como el líquido que se condensa en los poros, debido a que muestra un valor alto de calor latente en la transición líquido-sólido comparado con otros líquidos.

La ventaja de la termoporometría es que el análisis de la estructura porosa puede ser realizado en ambientes húmedos, por lo que es apropiado para el estudio de hidrogeles y materiales rígidos porosos, ya que la forma y estructura de los agregados de materiales poliméricos cambia con el proceso de secado. Los termogramas son obtenidos a partir de un Calorímetro Diferencial de Barrido, empleando una velocidad de calentamiento muy lenta ($0.1-1.0 \text{ K min}^{-1}$) para mantener el equilibrio^[89].

3.6 Caracterización del comportamiento de adsorción de lechos empacados por análisis frontal^[105].

Durante el proceso de análisis frontal, a medida que la solución es introducida en el cartucho, el fármaco va ocupando los sitios de adsorción en la proteína encapsulada, de acuerdo con su equilibrio de distribución. La fracción de soluto no retenido en la primera sección del cartucho, avanza con la fase móvil a la siguiente sección donde nuevamente se establece el equilibrio de distribución. Después de cierto tiempo, que depende de las condiciones experimentales (velocidad de flujo, volumen percolado, concentración del soluto), el avance del soluto en el cartucho toma la forma de un frente de concentración que se desplaza en la dirección axial, tanto en la fase móvil como en la fase estacionaria. La migración del frente va acompañada de una dispersión que refleja la cinética del proceso, por lo que el frente (también llamado zona de transición) se extiende progresivamente a lo largo del eje del cartucho adquiriendo un perfil sigmoideal. Cuando el frente emerge del cartucho la concentración del soluto en el efluente aumenta hasta alcanzar el mismo nivel que la concentración en el influente. En la *figura 3.25* se muestra una típica curva de análisis frontal, obtenida al graficar la concentración relativa del soluto en el efluente (C/C_0 , donde C es la concentración de soluto en el efluente y C_0 es la concentración en el influente), en función del volumen de solución percolado a través del cartucho. Los volúmenes característicos de esta curva, V_f , V_s y V_e (asociados a los puntos "f", "s" y "e") indican el volumen de fuga, el volumen estequiométrico y el volumen de equilibrio. El volumen de fuga corresponde al volumen de solución percolado (V_p) después del cual una fracción creciente de analito deja de ser retenida en el cartucho; este volumen es muy importante en los procesos de extracción en fase sólida pues, para una recuperación cuantitativa del analito, se requiere que $V_p < V_f$. El volumen estequiométrico tiene un significado termodinámico, representa el volumen de retención que tendría el soluto si se realizará una inyección analítica de éste en el cartucho, usando como fase móvil una solución de la misma

composición que la solución percolada (pero obviamente sin el analito). Finalmente, el volumen de equilibrio es aquél a partir del cual se cumple que todo el adsorbente contenido en el cartucho está en equilibrio con la solución percolada. Es importante señalar que, si el proceso tuviera una cinética infinitamente rápida, el frente sería una línea vertical (llamado frente estequiométrico) que emergería del cartucho en el volumen V_s . En dicho caso (hipotético) V_s sería a la vez el volumen de fuga y el volumen de equilibrio.

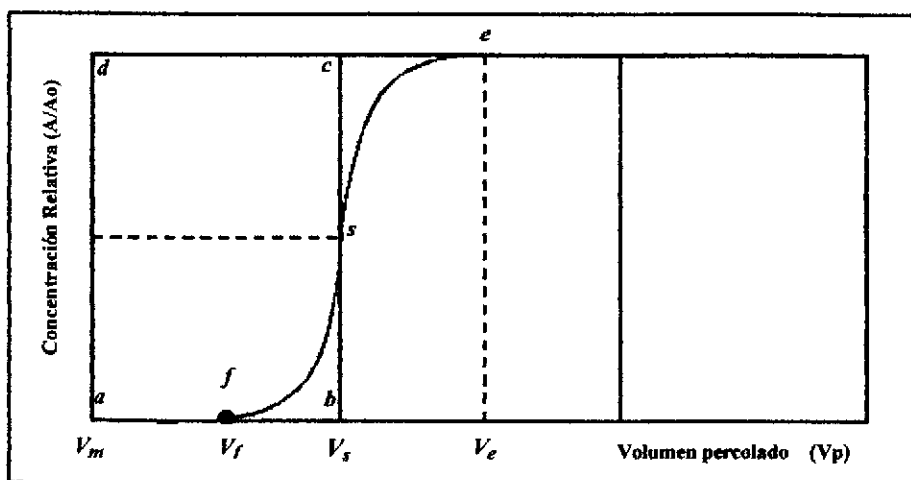


Figura 3.25 Curva característica de Análisis Frontal. Los puntos característicos: "f", "s" y "e" representan los puntos de fuga, estequiométrico y de equilibrio, respectivamente. A estos puntos se encuentran asociados los volúmenes V_f , V_{est} , y V_{eq} . El volumen muerto de la columna o cartucho está representado por V_m .

Las curvas de análisis frontal proporcionan información interesante para la evaluación cualitativa y cuantitativa del comportamiento de retención de un lecho empacado. Desde el punto de vista cualitativo, la forma y la extensión de la zona de transición, $\Delta V_{zt} = V_e - V_f$, son indicativos de la calidad del empacado y del empaque. Un lecho homogéneamente empacado, sin canales de flujo preferenciales y con sitios de adsorción homogéneamente repartidos en el soporte, conduce a un frente perfectamente simétrico, donde el centro de masa o punto estequiométrico se encuentra situado exactamente a la mitad de la altura del frente. Si además las partículas del empaque son muy pequeñas y de tamaño muy regular, la dispersión del frente es mínima y los volúmenes de fuga y de equilibrio se acercan al volumen estequiométrico. Sin embargo, la cinética de adsorción-desorción también influye en el grado de dispersión del frente; una cinética lenta conjugada con una velocidad

de flujo elevada conduce a una zona de transición muy dispersa y, eventualmente, a la no formación del frente. Esto último significa que la longitud de lecho empacado no es suficiente para contener al frente y por lo tanto se observa una fuga importante del soluto desde el inicio del proceso.

En lo que se refiere a aspectos cuantitativos, la curva de análisis frontal puede explotarse según se explica a continuación. Para cualquier punto "f" en el frente (por ejemplo, $t = s$ en la figura 3.25) se puede trazar una línea vertical que define un rectángulo (*abcd* en la figura 3.25), cuya área es proporcional a la cantidad de soluto percolado hasta dicho punto. Dentro de este rectángulo, el área sobre la curva del frente (área enmarcada por los puntos *afscd*) es proporcional a la cantidad de soluto retenido, mientras que el área bajo la curva (área enmarcada por los puntos *fsb*) es proporcional a la cantidad de soluto no retenido. Cuando el punto "f" es el correspondiente al volumen de fuga (o sea punto "f"), el área bajo la curva es nula y todo el soluto percolado ha sido retenido. En este caso se tendrá:

$$q_{ad(t)} = (V_f - V_m) C_0 \quad (E-3.22)$$

donde:

$q_{ad(t)}$ = cantidad retenida al punto de fuga

V_m = volumen muerto del cartucho

Si el frente es perfectamente simétrico la línea vertical trazada en el punto "s" divide al frente de tal manera que el área bajo la curva entre los puntos s-f es igual al área sobre la curva entre los puntos s-e (áreas marcadas en gris en la figura 3.25). Por esta razón, cuando se considera el punto de equilibrio "e", el área sobre la curva (enmarcada por los puntos *afsed*) es igual al área del rectángulo definido por el frente estequiométrico (es decir, el rectángulo *abcd*). De esta manera, la cantidad de soluto retenido en el punto de equilibrio, o sea la máxima cantidad de soluto que puede retenerse en la columna o cartucho bajo las condiciones experimentales usadas, se calcula fácilmente por la siguiente ecuación:

$$q_{ad(e)} = (V_s - V_m) C_0 \quad (E-3.23)$$

donde: $q_{ad(e)}$ es la cantidad retenida al equilibrio.

IV. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar un biomaterial con albúmina de suero bovino (ASB) inmovilizada por el método sol-gel para su empleo como adsorbente de afinidad en el estudio de la interacción de fármacos con proteínas plasmáticas. Además de caracterizar de su comportamiento químico en sistemas de flujo; así como sus propiedades físicas por diversas técnicas.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar geles con ASB inmovilizada a dos diferentes valores de pH: 5 y 7, para determinar las condiciones de encapsulamiento de esta proteína.
- Evaluar el comportamiento químico del material sol-gel dopado con ASB y empacado en cartuchos de plástico mediante experimentos de análisis frontal.
- Diseñar y poner a punto un sistema en línea, acoplado una columna empacada con biogel a una columna analítica de cromatografía de líquidos para determinar la capacidad de enlazamiento de fármacos de prueba por la proteína encapsulada.
- Establecer las condiciones adecuadas para el análisis de los fármacos de prueba (propranolol y naproxén) por cromatografía de líquidos.
- Determinar la influencia de algunos parámetros experimentales sobre la capacidad de enlazamiento y durabilidad (preservación de funcionalidad) de los biogeles sintetizados.
- Determinar algunas propiedades físicas del biomaterial, tales como superficie específica, volumen poroso y tamaño de poro, que pueden afectar la cinética del proceso de interacción fármaco-proteína.



V. HIPÓTESIS

Debido a los inconvenientes que presenta el enlazamiento covalente como método para inmovilizar biomoléculas en soportes sólidos, recientemente se han explorado vías alternativas con el propósito de encontrar un proceso de inmovilización más sencillo, reproducible y robusto que permita preservar en mayor grado la funcionalidad de la biomolécula. Uno de los métodos más prometedores para el desarrollo de este tipo de materiales es el método sol-gel. El encapsulamiento de albúmina de suero bovino en los poros de un soporte de sílice por el método sol-gel deberá permitir preservar en alto grado la estructura terciaria de esta proteína plasmática y con ello su afinidad hacia solutos específicos como los fármacos. El adsorbente así obtenido podrá ser utilizado para estudios de interacciones fármaco-proteína, con la ventaja de poder ser regenerado y utilizado repetidamente conservando su capacidad de enlazamiento.

VI. EQUIPO Y MATERIAL

a. EQUIPO

- ⇒ Bomba cuaternaria para cromatografía de líquidos, Polymer Laboratories modelo LC-1150
- ⇒ Inyector Rheodyne 7125 con bucle de 20 μ L
- ⇒ Desgasificador Jones Chromatography Modelo 7600
- ⇒ Detector de UV de longitud de onda variable, Spectromonitor 3200 (Thermo Separation Products)
- ⇒ Integrador y graficador Hewlett-Packard Modelo 3396 II
- ⇒ Sistema Purificador y desionizador de agua NANOPURE, Barnstead Thermolyne Modelo 04747
- ⇒ Baño de ultrasonido Sonicor Modelo SC-100
- ⇒ Potenciometro Corning Modelo 220 con electrodo combinado de vidrio calomel Cole-Parmer Modelo 60648
- ⇒ Balanza Analítica Ohaus
- ⇒ Sistema de empaqueo de columnas y precolumnas a alta presión Haskel Modelo 29426
- ⇒ Placa de agitación con calentamiento Thermolyne Cimarec 2
- ⇒ Agitador mecánico marca Burrel modelo 75
- ⇒ Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JMS-5900 LV con filamento de tungsteno
- ⇒ Calorímetro de Barrido Diferencial Mettler Toledo Modelo DSC 821
- ⇒ Porosímetro BET ASAP 2010, Micromeritics

b. MATERIAL

- ⇒ Frascos de vidrio transparente con tapa de metal (capacidad 20 mL)
 - ⇒ Equipo de filtración de vidrio Millipore Modelo OM027
 - ⇒ Membranas de filtración de 47 mm de diámetro, con poro de 0.4 μ m, Phenomenex AFO-0504
 - ⇒ Micropipeta de volumen 100 a 1000 μ L
 - ⇒ Probetas 100 mL
 - ⇒ Mortero de porcelana con pistilo
 - ⇒ Jeringas de plástico con capacidad de 3 mL
 - ⇒ Agitadores magnéticos
 - ⇒ Columna analítica (150 x 4.6 mm, D.I) empacada con fase reversa Hypersil ODS de 5 μ m (Termo-Hypersil-Keystone)
- Material utilizado para la fabricación de las columnas para empacar el biogel:
- ⇒ Tubo precortado de acero inoxidable con paredes internas pulidas (150 x 4.6 mm D.I)
 - ⇒ Conectores de acero inoxidable $\frac{1}{4}$ " - $\frac{1}{16}$ " de bajo volumen muerto
 - ⇒ Filtros de acero sinterizado con poro de 2 μ m

c. BIOMOLECULAS

- ⇒ Solución Estándar de Albúmina Sérica Bovina 1%, Sigma Aldrich
-

d. SOLUTOS DE PRUEBA

- ⇒ (±)-clorhidrato de propranolol (99% TLC), Sigma-Aldrich
- ⇒ (R,S)-naproxeno Grado Reactivo, Sigma-Aldrich

e. REACTIVOS

- ⇒ Hidróxido de sodio en lentejas Grado Reactivo, J.T. Baker
- ⇒ Cloruro de sodio Grado Reactivo, J.T. Baker
- ⇒ Cloruro de potasio Grado Reactivo, J. T. Baker
- ⇒ Ácido fórmico 88% J.T. Baker
- ⇒ Fosfato ácido de potasio Grado Reactivo, J. T. Baker
- ⇒ Fosfato de potasio Dibásico Grado Reactivo, J. T. Baker
- ⇒ Tetraetoxisilano 99% (TEOS) Fluka
- ⇒ Ácido acético J.T. Baker

f. DISOLVENTES

- ⇒ Acetonitrilo Grado HPLC, Prolabo
- ⇒ Metanol Grado HPLC, Fisher Scientific
- ⇒ Isopropanol Grado HPLC, Fermont

g. DISOLUCIONES PREPARADAS

- ⇒ Solución Salina (NaCl 0.15 M, KCl 0.0027 M) Amotiguadora de Fosfatos pH 7.2, 0.2 M y 0.02 M
- ⇒ Solución Salina (NaCl 0.15 M, KCl 0.0027 M) de Amotiguadora de Fosfatos pH 5, 0.2 M y 0.02 M
- ⇒ Solución Estándar de (±)-clorhidrato de propranolol 500 µg/mL, en MeOH.
- ⇒ Solución Estándar de (R,S)-naproxeno 500 µg/mL, en MeOH.
- ⇒ Solución Estándar de (±)-clorhidrato de propranolol 150 µg/mL, en SSAF 0.02 M, pH 7.
- ⇒ Solución Estándar de (±)-clorhidrato de propranolol 100 µg/mL, en SSAF 0.02 M, pH 7.
- ⇒ Solución Estándar de (±)-clorhidrato de propranolol 75 µg/mL, en SSAF 0.02 M, pH 7.
- ⇒ Solución Estándar de (±)-clorhidrato de propranolol 50 µg/mL, en SSAF 0.02 M, pH 7.
- ⇒ Solución Estándar de (R,S)-naproxeno 150 µg/mL, en SSAF 0.02 M, pH 7.
- ⇒ Solución Estándar de (R,S)-naproxeno 100 µg/mL, en SSAF 0.02 M, pH 7.

Las soluciones de los fármacos en SSAF se prepararon justo antes de cada experimento.

VII. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

7.1 Inmovilización de la albúmina de suero bovino (ASB) por el método sol-gel

7.1.1 Inmovilización a pH 7. En un frasco de vidrio, se adicionaron TEOS: HCl 0.1 M:H₂O en una relación (2.5:0.1:0.4, v/v) y se agitó manualmente para mezclar bien los reactivos. El frasco tapado se sometió a ultrasonido en un baño de hielo durante 30 min, luego se dejó a temperatura ambiente, agitando manualmente cada 15 min, hasta observar una completa incorporación de las fases orgánica y acuosa, así como un incremento notable en la viscosidad del líquido. En este punto se adicionaron 2 mL de SSAF 0.2 M a pH 7, inmediatamente seguidos por la adición de 500 µg de albúmina en solución de SSAF 0.02M a pH 7 y se homogenizó agitando ligeramente de forma manual. La gelificación ocurrió en < 5 min. El gel formado fue desprendido de las paredes del recipiente con una espátula y se le adicionaron 2 mL más de SSAF 0.2 M a pH 7 (ver figura 7.1).

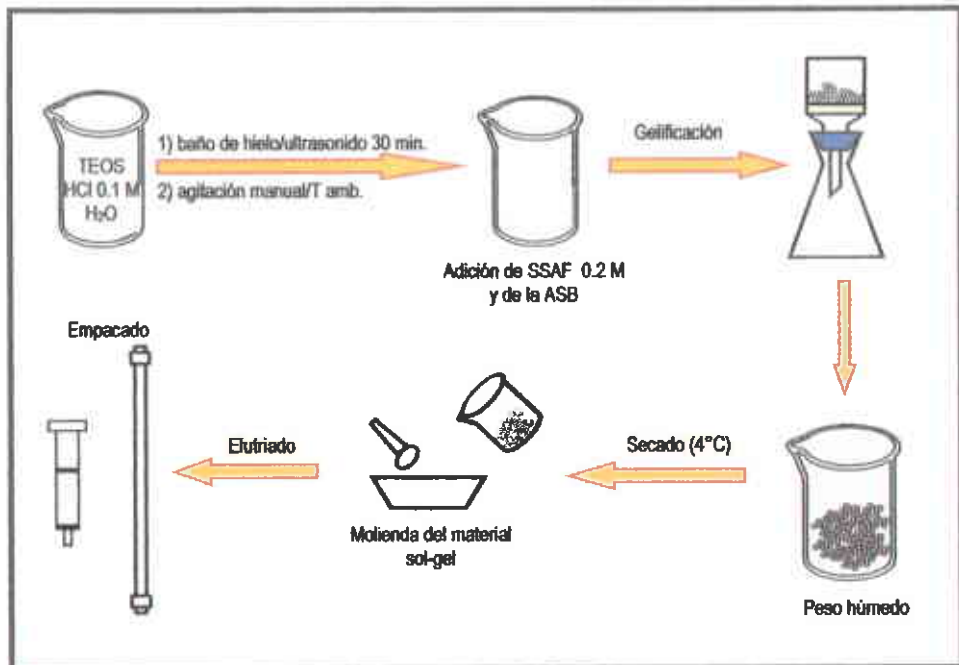


Figura 7.1 Proceso de inmovilización de la ASB por el método de sol-gel

Lavado. Posteriormente se fraccionó el gel y se colocó en un dispositivo de filtración en donde se lavó con ACN-H₂O 60:40 (v/v) (2 x 15 mL), agua desionizada (6 x 15 mL) y finalmente SSAF 0.02 M (3 x 15 mL), al finalizar el último lavado el gel permaneció bajo vacío durante 5 min. El peso promedio del gel húmedo obtenido fue de 4 g.

Secado. El gel se secó a una temperatura constante de 4°C, hasta la pérdida del 50% del peso con respecto al peso del gel húmedo inicial. Por lo tanto, el rendimiento promedio de la síntesis fue de 2 g del gel seco.

Molienda. Una vez que el gel perdió el 50% de su peso, se procedió a molerlo en un mortero de porcelana. Las partículas de gel se suspendieron en 5 mL de SSAF, se sometieron a sonicación por algunos minutos y se dejó decantar para, posteriormente, retirar las partículas más finas que permanecieron flotando en la superficie del líquido. Esta operación se repitió dos veces más con el objeto de obtener una fracción de partículas de tamaño más homogéneo.

Empacado. Después de la eliminación de los finos, las partículas de gel remanentes se resuspendieron en 3 mL de SSAF por agitación y se empacaron en:

- a) *Cartuchos de plástico.* Se colocó un filtro de acero inoxidable en el fondo del cartucho, inmediatamente se vertió la suspensión del gel y finalmente se puso otro filtro en la parte superior del lecho empacado, haciendo pasar 10 mL de SSAF 0.02M de pH 7 a través del cartucho para asentar el empaque. El volumen del lecho empacado, embebido en fase líquida, fue de aproximadamente 3 mL. Los cartuchos se mantuvieron en refrigeración hasta su empleo en los ensayos.
- b) *Columnas de acero inoxidable.* La suspensión se fue vertiendo lentamente en la columna, la cual estaba conectada por el extremo contrario a un sistema de vacío. La columna se llenó hasta el borde con el biogel molido, por lo que el volumen de lecho empacado en este caso fue el mismo que el volumen interno del tubo, es decir, 2.5 mL. Después de empacar el material se hizo pasar a través de la columna un volumen de 10 mL de SSAF 0.02M a pH 7 a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Posteriormente se almacenó en refrigeración hasta su uso.

7.1.2 Inmovilización a pH 5. Las etapas iniciales del procedimiento fueron idénticas a las descritas anteriormente para la inmovilización a pH 7. Una vez que la mezcla de reacción adquirió una consistencia viscosa y una apariencia homogénea, se adicionaron 2 mL de SSAF 0.2 M a pH 5. A partir de este punto, se esperó 105 min para adicionar 700 µg de la proteína en SSAF 0.02M de

pH 5. En este caso el tiempo de gelificación después de la adición de ASB fue de 15 min. Los procedimientos subsecuentes de lavado, secado, molienda y empaçado fueron realizados como se describió anteriormente.

7.1.3 Agitación mecánica en el proceso de inmovilización de ASB por el método sol-gel. Debido al largo tiempo requerido para obtener un sol de consistencia adecuada, antes de la adición de la biomolécula, se decidió ensayar la agitación de la mezcla de reacción mediante un dispositivo mecánico. El procedimiento fue básicamente el mismo que se describió anteriormente para los dos diferentes valores de pH, pero en este caso se sustituyó la agitación manual del frasco con la mezcla de reacción por la mecánica¹, empleando para ello dos dispositivos diferentes:

- a) *Placa de agitación.* Una vez transcurridos los 30 min en el ultrasonido, a la mezcla se le introdujo un magneto y se colocó en una placa de agitación a velocidad moderada (nivel 2)². Al finalizar la agitación, se extrajo el magneto y se continuó con el procedimiento, de acuerdo con el valor de pH de inmovilización, según fue descrito en los puntos 7.1.1 y 7.1.2.
- b) *Agitador mecánico (Burrel modelo 75).* Después de la etapa en el ultrasonido, la mezcla se colocó en un agitador mecánico a velocidad constante. Transcurrido el período adecuado de agitación, se realizó la adición de SSAF y ASB en la concentración, pH y volumen indicados, tal como se describió en los puntos 7.1.1 y 7.1.2.

7.2 Comportamiento de Retención del biogel en sistemas de flujo.

7.2.1 Evaluación por Análisis Frontal. Los geles empaçados en cartuchos de plástico se evaluaron por el método de análisis frontal, como se muestra en la figura 7.1. Se empleó como analito de prueba el fármaco naproxeno. A partir de la solución estándar de naproxeno (100 µg/mL en SSAF) se prepararon soluciones de carga (influyente) de concentración 0.5, 1, 1.5 y 2 µg/mL en SSAF 0.02 M. Se percolaron 10 mL de cada solución a través del cartucho, colectando el efluente en fracciones de 1 mL (figura 7.2), las cuales fueron analizadas por CLAR.

En estos ensayos se evaluó un gel dopado con 500 µg de ASB. Antes del ensayo de análisis frontal, el cartucho empaçado con el gel (que se mantuvo guardado en refrigeración) fue acondicionado a

¹ El proceso de agitación con los dispositivos mecánicos fue monitoreado cada 30 min.

² Este valor se refiere a los indicados en la escala de la perilla correspondiente del agitador magnético, para la placa de agitación con calentamiento Thermolyne Cimarec 2 únicamente.

temperatura ambiente y se le hicieron pasar 15 mL de SSAF fresca. Después de cada experimento el gel se regeneró mediante lavados con agua (2 x 2 mL), mezcla metanol-agua 50:50, v/v (10 mL) y nuevamente agua (2 mL). Finalmente se acondicionó con SSAF y se guardó en refrigeración hasta el siguiente ensayo.

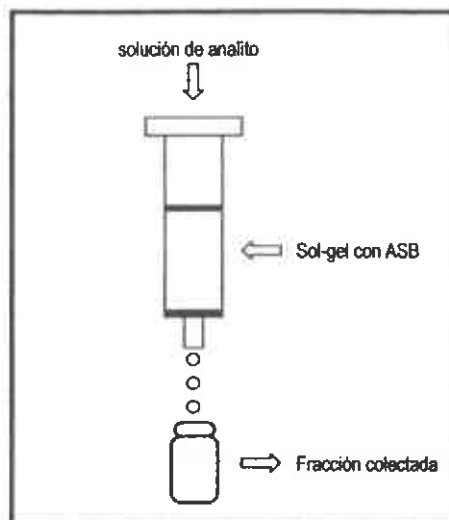


Figura 7.2 Cartucho empacado con el sol-gel con ABS.

Condiciones para el análisis cromatográfico de las fracciones del efluente:

Columna: ODS (longitud 15 cm, D.I 4.6 mm, tamaño de partícula 5 μm)

Fase móvil (naproxeno): ACN-H₂O-Amortiguador de acetatos (0.1 M pH=3.8) 30:60:10 (v/v)

Presión: 8.8 MPa

Flujo: 1 mL/min

Detector: UV longitud de onda 254 nm

Sensibilidad: 0.01 AUFS

7.2.2 Evaluación por Carga Discontinua. Para evaluar y comparar las propiedades de retención de los biogeles sintetizados se diseñó el arreglo experimental mostrado en la figura 7.3 y se empleó como soluto de prueba el fármaco: propranolol. El funcionamiento del sistema es el siguiente (ver Tabla 7.1): con la válvula de conmutación en posición A y el detector desconectado del sistema, se hizo pasar a través de las dos columnas (columna ASB y columna fase reversa, FR) una fase móvil de composición apropiada (fase móvil de activación) para propiciar las interacciones fármaco-proteína, pero con la cual el soluto no migra en la columna FR.

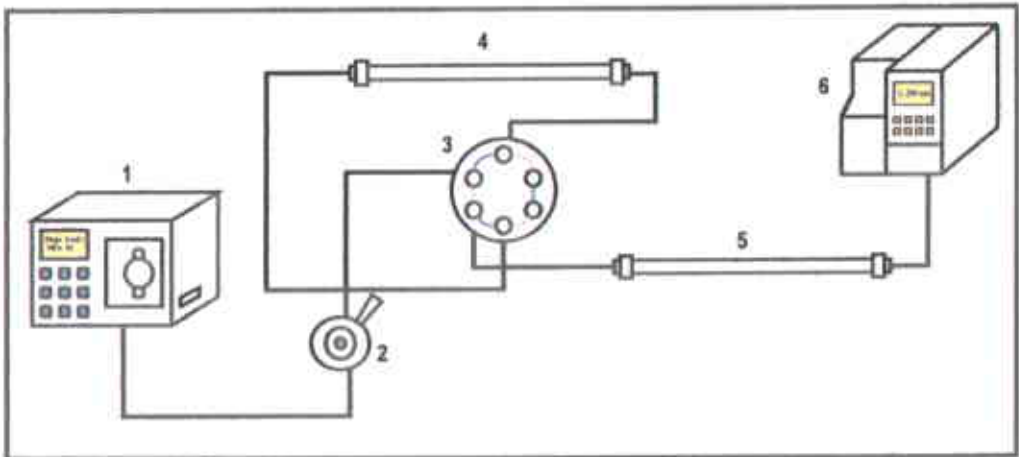


Figura 7.3 Dispositivo empleado en los ensayos con las columnas de material sol-gel dopado con ABS. 1) Bomba del cromatógrafo, 2) Inyector, 3) Válvula de conmutación [— posición A, — posición B] 4) Columna de material sol-gel con ABSB inmovilizada, 5) Columna de fase reversa (FR). 6) Detector.

En esta condición se inyectó una muestra relativamente concentrada (75, 100 y 150 $\mu\text{g/mL}$) del soluto en estudio, para realizar la carga de la columna ASB (las inyecciones se repitieron hasta su saturación). En la siguiente etapa, se conectó el detector y la válvula de conmutación se giró a la posición B y se hizo pasar la fase móvil de análisis únicamente por la columna FR para eluir y cuantificar el soluto no retenido en la columna ASB. Este proceso se realizó repetidamente hasta observar (en la etapa de análisis) que la cantidad de soluto cuantificado era igual a la de soluto inyectado. La suma de las cantidades de soluto retenido por la columna ASB en cada inyección permitió determinar la capacidad máxima de retención del biogel para el soluto considerado.

Composición de las fases móviles:

Fase móvil de activación: SSAF con 2% (v/v) de isopropanol

Fase móvil de análisis: ACN-Ac. Fórmico 0.1 M (ajustado a pH 3.8)-Agua 40:50:10 (v/v)

Fase móvil de desorción: ACN-Ac. Fórmico 0.1 M (ajustado a pH 3.8)-Agua 35:50:15 (v/v)

Condiciones de detección del clorhidrato de propranolol: 280 nm.

Tabla 7.1 Operación del sistema durante la determinación de capacidad de enlazamiento de la columna empacada con biogel.

Paso	Operación	Fase móvil ^a	Columna (s)	Posición válvula	Conexiones en Sistema ^b
1	Inyección del soluto	De activación (10 mL)	ASB + FR	A	Detector desconectado
2	Análisis del soluto no retenido	De análisis	FR	B	Todo el sistema
3	Si cantidad analizada < Cantidad inyectada ir a 1				
4	Fin del proceso de adsorción				

^a La composición de las fases móviles se describe en el texto.

^b Ver diagrama del sistema en *figura 7.2*.

La regeneración de la columna ASB después de los experimentos de carga se realizó como se describe a continuación (ver *Tabla 7.2*). Con el sistema en la posición A, se hizo pasar la fase móvil de desorción a través de las columnas, pero una vez pasados 10 mL se giró la válvula a la posición B. En estas condiciones, el soluto desorbido de la columna de ASB continuó migrando por la columna de FR hasta su elución y cuantificación. Posteriormente, la columna analítica se desconectó del sistema y se bombearon 20 mL de agua seguidos por 20 mL de la fase móvil de activación a través de la columna de biogel. Todos los ensayos se realizaron a un flujo de 1 mL/min.

Tabla 7.2 Operación del sistema durante la regeneración de la columna empacada con biogel (desorción del soluto retenido).

Paso	Operación	Fase móvil ^a	Columna (s)	Posición válvula	Conexiones en Sistema ^b
1	Desorción y análisis de soluto	De desorción (10 mL)	ASB + FR	A	Todo el sistema
2	Reactivación de columna ASB	20 mL de H ₂ O + 20 mL de fase de activación	ASB	A	Columna FR y Detector desconectados
3	Tiempo de regeneración de la columna ASB 1.5 h				
4	Si el soluto es detectado en el cromatograma ir a 1				
5	Fin del proceso de adsorción				

^a La composición de las fases móviles se describe en el texto.

^b Ver diagrama del sistema en *figura 7.2*.

Después de un tiempo de reposo de al menos 1.5 h, el proceso se repitió para continuar la desorción del soluto hasta confirmar que ya no se encontraba en el efluente de la columna analítica.

7.3 Caracterización Física del Material

7.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). El análisis por microscopía electrónica se realizó con muestras de geles (1 g) previamente lavadas con agua desionizada (4 X 15 mL) y secadas a vacío durante 96 h.

La muestra se colocó sobre una cinta adherible de grafito, tomando con una espátula una pequeña cantidad y depositándola de manera homogénea sobre la superficie adherente; después se hizo un recubrimiento de la muestra con oro y una vez recubierta se colocó en la cámara de vacío del microscopio electrónico y se procedió a realizar el análisis.

7.3.2 Adsorción de Gases (BET). Las muestras (1 g de gel) para la caracterización por la técnica de adsorción de nitrógeno se lavaron previamente con agua desionizada (4 x 15 mL) y fueron secadas a vacío durante 96 h. Después se realizó un pretratamiento de la muestra (entre 0.04-0.08 g), propio para el análisis por adsorción de gases, colocándola durante 4 horas a 300°C y 1.33×10^3 Pa. Posteriormente el análisis se llevó a cabo a 77 K, empleando como adsorbato nitrógeno.

7.3.3 Análisis Térmico (Termoporometría). Los análisis de termoporometría se realizaron con geles (1 g) previamente lavados con agua desionizada (6 x 15 mL) para eliminar cualquier remanente de la SSAF 0.02 M, con la cual se acondicionaron y almacenaron.

En el centro de una cápsula de aluminio con capacidad de 40 μ L previamente pesada, se depositó una gota capilar de la muestra del biogel, se pesó nuevamente y se selló para después ser colocada en el Termoanalizador. Primero se realizó un ciclo de acondicionamiento de la muestra que consistió en un enfriamiento rápido de 0°C a -30°C a velocidad de 10°C/min, seguido por un calentamiento lento de -30°C a 0°C a velocidad de 1°C/min. Después se llevó a cabo un segundo enfriamiento a una velocidad de 1 °C/min de 0°C a -30 °C. Todos los análisis se realizaron con orificio en la cápsula y bajo atmósfera de nitrógeno.

VIII. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

8.1 Inmovilización de ASB por el método sol-gel a pH 7 y pH 5.

En particular, la inmovilización de ASB en soportes porosos ha sido ensayada utilizando diferentes técnicas. Erlondson y colaboradores^[9] exploraron la técnica de adsorción, que en principio es la menos agresiva, pero tiene la desventaja de la baja estabilidad del material resultante, por sangrado de la biomolécula durante su uso. Allenmark y colaboradores^[9] realizaron el enlazamiento covalente de la ASB en sílice obteniendo un material más estable, con escaso sangrado de proteína durante su uso repetido; sin embargo, el enlazamiento químico involucra condiciones agresivas y manipulación de la biomolécula que ocasionan la pérdida de estructura terciaria en una buena fracción de las moléculas inmovilizadas. En otros trabajos se utilizó la técnica sol-gel para el encapsulamiento de ASB en sílice y se comprobó, mediante estudios espectroscópicos, que la mayor parte de la proteína inmovilizada había preservado su conformación nativa pero con una severa restricción estérica en lo que se refiere a las transiciones conformacionales reversibles.

Considerando lo anterior, uno de los objetivos del presente trabajo fue sintetizar un material sol-gel con ASB inmovilizada, optimizando las condiciones del proceso para que las propiedades de enlace de la proteína no se vieran afectadas. De acuerdo con las modificaciones a la técnica sol-gel convencional, sugeridas para el bioencapsulamiento, no se adicionó ningún alcohol como cosolvente en la mezcla de reacción inicial y el gel se amortiguó por adición de un amortiguador salino (SSAF) antes de incorporar la proteína. Las proporciones del precursor (TEOS), agua y catalizador se retomaron de trabajos previos^[19, 30] (realizados por el grupo de investigación al cual está asociado el presente proyecto), para el encapsulamiento de enzimas y anticuerpos.

Inicialmente se ensayó el encapsulamiento a pH 7 de una pequeña cantidad de ASB (60 µg), pero las pruebas preliminares con el biogel mostraron que la retención del soluto de prueba era prácticamente idéntica a la de un gel blanco, por lo que resultó difícil discriminar entre retención debida a la proteína y retención no específica por el soporte. Se decidió entonces aumentar la cantidad de proteína hasta 500 µg, basado en observaciones previas^[19] en las cuales se demostró que el encapsulamiento de moléculas de tamaño medio como la ASB, es más eficiente cuando el material se dopa con una mayor cantidad de éstas. Los ensayos realizados con el nuevo biogel mostraron un notable aumento en la cantidad de soluto retenido al aumentar la cantidad de proteína inmovilizada en el gel. Por lo tanto se estableció como cantidad mínima 500 µg de ASB para la preparación de los siguientes biogeles. Otros autores como Jacobson^[9], Sakai-Kato^[18] y

Birnbaum^[65], han empleado cantidades de ASB de entre 130 a 400 mg para la elaboración de columnas monolíticas empleadas en electrocromatografía capilar con el propósito de evaluar su capacidad de enlace y reconocimiento de fármacos con propiedades quirales.

En la búsqueda de condiciones óptimas, tanto para la preparación del material como para conservar las propiedades de enlace de la ASB, se consideró de interés ensayar la inmovilización utilizando un amortiguador de pH 5 (en vez de pH 7 que es lo más común). Esta condición de pH se eligió por ser muy cercano al valor del punto isoeléctrico de la proteína (pH 4.7); de hecho, Kato y colaboradores^[32] proponen realizar la inmovilización de proteínas a pH ligeramente ácido para evitar las repulsiones electrostáticas entre la biomolécula y los silanoles desprotonados de las cadenas de sílice en el sol; dichas repulsiones pueden dificultar o impedir el encapsulamiento de la molécula dopante por la red polimérica en formación.

Los primeros ensayos de encapsulamiento a pH 5 se realizaron adicionando amortiguador (SSAF 0.05 M) después de un tiempo de hidrólisis de 6 h. Durante este tiempo, la mezcla de reacción había sido agitada manualmente cada 15 min; la consistencia viscosa del sol al término de este período indicaba que las reacciones de condensación habían progresado suficientemente, por lo que se esperaba una rápida transición sol-gel después de desestabilizar el sistema coloidal por adición del amortiguador salino. Debido a ello, la solución de ASB se agregó poco tiempo después para permitir su perfecta incorporación a la mezcla antes de la gelificación. Sin embargo, el tiempo de gelificación se prolongó demasiado con respecto a lo observado en los ensayos preliminares de encapsulamiento realizados, a pH 7. Este largo tiempo de gelificación fue nefasto para la proteína ya que permaneció durante más de 6 h en contacto con el sol, es decir, con una mezcla rica en etanol (producto de la hidrólisis del precursor) y, probablemente, con algunos residuos de TEOS no hidrolizado. Es bien sabido que los alcoholes provocan la agregación y desnaturalización de biomoléculas y que los alcóxidos son todavía más dañinos. Experimentalmente se observó que la solución traslúcida, después de la adición de SSAF y proteína, se transformó en un gel opaco al producirse la transición sol-gel. Esto se atribuye a la desnaturalización de la proteína puesto que un gel blanco, preparado simultáneamente y bajo las mismas condiciones (pero sin adición de la proteína), se mantuvo traslúcido al momento de gelificar.

Con el objeto de disminuir el tiempo de gelificación, se optó por incrementar la concentración del amortiguador ya que una alta fuerza iónica provoca una más rápida desestabilización del sistema coloidal y su coalescencia al estado gel. También se decidió aumentar el tiempo de hidrólisis para dejar progresar en mayor medida las reacciones de condensación. En esta ocasión se preparó

primero el gel blanco para observar los resultados de la modificación introducida y estimar el tiempo de gelificación. En la Tabla 8.1 se comparan los resultados obtenidos bajo las dos condiciones de concentración de amortiguador ensayadas. Como puede observarse, el tiempo de gelificación disminuyó significativamente al aumentar la concentración del amortiguador (de 7 a 3.33 horas en el caso del gel blanco). Considerando el resultado obtenido con el gel blanco, para la preparación de los biogeles se decidió no adicionar la biomolécula justo después del amortiguador sino algunos minutos antes del tiempo estimado para la gelificación. De esta manera se reduciría el riesgo de desnaturalización de la ASB, al estar menos tiempo en contacto con los agentes dañinos presentes en el sol. Los resultados de estos ensayos, en lo que se refiere a los tiempos de gelificación y preparación del material se presentan en los últimos renglones de la Tabla 8.1.

Tabla 8.1 Preparación de biogeles a pH 5.

Biogel	Tiempo de hidrólisis ^a (h)	Concentración d SSAF pH 5	Adición de ASB (h) *	Tiempo de Gelificación ^a (h)	Tiempo total de preparación (h)
1	6	0.05 M	Blanco	7	13.5
2	6	0.05 M	0.08	6.50	13.0
3	6	0.05 M	0.08	6.66	13.2
4	7	0.2 M	Blanco	3.33	10.8
5	7.33	0.2 M	2.67	3.16	11.0
6	7.50	0.2 M	3.45	3.5	11.5

^aAl finalizar el periodo de tiempo indicado, se realizó la adición de SSAF a pH 5. Este tiempo no incluye los 30 min de sonicado inicial de la mezcla.

* Tiempo considerado a partir de la adición de SSAF.

Cabe mencionar que estos materiales dopados con ASB sí permanecieron traslúcidos al momento de la gelificación y que las pruebas de retención realizadas con ellos dieron resultados positivos, indicando con esto que al menos una fracción de la proteína quedó encapsulada con su configuración nativa.

Aunque el aumento en la concentración del amortiguador permitió disminuir el tiempo de gelificación en aproximadamente tres horas, el proceso en su conjunto todavía era muy largo y laborioso, particularmente durante la etapa de hidrólisis y condensación (por la agitación manual de la solución cada 15 min). Se consideró entonces llevar a cabo esta etapa bajo agitación mecánica continua, lo que además permitiría tener un mejor control sobre este parámetro haciéndolo independiente del operador. Es necesario subrayar que, debido a que no se adiciona cosolvente al inicio del proceso, el TEOS y la fase acuosa no se mezclan, por lo que la agitación es la única manera de lograr que ambas fases estén en contacto íntimo para que se lleven a cabo las reacciones de hidrólisis y condensación.

De hecho, después de someter la mezcla de reacción inicial al ultrasonido por 30 min, se genera suficiente alcohol para permitir que las reacciones continúen aún sin agitación posterior, pero a costa de una cinética muy lenta del proceso pues en este punto todavía se observa una separación de fases.

En las siguientes pruebas de preparación de geles se ensayaron dos métodos de agitación, el agitador mecánico que balancea el recipiente con la solución en un movimiento tipo péndulo y la agitación por placa magnética en donde el recipiente permanece estático y la solución es agitada por el movimiento circular de un magneto. En ambos casos se fijó una velocidad de agitación pequeña para evitar que porciones del sol, al volverse más viscoso con el tiempo, quedaran adheridas en las paredes del recipiente y pudieran gelificar antes que el resto de la solución. Se prepararon biogeles con encapsulamiento de la proteína tanto a pH 7 como pH 5 (Amortiguador de SSAF 0.2 M), en el primer caso la proteína se agregó justo después del amortiguador pues las experiencias anteriores habían mostrado que el SSAF a pH 7 y concentración 0.2 M provoca, en un sol maduro, la gelificación casi inmediata (<5 min). Para los biogeles preparados usando el amortiguador de pH 5, la adición de la proteína se efectuó no más de 15 min antes del tiempo de gelificación estimado; este último se determinó mediante la preparación previa de un gel blanco, bajo las mismas condiciones.

En la *Tabla 8.2* se detallan los diferentes ensayos realizados y se muestran los resultados obtenidos en cuanto al tiempo de gelificación y el tiempo total requerido para la preparación de los biogeles. Los tiempo de hidrólisis marcados en la tabla corresponden al tiempo que se dejó cada mezcla bajo agitación mecánica. Durante este tiempo la mezcla es retirada de agitación de vez en cuando para supervisar su consistencia, homogeneidad y olor; cuando estos parámetros son adecuados (solución ligeramente viscosa, sin olor a TEOS y perfectamente homogénea) se procede a añadir el amortiguador.

Como puede observarse comparando las *Tablas 8.1 y 8.2*, la agitación mecánica no solo permitió reducir el tiempo de hidrólisis, sino también el tiempo de gelificación de los biogeles preparados con amortiguador de pH 5. Por lo tanto el tiempo total requerido para la síntesis de estos se redujo a aproximadamente 5.5-6.5 h (considerando los 30 min de sonicado de la mezcla al inicio del proceso). Por su parte, los geles preparados con amortiguador de pH 7 requirieron alrededor de 4.5-5.5 h totales para su síntesis.

Tabla 8.2 Ensayos de síntesis de biogeles con agitación mecánica.

AGITADOR MECÁNICO				
Amortiguador	Tiempo de hidrólisis	Adición de la ASB (h)	Tiempo de Gelificación (h)*	Tiempo total de preparación(h)
pH 5	3.33 h	1.92 h	2.09 h	5.9 h
pH 5	3.9 h	1.6 h	1.68 h	6.0 h
pH 5	4.08 h	1.75 h	1.92 h	6.3 h
pH 7	3.75 h	0.02 h	0.05 h	3.9 h
pH 7	4.08 h	0.02 h	0.05 h	4.2 h
pH 7	4.5 h	0.02 h	0.05 h	4.4 h
PLACA DE AGITACIÓN				
Amortiguador	Tiempo de hidrólisis	Adición de la ASB (h)	Tiempo de Gelificación (h)*	Tiempo total de preparación (h)
pH 5	4.58 h	0.34 h	0.5 h	5.5 h
pH 5	4.5 h	0.17 h	0.33 h	5.3 h
pH 5	5.33 h	0.25 h	0.42 h	6.2 h
pH 5	5 h	0.33 h	0.58 h	5.6 h
pH 7	4.58 h	0.02 h	0.05 h	4.6 h
pH 7	4.92 h	0.02 h	0.05 h	5.0 h
pH 7	4.83 h	0.02 h	0.05 h	5.0 h

*Al finalizar el periodo de tiempo indicado, se realizó la adición de SSAF a pH 5. Este tiempo no incluye los 30 min de sonicado inicial de la mezcla.

* Tiempo considerado a partir de la adición de SSAF.

Todos los geles sintetizados fueron posteriormente lavados y secados como se indica en la parte experimental. El secado lento, a baja temperatura (4°C) y solo hasta 50% de pérdida de peso con respecto al hidrogel húmedo inicial, permite evitar un excesivo encogimiento del gel y el colapso de poros que podrían dañar a las biomoléculas encapsuladas, además de restringir el acceso y difusión de solutos pequeños al interior del material.

Tabla 8.3 Características de los geles preparados.

	pH de inmovilización	
	pH 5	pH 7
Tiempo de gelificación (a partir de la adición de SSAF)	0.3 h - 2.0 h	inmediatamente
Adición de la proteína (después de la adición de SSAF)	0.2 h - 1.9 h	inmediatamente
Consistencia del gel (después del secado)	Suave, no ofrece resistencia durante su mollienda	Dura, ofrece resistencia durante la mollienda
Apariencia	Material transparente, con varios núcleos blancos.	Material transparente sin núcleo blancos.

Las propiedades físicas de los hidrogeles finalmente obtenidos fueron diferentes según el amortiguador utilizado en la síntesis. En la *tabla 8.3* se resumen las principales características de síntesis o de apariencia final que marcaron una neta diferencia entre los dos tipos de biogeles. Los núcleos blancos observados en los geles preparados con amortiguador de pH 5 podrían ser debidos a la desnaturalización de algunas de las moléculas de ASB atrapadas.

8.2 Comportamiento de Retención del Biogel en Sistemas de Flujo.

8.2.1 Evaluación por Análisis Frontal.

La información sobre las curvas de análisis frontal descrita en la sección de antecedentes (punto 3.6) servirá de base para la interpretación de los resultados obtenidos en este trabajo. Como se mencionó en la parte experimental, se percolaron soluciones de naproxeno a diferente concentración a través del mismo cartucho de biogel y para cada ensayo se colectaron 10 mL en fracciones de 1 mL del efluente. Cada fracción fue analizada por CLAR para determinar la variación de concentración de naproxeno en el efluente. Las curvas de Área de Pico vs. Número de fracción obtenida se muestran en la *figura 8.2*, estos ensayos corresponden a un biogel con 500 μg de ASB inmovilizada a pH 7 y las soluciones percoladas fueron de 1, 1.5 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de naproxeno.

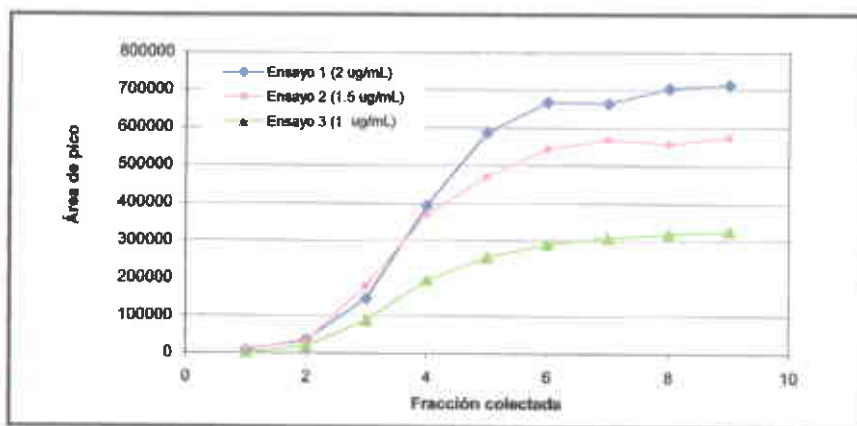


Figura 8.2 Perfil cromatográfico de ensayos con naproxeno a diferentes concentraciones en un cartucho empacado con biogel dopado con 500 μg de ASB.

Las curvas muestran un típico perfil de análisis frontal, pero para poder compararlas y explicarlas, fue necesario realizar algunas transformaciones. Comparando las áreas de pico con el área de un estándar de concentración conocida, inyectado durante el análisis de las muestras se calculó la concentración de fármaco en cada fracción colectada. Esta concentración se normalizó dividiéndola entre la concentración original de naproxeno en el influente y el resultado se graficó en función del volumen percolado. Las curvas correspondientes se presentan en la *figura 8.3*.

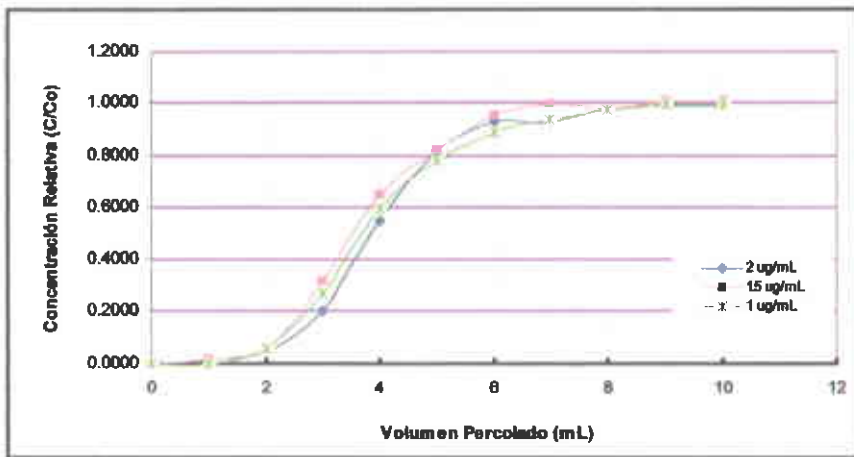


Figura 8.3 Análisis Frontal de R,S-naproxeno a diferentes concentraciones, en cartuchos empacados con biogel con ASB (500 µg) inmovilizada a pH 7.

Cabe mencionar que también se realizó un ensayo a una concentración menor de naproxeno en el influente 0.5 µg/mL. Sin embargo, en este caso el frente de migración no alcanzó a formarse (ver figura 8.4) porque la zona de transición resultó más ancha que la longitud del lecho empacado en el cartucho. Por ello se observa que, desde la primera fracción colectada, aparece una cantidad importante de soluto en el efluente (del orden del 20% respecto a la concentración del influente).

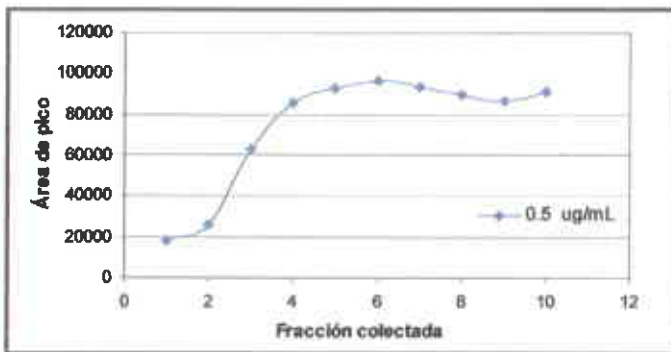


Figura 8.4 Análisis Frontal de R,S-naproxeno de concentración 0.5 µg/mL, en un cartucho de biogel con ASB (500 µg) inmovilizada a pH 7.

Considerando los gráficos de la figura 8.3, es evidente que el perfil de las tres curvas es claramente sigmoidal aunque no completamente simétrico. Esto se puede atribuir a la no homogeneidad tanto del empaque como del lecho empacado. En efecto, la molienda del gel fue hecha manualmente y,

aunque se realizaron algunas operaciones de remoción de finos, la dispersión de tamaño de partícula fue muy importante (como se muestra posteriormente en la sección de caracterización física). En consecuencia, el lecho empacado resultante debió ser más o menos irregular provocando la deformación de las curvas, particularmente hacia el final del frente. Estos factores se reflejan también en la dispersión relativamente grande de la zona de transición, la cual abarca un volumen, ΔV de 4-5 mL. Por comparación, el volumen del frente estequiométrico (o volumen de retención) está situado entre 3.6 y 4 mL, según la curva considerada. Para definir el volumen de retención se utilizó el punto situado a la mitad de la altura total del frente como estimador del punto estequiométrico, esto tiene obviamente cierto margen de error puesto que los frentes no son perfectamente simétricos. En lo que respecta a los otros volúmenes característicos de las curvas de análisis frontal, es usual emplear el punto situado entre 1 y 5% de la altura total del frente como marcador del volumen de fuga y, simétricamente, el punto situado entre 99 y 95% de la altura total como indicador del volumen de equilibrio. El valor que se seleccione dentro de los intervalos mencionados dependerá en gran medida de la apariencia del frente y de la exactitud y precisión requeridas. Dado que este trabajo no tiene como objetivo realizar un estudio profundo de la cinética del proceso de análisis frontal en el biogel, la estimación de los dos volúmenes se hizo con los puntos límite del intervalo. En estas condiciones, se observa un volumen de fuga, $V_f = 2$ mL, idéntico para los tres experimentos, mientras que el volumen de equilibrio es más variable debido a la deformación de las curvas en la parte final del frente; así, $V_e = 6-7$ mL.

Por otra parte, como puede constatarse en la figura 8.3, las tres curvas obtenidas están más o menos empalmadas en la primera mitad del frente. El pequeño desfaseamiento entre ellas es aleatorio, es decir, no se muestra una tendencia en función de la concentración de la solución percolada. Por lo tanto se asume que dicho desfaseamiento es debido al error experimental, atribuible en gran parte a la incertidumbre en la colección de fracciones y al trazo de las curvas a partir de medidas discontinuas de concentración del analito en el efluente. Bajo estas consideraciones se puede estipular que el volumen estequiométrico es idéntico para las tres concentraciones ensayadas (1, 1.5 y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y su valor promedio es $V_s = 3.8$ mL.

Como ya se ha mencionado el volumen estequiométrico (equiparable al volumen de retención) es un parámetro termodinámico muy importante, relacionado con el coeficiente de distribución del

compuesto entre una fase móvil y una fase estacionaria, según se establece en la siguiente ecuación fundamental de la cromatografía:

$$V_s = V_r = V_m (1 + D V_{st}/V_m) \quad (E-8.1)$$

Donde, V_m es el volumen muerto del cartucho, D es el coeficiente de distribución del naproxeno entre el biogel y la SSAF, y V_{st} es el volumen (o peso) del biogel contenido en el cartucho. La igualdad de V_s para las tres concentraciones ensayadas en los experimentos de análisis frontal significa que en ese intervalo de concentraciones, el coeficiente de distribución es constante ($D = K_D$). Esto solo es factible cuando las concentraciones consideradas corresponden a la parte lineal de la isoterma de distribución. Es posible realizar una estimación aproximada del valor de la constante de distribución, considerando que el volumen aproximado del lecho del biogel en el cartucho fue de 3 mL y el volumen muerto de 0.6 mL. Este último se evaluó haciendo pasar una solución colorida por el cartucho y midiendo el volumen requerido para que el líquido colorido atravesara el lecho. Sustituyendo en la ecuación E-8.1 los diferentes volúmenes y reorganizando se obtiene:

$$K_D = (V_s - V_m)/V_{st} = (3.8 - 0.6)/3 = 1.07 \quad (E-8.2)$$

El valor pequeño de la constante de distribución indica que la constante de formación del complejo Naproxeno-ASB encapsulada en el gel fue bastante pequeña y/o que una parte de la proteína pudo haberse desnaturalizado durante el proceso de inmovilización.

Transformando las concentraciones de naproxeno (peso molecular = 230.26 g/mol) en las soluciones percoladas a concentraciones molares y utilizando el valor de K_D , así como su definición (concentración de soluto en fase estacionaria/concentración de soluto en fase móvil), es posible evaluar la concentración de naproxeno en el gel para los tres ensayos reportados en la *figura 8.3*. Se debe notar que este cálculo también puede realizarse directamente a partir de la ecuación E-3.23, característica del frente, dividiendo la cantidad de soluto retenida al equilibrio entre el volumen del lecho de fase estacionaria. Ambas formas de cálculo son totalmente equivalentes. Los datos y resultados correspondientes se muestran en la *Tabla 8.4*, incluyendo la relación de moles de fármaco adsorbidas por mol de proteína encapsulada.

Tabla 8.4 Cantidad y concentración de naproxeno adsorbido en un biogel (pH 7) dopado con 500 µg (7.6 nmol) de ASB* y cociente de moles adsorbidas por mol de proteína (*r*).

C_o (µg/mL)	C_o (µM)	$Q_{ad(e)}$ (µg)	$Q_{ad(e)}$ (nmol)	C_{st} (nmol/mL)	<i>r</i>
1	4.3	3.2	13.9	4.6	1.8
1.5	6.5	4.8	20.8	6.9	2.7
2	8.7	6.4	27.8	9.3	3.7

* Se asumió un peso molecular de 66000 g/mol para la ASB. C_o , Q_{ad} y C_{st} representan, respectivamente, la concentración de naproxeno en la solución percolada, la cantidad adsorbida al equilibrio y la concentración en fase estacionaria al equilibrio (expresada en nmol de soluto por mL de adsorbente = µM).

De acuerdo con los resultados expuestos en la *Tabla 8.4*, cada molécula de proteína es capaz de enlazar más de tres moléculas de naproxeno, sin embargo, considerando que los experimentos realizados corresponden a la parte lineal de la isoterma (el inicio de la isoterma), es de esperarse que el número de moléculas de naproxeno adsorbidas por cada molécula de ASB sea mayor. En estos cálculos se ha asumido que toda la proteína encapsulada participa en la adsorción del fármaco; no obstante, es posible que una fracción de la proteína esté desnaturalizada, en cuyo caso, el número de moléculas de fármaco adsorbidas por molécula de ASB "activa" se incrementaría aún más.

Desafortunadamente, no se realizaron experimentos de análisis frontal a concentraciones mucho más elevadas de naproxeno en el infuente, lo que hubiera permitido estimar la máxima capacidad de adsorción del biogel, siempre y cuando se alcanzaran a obtener frentes completos. Esto último no era muy factible, dado el bajo valor de V_s obteniendo y sabiendo que, al aumentar la concentración más allá de la parte lineal de la isoterma, el valor de este parámetro disminuye; es decir, el frente en su conjunto se desplaza hacia volúmenes menores.

A pesar de la limitación mencionada, es posible aprovechar los resultados obtenidos para estimar el valor del producto de la constante de formación del complejo por el número de sitios de enlace por molécula de proteína. La isoterma de distribución de un fármaco entre una fase líquida y las moléculas de proteína disuelta en dicha fase es del tipo Lagmuir (ver Apéndice B). Es razonable suponer que se tiene el mismo tipo de isoterma cuando la proteína está inmovilizada en un soporte inmerso en fase líquida. Por lo tanto, la concentración de equilibrio del soluto en el biogel en función de su concentración en fase móvil obedece la siguiente ecuación:

$$C_{st} = \frac{C_{st(sat)} K_f C_o}{1 + K_f C_o} \quad (E-8.3)$$

Donde, K_f es la constante de formación del complejo N-ASB, $C_{st(sat)}$ es la máxima concentración de soluto que puede ser adsorbido en el biogel, o sea la concentración que corresponde a la saturación de todos los sitios capaces de enlazar al naproxeno en todas las moléculas de proteína presentes en el gel, C_{st} y C_o tienen el significado ya definido. En la parte lineal de la isoterma (a la cual corresponden los experimentos realizados) se cumple que $K_f C_o \ll 1$. Por lo tanto:

$$\frac{C_{st}}{C_o} = K_D = C_{st(sat)} K_f \quad (E-8.4)$$

A su vez, $C_{st(sat)}$ es igual a la concentración de ASB en el gel, multiplicada por el número de sitios de adsorción por molécula de proteína (n). Asumiendo que toda la proteína encapsulada participa en la adsorción de fármaco y considerando un volumen de lecho empacado de 3 mL se tiene:

$$C_{st(sat)} = n \left[\text{ASB} \right]_{\text{gel}} = n \cdot \frac{7.6 \text{ (nmol)}}{3 \text{ (mL)}} = n \cdot 2.53 \text{ (\mu M)} \quad (E-8.5)$$

Utilizando el valor estimado de K_D (≈ 1.07) y sustituyendo E-8.7 en E-8.6 se encuentra finalmente que:

$$n K_f = 4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \quad (E-8.6)$$

Aunque no se conoce el valor de n , el resultado anterior parece indicar que el valor de la constante sería del orden de 10^4 a 10^5 . Por comparación, se han reportado valores de constantes de unión de fármacos a albúmina sérica humana del orden de 10^3 a 10^6 M^{-1} [54].

8.2.2 Evaluación por Cargas Discontinuas.

El análisis frontal tiene la desventaja de que en un lecho pequeño, como un cartucho de EFS, los frentes de migración no siempre alcanzan a formarse. Cuando la cinética adsorción-desorción es lenta y el coeficiente de distribución del soluto es pequeño, los frentes son incompletos y la determinación del punto estequiométrico se vuelve muy incierta. Por esta razón se decidió buscar un camino alternativo para evaluar el comportamiento de retención de los biogeles.

En primera instancia se pensó empacar el material en una columna de acero inoxidable, colocar ésta en el cromatógrafo, conectada directamente al inyector y al detector, y operar por elución del soluto de prueba inyectado, como en cualquier análisis cromatográfico. Sin embargo después de muchos ensayos, variando el flujo y la composición de la fase móvil, no se logró obtener ningún resultado coherente. Por ejemplo, usando como fase móvil el amortiguador SSAF 0.02 M, no se observaba una señal definida del soluto inyectado sino hasta después de múltiples inyecciones repetidas; además, dicha señal era muy ancha y deforme, y su área no correspondía a la cantidad de soluto inyectado. Por otra parte, utilizando mezclas de acetonitrilo-agua o metanol-agua, el soluto inyectado no se retenía en absoluto y después, de algunas horas de trabajo la presión en la columna aumentaba considerablemente, haciéndola inutilizable.

Aunque estos experimentos fueron infructuosos, permitieron deducir las siguientes conclusiones, que sirvieron de base para orientar el trabajo posterior:

- 1) En un medio favorable como la SSAF, no es posible hacer cromatografía de elución, puesto que el soluto inyectado se compleja con la proteína y la fase móvil no es capaz de hacerlo avanzar en la columna. Sólo después de múltiples inyecciones, los sitios de adsorción de la proteína empiezan a saturarse y una fracción de soluto emerge de la columna.
- 2) En presencia de un disolvente orgánico como metanol o acetonitrilo, la proteína no retiene al analito porque su estructura terciaria evoluciona progresivamente. Al prolongarse el contacto con el medio hostil, la proteína se despliega ejerciendo posiblemente una presión sobre las paredes del poro que la encapsula. Estos fenómenos probablemente están relacionados con la pérdida irreversible de permeabilidad en la columna.
- 3) Aún en ausencia de los fenómenos anteriores, no es posible obtener señales correctas (picos simétricos) de los analitos inyectados en esta columna por su baja eficiencia (partículas grandes e irregulares, empaçado manual, soporte no consolidado, etc.)

Para resolver estos problemas se decidió acoplar la columna de biogel a una columna analítica de fase reversa, cuya función sería la de atrapar e inmovilizar el soluto no retenido por la primera. En una segunda etapa, el compuesto atrapado en la columna de fase reversa de alta eficiencia, podría ser eluido de ésta con una fase móvil disolvente orgánico-agua y analizado. El montaje experimental y la metodología operacional desarrollados fueron descritos detalladamente en el capítulo VII. En los siguientes incisos se explicará el fundamento teórico que soporta la metodología desarrollada y se expondrán los resultados obtenidos.

8.2.2.1 Proceso de adsorción. En el primer paso, (ver *Tabla 7.1*), la fase móvil es la SSAF que se hace pasar por las dos columnas acopladas. En estas condiciones las interacciones proteína-analito son favorecidas y, al inyectar 20 μL de una solución del soluto de prueba (propranolol a concentraciones de 75, 100 o 150 $\mu\text{g/mL}$), una fracción de éste se compleja con la proteína y queda retenido. La fracción de soluto no retenido es transportada por la fase móvil hasta la segunda columna (fase reversa), quedando inmovilizada prácticamente al inicio de ésta porque la fase móvil acuosa es demasiado débil en esta fase estacionaria.

Cabe mencionar que a la SSAF empleada en este paso se le agregó 2% (v/v) de isopropanol para trata de disminuir la retención no específica del propranolol en la columna de biogel. En efecto, en una fase móvil totalmente acuosa, los efectos hidrofóbicos son muy fuertes y provocan la expulsión del soluto de la fase móvil y su consecuente retención sobre el soporte de sílice del biogel, o aún sobre secciones de la molécula de proteína inmovilizada que no corresponden a los sitios de adsorción. La adición de un disolvente orgánico a la fase móvil permite disminuir estos efectos pero, para no afectar apreciablemente la formación del complejo fármaco proteína, se utilizó el isopropanol que es menos agresivo para las biomoléculas que otros solventes orgánicos. Dada la pequeña proporción de alcohol agregado a la fase móvil, no fue posible eliminar por completo la retención no específica.

Por ello, para estimar la importancia de este tipo de retención, se realizaron experimentos de adsorción con dos columnas "blanco". Una de ellas fue empacada con un gel preparado de la misma forma que los biogeles pero sin adición de proteína. La otra columna se empacó con un gel dopado con ASB desnaturalizada por calor; para ello, previamente, la solución de proteína se sometió a calentamiento (60 °C) durante 30 min.

En el segundo paso del método, la columna del biogel se saca del circuito del flujo por rotación de la válvula de conmutación (ver *figura 7.2*). Entonces mediante una fase móvil acetoniitrilo-agua-amortiguador fórmico (pH 3.8), el propranolol atrapado en la columna de fase reversa se eluye y se cuantifica. De esta manera, se cumplen simultáneamente dos propósitos: 1) la columna de biogel no entra en contacto con la fase móvil agresiva, y 2) el soluto es separado (migra) en una columna de alta eficiencia, generando un pico cromatográfico correcto. Con respecto a esto último, se debe notar que el propranolol es un compuesto que contiene un grupo amino protonado a $\text{pH} < 9.45$ (ver capítulo XII-Apéndice). Este tipo de compuestos son difíciles de tratar en columnas típicas de fase reversa porque, en las condiciones de operación de estas columnas ($\text{pH} \leq 7$), el soluto ionizado genera picos excesivamente coleados. Por esta razón fue necesario optimizar la composición de la fase móvil para disminuir la asimetría del pico. Se encontró que, adicionando un amortiguador fórmico a concentración relativamente elevada (0.1 M), la simetría del pico de propranolol mejoraba notablemente. Esto se atribuye, por una parte, a que el soluto con propiedades ácido-base migra en una fase móvil de pH fijo y, por otra parte, a la probable formación de pares de iones entre el ion formiato y el soluto protonado.

Al terminar el segundo paso del método, el proceso se repite, es decir se vuelve a inyectar la solución del fármaco en la columna de biogel y se analiza la fracción no retenida. Cuando en varios ciclos sucesivos se observa que la cantidad de soluto analizada es igual a la cantidad inyectada, el proceso de adsorción se da por concluido, pues la proteína ha llegado a su estado de saturación y ya no retiene más soluto.

Es importante enfatizar que el proceso de adsorción termina hasta que en varios ciclos sucesivos inyección-análisis se observa que ya no hay retención. Además, es fundamental que entre estos últimos ciclos se haya dado un tiempo de reposo de al menos dos horas a la columna de biogel. Efectivamente durante los experimentos realizados se observó un comportamiento muy peculiar de la proteína encapsulada, después de tres o cuatro inyecciones de carga (seguidas cada una por su correspondiente análisis) la capacidad de la columna de biogel para continuar acumulando soluto parecía disminuir. Sin embargo, si la columna se dejaba en reposo por un tiempo (≥ 2 horas) antes de continuar las inyecciones, sus propiedades de retención se recuperaban nuevamente. Es posible que la proteína requiera este tiempo de reposo para reacomodar el soluto ya retenido, o bien para reestructurar su conformación, antes de continuar adsorbiendo más compuesto^[42].

Este comportamiento cíclico de la proteína durante el proceso de carga se observa claramente en las *figuras 8.5 y 8.6*. En ambas figuras se graficó la cantidad de propranolol

retenido en cada inyección durante todo el proceso de carga de columnas de biogel con ASB inmovilizada a pH 7 (figura 8.5) o a pH 5 (figura 8.6).

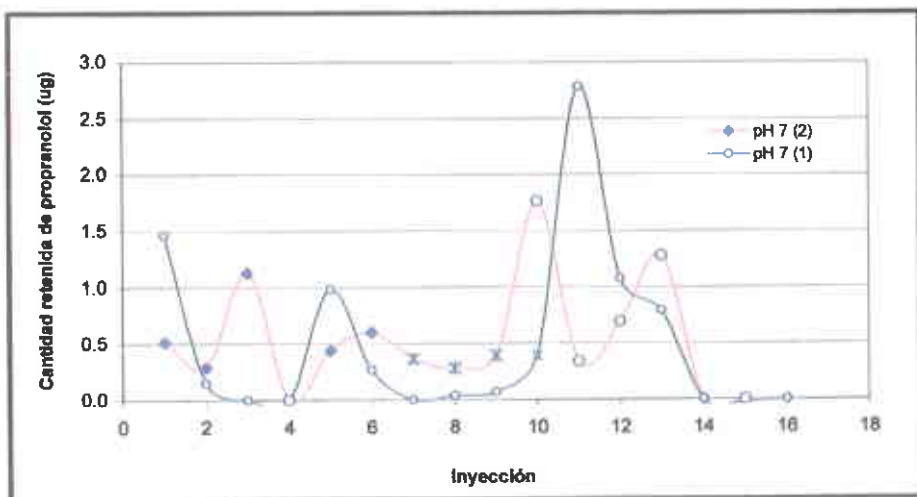


Figura 8.5 Perfil de adsorción de propranolol en columnas de biogel con ASB inmovilizada a pH 7. Las soluciones inyectadas para saturar la columna fueron: ○- 150 mg/mL, * - 100 mg/mL y ◆- 75 mg/mL.

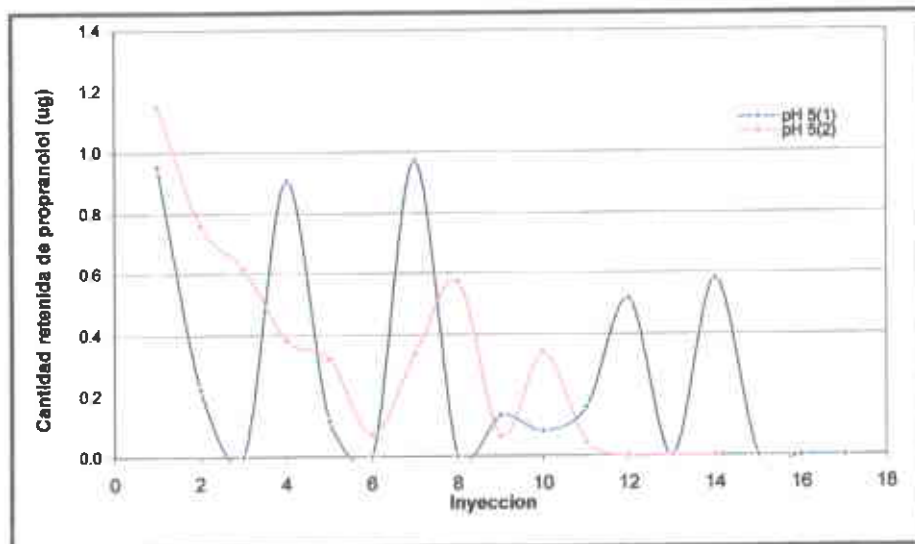


Figura 8.6 Perfil de adsorción de propranolol en columnas de biogel con ASB inmovilizada a pH 5. Para ambos ensayos la solución del propranolol inyectada fue de 75 µg/mL a excepción de la inyección #5 de pH 5 (2), que fue de 150 µg/mL.

Para cada pH se hicieron dos experimentos totalmente independientes, es decir, se usaron dos columnas empacadas con biogel sintetizadas en diferentes días. Además, los experimentos fueron realizados en tiempos muy alejados entre sí (meses). Es importante mencionar que, para un experimento dado, el tiempo transcurrido entre inyecciones fue muy variable; algunas se hicieron justo al terminar la fase de análisis de la inyección anterior, otras se hicieron después de dejar reposar la columna de biogel varias horas e incluso de un día para otro. De hecho cada experimento completo de carga requirió de varios días de trabajo.

La variabilidad del tiempo entre cargas sucesivas podría estar relacionada con el perfil de adsorción observado y por lo tanto explicaría, al menos en parte, la diferencia de perfil obtenida para experimentos equivalentes. Sin embargo, a pesar de esta diferencia, la cantidad total de propranolol retenido por las dos columnas de biogel con proteína inmovilizada al mismo pH fue muy similar tanto para los biogel preparados a pH 7, como a pH 5.

En la *figura 8.7* se muestran las cantidades totales de propranolol retenido en las diferentes columnas, hasta la saturación de su capacidad de enlazamiento. Como se puede observar, la capacidad de retención del fármaco en columnas equivalentes es muy similar. Con ello se demuestra que el proceso de síntesis de los biogel es reproducible y conduce a la obtención de materiales con, prácticamente, las mismas propiedades de retención.

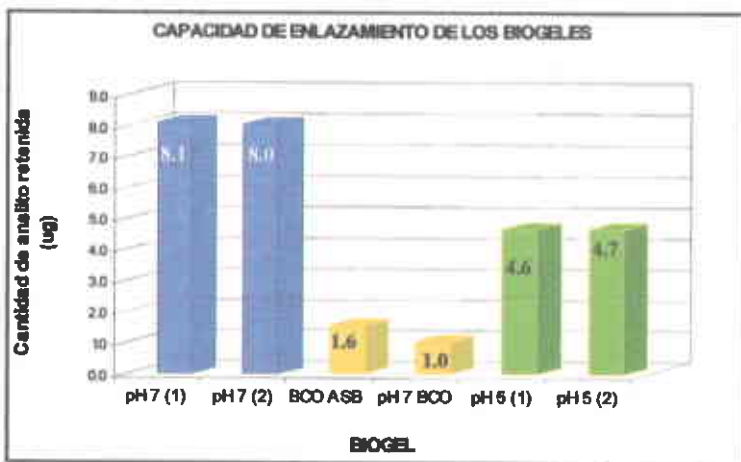


Figura 8.7 Comparación del comportamiento de adsorción del propranolol en diferentes columnas. 7 (1) y 7 (2) columnas de biogel preparado a pH 7; 5 (1) y 5 (2) columnas de biogel preparadas a pH 5; BCO (ASB) columna blanco de gel dopado con ASB desnaturalizada; BCO (pH 7) columna blanco de gel no dopado.

Asimismo, se demuestra que la metodología desarrollada para medir la capacidad de enlazamiento de los biogeles es adecuada y confiable pues proporciona resultados muy similares para experimentos equivalentes.

Los biogeles preparados inmovilizando la proteína a pH 7 retuvieron cerca de 76% más de propranolol que los que fueron preparados a pH 5, es decir con un pH cercano al punto isoeléctrico de la ASB. Esto demuestra que la configuración terciaria de la molécula proteica se preserva mejor cuando el encapsulamiento se realiza en condiciones cercanas a las fisiológicas.

Por otra parte, en la *figura 8.7* también se presentan los resultados de retención en las columnas blanco. Ambas columnas retuvieron cantidades no despreciables de propranolol, lo que indica que los efectos hidrofóbicos en una fase móvil constituida por SSAF acuoso con solo 2% de isopropranol son bastante importantes. Por comparación con el biogel preparado a pH 7, la columna de gel no dopado tuvo una retención cercana al 12.5% y la columna de gel dopado con proteína desnaturalizada retuvo cerca del 20%. La retención no específica es un fenómeno difícil de evitar cuando se trabaja con biomateriales, pues en general éstos requieren el uso de soluciones salinas fundamentalmente acuosas y de fuerza iónica relativamente elevada, lo que propicia los efectos hidrofóbicos. Hasta ahora no se tiene certeza de que, en los biomateriales, ambos tipos de retención, la específica y la no específica, sean aditivos. Es decir, no se tiene la seguridad de que la retención no específica, medida en un gel blanco, sea de la misma magnitud en un biomaterial, donde el soluto tiene la opción de ser retenido con mayor fuerza por interacciones específicas. Por ello, la solución simplista de determinar la capacidad de enlazamiento de un biomaterial restando a la cantidad de soluto retenida, la que se retuvo en una masa idéntica de gel blanco, no es del todo realista.

Basado en la discusión anterior, en este trabajo se optó por utilizar la cantidad total de fármaco retenido en los biogeles como estimador de su capacidad de enlazamiento, estando concientes de que dicha capacidad puede estar sobre-evaluada.

Los biogeles preparados para los experimentos descritos en la presente sección fueron dopados con 700 μg de ASB. Sin embargo una fracción de gel no fue empacada porque su volumen total (base húmeda) fue de 3 mL mientras que la capacidad del tubo de acero inoxidable empleado para fabricar las columnas era de solo 2.5 mL. Por lo tanto, la cantidad de ASB en las columnas empacadas fue de 583 μg (considerando que la proteína estaba homogéneamente dispersa en el gel). Esta cantidad corresponde a 8.8 nmol de ASB. En la *Tabla 8.5* se reportan las cantidades

promedio de propranolol retenido en los biogeles preparados a pH 7 y pH 5, expresando dichas cantidades en μg y en nmol, lo que permite calcular el cociente (r) de moles de fármaco adsorbidos por mol de proteína.

Tabla 8.5 Cantidad promedio de propranolol adsorbido en biogeles preparados a pH 5 y pH 7 con 8.8 nmol de ASB encapsulada y cociente de moles de fármaco adsorbido por mol de proteína.

BIOGEL	$Q_{\text{ad}}(\text{sat})^*$ (μg)	$Q_{\text{ad}}(\text{sat})^*$ (nmol)	r
pH 5	4.65	15.7	1.8
pH 7	8.05	27.2	3.1

* $Q_{\text{ad}}(\text{sat})$ representa la cantidad adsorbida en condiciones de saturación del biogel.

Es necesario tomar en cuenta que la metodología utilizada para realizar la carga de las columnas fue diseñada para alcanzar el estado de saturación del biogel empacado. Por lo tanto la cantidad retenida de propranolol corresponde a la máxima cantidad que puede ser retenida, y el cociente r corresponde al número total de sitios de adsorción de propranolol en la molécula de ASB. Puesto que, en principio, los geles preparados a las dos condiciones de pH tenían la misma cantidad de ASB, la diferencia observada en el número de sitios de adsorción del fármaco (r) refleja la mayor desnaturalización de la proteína durante el encapsulamiento a pH 5. Así, se puede establecer que a pH 5 hubo 42% de proteína desnaturalizada con respecto a las condiciones a pH 7. Obviamente, a pH 7 también pudo haber alguna pérdida de proteína por desnaturalización, pero esto no puede ser estimado a partir de los datos con que se cuenta. Si se compara el valor de r para el propranolol en el gel preparado a pH 7 (Tabla 8.5) con el valor de r para naproxeno (Tabla 8.4), se puede deducir que la ASB tiene mucho mayor avidez por este último que por el primero. En efecto, los geles comparados se prepararon al mismo pH; el mayor valor de r para naproxeno (3.7) corresponde a una concentración en fase móvil (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que se sitúa, como ya se discutió, en la parte inicial de la isoterma, es decir lejos de la saturación, mientras que el valor de r obtenido para propranolol (3.1) corresponde a la saturación. Por tanto, es de esperar que, en condiciones de saturación, el valor de r para naproxeno fuera considerablemente más alto, reflejando una enorme diferencia en cuanto a su capacidad de enlazarse a la proteína plasmática con respecto al propranolol. Diversos factores como la carga y tamaño del soluto podrían estar relacionados con la diferencia observada; es de notar que a pH 7 (condición en que se realizaron los experimentos de adsorción), el naproxeno es aniónico mientras que el propranolol es un catión. También se debe remarcar que la molécula de ASB no

tiene una multitud de sitios de adsorción independientes, sino unas cuantas regiones en cada una de las cuales se pueden, eventualmente, acomodar y fijar varias moléculas de soluto.

8.2.2.2 Proceso de Desorción. Como se mencionó al inicio de esta sección, los experimentos preliminares realizados mostraron que las columnas de biogel no podían trabajarse por periodos prolongados de tiempo en presencia de fases móviles que contuvieran una proporción apreciable de disolvente orgánico. Por otra parte, una vez que el soluto había sido adsorbido, no era posible desorberlo o eluirlo pasando únicamente una fase móvil acuosa.

En respuesta a estas dificultades se decidió finalmente diseñar un proceso de desorción discontinuo, en cierta manera parecido a lo que se había hecho para la carga. Con ello se perseguían dos objetivos:

1) tratar de preservar, en lo posible, la integridad de las biomoléculas encapsuladas y su capacidad de enlazamiento, y 2) evitar la pérdida irreversible de permeabilidad de la columna de biogel. Se utilizó el mismo montaje experimental, a base de columnas acopladas, para poder seguir el avance del proceso de desorción.

En el primer paso, se manda un pulso de 10 mL de una mezcla de acetonitrilo-agua-amortiguador fórmico (pH 3.8) a través de la columna de biogel acoplada a la columna de fase reversa. El acetonitrilo provoca cambios estructurales en la molécula de proteína, con la consecuente liberación del soluto adsorbido. Sin embargo, estos cambios son de cinética muy lenta por lo que solo una parte de soluto es liberada. Esta fracción de soluto viaja hacia la columna de fase reversa y es eluida por la misma fase móvil del pulso enviado. Debido a que el soluto desorbido llega a la columna de alta eficiencia como una banda relativamente ancha, que continúa migrando hasta su elución, el pico finalmente obtenido presenta un fuerte ensanchamiento aunque es más o menos simétrico.

Este primer paso es seguido por un rápido lavado de la columna de biogel con agua para desalojar el disolvente orgánico y, posteriormente, se pasa la disolución de SSAF con el objeto de que la proteína pueda reestablecer su configuración nativa. En este punto, es necesario proporcionar un tiempo de reposo a la columna de biogel, en el ambiente favorable de la SSAF, porque los procesos que involucran el plegamiento o desplegamiento de la biomolécula son lentos, como ya se ha mencionado.

Los dos pasos anteriores fueron repetidos hasta que dejó de detectarse el pico del soluto en el efluente de la columna de fase reversa. El perfil de desorción mostró un decrecimiento exponencial de la cantidad de soluto detectado en cada pulso. De hecho, en todos los experimentos de desorción,

el pico obtenido del primer pulso fue tan grande que sistemáticamente saturó el detector, los siguientes pulsos aún cuando evidenciaban la presencia del analito no dieron como resultado dicha fenómeno e incluso se confirmó que todo el soluto retenido en la columna con sol-gel había sido eluido por completo; de tal forma, que la mayor cantidad de soluto retenido se desorbe en el primer pulso. Por esta razón, no pudo cuantificarse (a manera de comprobación) la cantidad de fármaco desorbido; no obstante, en todos los casos se observó que para el sexto pulso de desorción ya no se detectaba soluto.

8.2.2.3 Estabilidad y reusabilidad de los biogeles empacados. Los biogeles recién sintetizados fueron empacados en las columnas de acero inoxidable y, después de pasar algunos mililitros de SSAF, éstas se taparon por ambos extremos y se guardaron en refrigeración (4 °C) hasta su uso. Las pequeñas porciones del gel que no se empacaron en las columnas se colocaron en vasos de precipitados, se les añadió un poco de SSAF (pH 7) y también se guardaron en refrigeración, tapando el recipiente con parafilm. Para conocer la estabilidad de los geles en el tiempo, las columnas empleadas en los segundos experimentos de adsorción (descritos en el inciso 8.2.2.1) se prepararon con mucha anticipación. Así, la columna de biogel con ASB inmovilizada a pH 7 (columna 7 [2]) se mantuvo en refrigeración 4 meses antes de ser usada y la columna con ASB inmovilizada a pH 5 (columna 5 [2]) se almacenó durante dos meses antes de su uso. Como ya se comentó, la cantidad de propranolol retenido en estas columnas fue prácticamente idéntica a la retenida en columnas similares (1er. ensayo de adsorción) que fueron usadas justo después de su preparación (ver *Tabla 8.5*).

Esto indica que las columnas, una vez empacadas, se pueden mantener en refrigeración durante largos periodos de tiempo sin que se afecten sus propiedades de retención. La razón de ello es que la biomolécula inmovilizada, a pesar de estar inmersa en la SSAF que ocupa todo el volumen poroso del soporte, no se despliega porque el poro que la encapsula limita su movimiento. Por comparación, se ha reportado que anticuerpos libres en solución (en SSAF) perdieron 60% de su capacidad de enlazamiento en 55 días, mientras que los mismos anticuerpos encapsulados en sol-gel preservaron el 100% de su capacidad de retención en el mismo período de tiempo^[106]. Otros trabajos del grupo de investigación al que está asociado el presente estudio, también han corroborado la gran estabilidad en el tiempo de diversos anticuerpos encapsulados en sol-gel^[30].

Por otra parte, en lo que se refiere a los mismos geles no empacados, se observó que el material preparado inmovilizando la proteína a pH 5 presentaba crecimiento microbiano después de 4 meses

de almacenamiento, mientras que el biogel preparado a pH 7 no presentó dicho fenómeno aún después de 6 meses. Esta observación es curiosa puesto que los dos tipos de material fueron lavados con SSAF de pH 7 después de la gelificación y almacenados en refrigeración, sumergidos en este mismo amortiguador. La única explicación posible es que la estructura del soporte no debe ser igual en los dos casos. Los materiales gelificados a pH 5 probablemente tienen poros externos más abiertos o un esqueleto sólido menos consolidado que favorece el crecimiento de microorganismos en la superficie. No es evidente, sin embargo, que los microorganismos logren entrar hasta los poros donde se encuentra atrapada la proteína. Coincidentemente, la consistencia de estos materiales después del secado fue suave y elástica, mientras que los materiales gelificados a pH 7 mostraron una consistencia dura y rígida. Con el objetivo de estimar el grado de afectación presentado por los biogeles después de un ensayo de carga-desorción, la columna 5 (2) fue reutilizada 2 meses después de su primer uso, es decir a 4 meses de su síntesis. En este segundo ensayo (ver figura 8.8) se observó una notable disminución de la capacidad de enlazamiento; la cantidad de propranolol retenido fue de 2.7 μg lo que, comparado con el primer ensayo, representa una pérdida de capacidad de $\approx 42\%$.

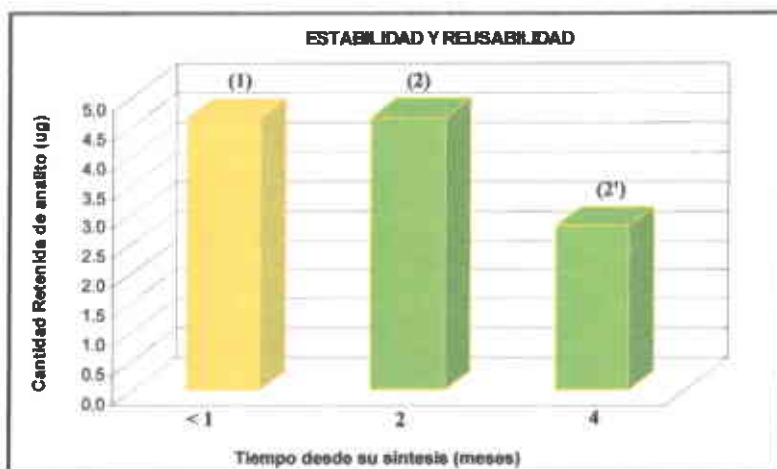


Figura 8.8 Capacidad de enlazamiento en función del tiempo transcurrido desde la preparación del biomaterial gelificado a pH 5. (1) y (2) denotan columnas diferentes, (2') corresponde al segundo uso de la columna (2).

Es evidente que esta degradación no está asociada con el tiempo, sino con el uso de la fase móvil rica en acetonitrilo durante la desorción del primer ensayo. La búsqueda de condiciones más adecuadas para la desorción, que no dañen a tal grado a la proteína encapsulada, es un punto que quedará

pendiente para futuros trabajos en esta área. Una posible vía a explorar es la sustitución de acetonitrilo por solventes menos agresivos como el metanol o el isopropanol.

Cabe mencionar que la ASB es un compuesto muy barato, comparado con otras biomoléculas, por lo que la degradación observada no es tan grave en este caso, considerando además que en la síntesis de cada biogel se utilizó menos de 1 mg de proteína. También debe subrayarse el hecho de que los biogeles sintetizados bajo las mismas condiciones presentaron características de retención casi idénticas. Esto abre la posibilidad de realizar estudios comparativos de la afinidad de diversos fármacos por proteínas plasmáticas encapsuladas, preparando para cada ensayo columnas de biogel confiablemente reproducibles.

8.2 Caracterización Física del biomaterial con ASB

En la caracterización de sólidos porosos han sido empleadas técnicas como la Microscopía (electrónica de transmisión, electrónica de barrido, de Tunelaje, etc.), la intrusión de líquidos (porosimetría de mercurio) y la termoporometría^[101].

En los siguientes incisos se presentan resultados de caracterización física de geles dopados y sin dopar por tres diferentes técnicas. Las muestras sometidas a estos análisis fueron etiquetadas como se indica en la *Tabla 8.6*. Cabe aclarar que los resultados reportados en los diferentes análisis para una muestra dada corresponden al gel del mismo lote de fabricación.

Tabla 8.6 Descripción de muestras utilizadas en la caracterización física y su correspondiente etiqueta.

ETIQUETA	DESCRIPCIÓN
B7Ma	Gel blanco, agitación manual, gelificado a pH 7
P7Ma	Biogel dopado con ASB, agitación manual, gelificado a pH 7
P7Me	Biogel dopado con ASB, agitación mecánica, gelificado a pH 7
B5Ma	Gel blanco preparado bajo agitación manual y gelificado a pH 5
P5Ma	Biogel dopado con ASB, agitación manual, gelificado a pH 5
P5Me	Biogel dopado con ASB, agitación mecánica, gelificado a pH 5
PD	Biogel dopado con ASB desnaturalizada, agitación mecánica, gelificado a pH 7

8.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). En las figuras 8.9, 8.10 y 8.11 se muestran las microfotografías correspondientes a los diferentes geles descritos en la *Tabla 8.6*.

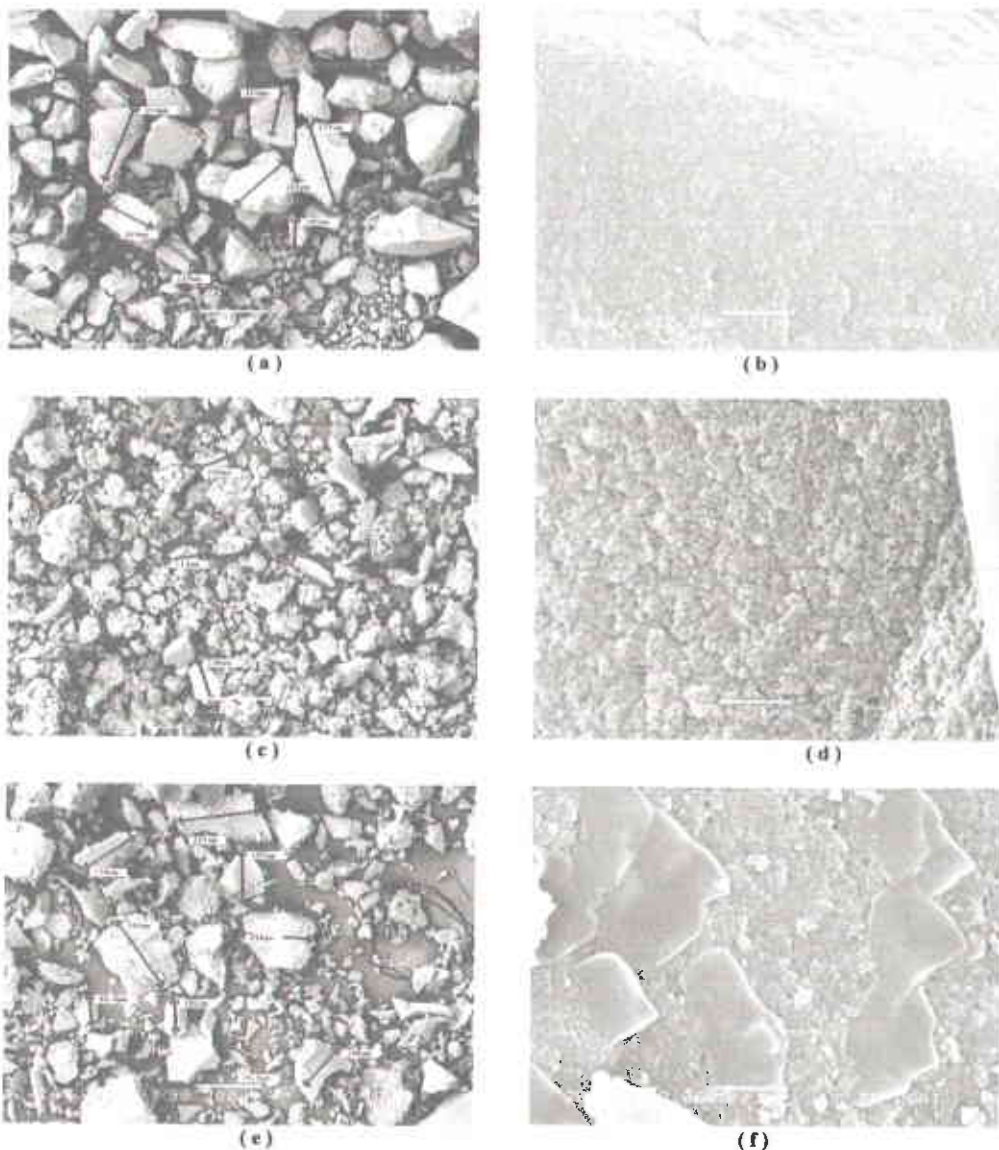


Figura 8.9 Microfotografías (SEM) correspondientes a los materiales gelificados a pH 7: (a,b) muestra B7Ma, (c,d) muestra P7Ma, (e,f) muestra P7Me. Ampliación: columna izquierda X 90, columna derecha 20 000 X.

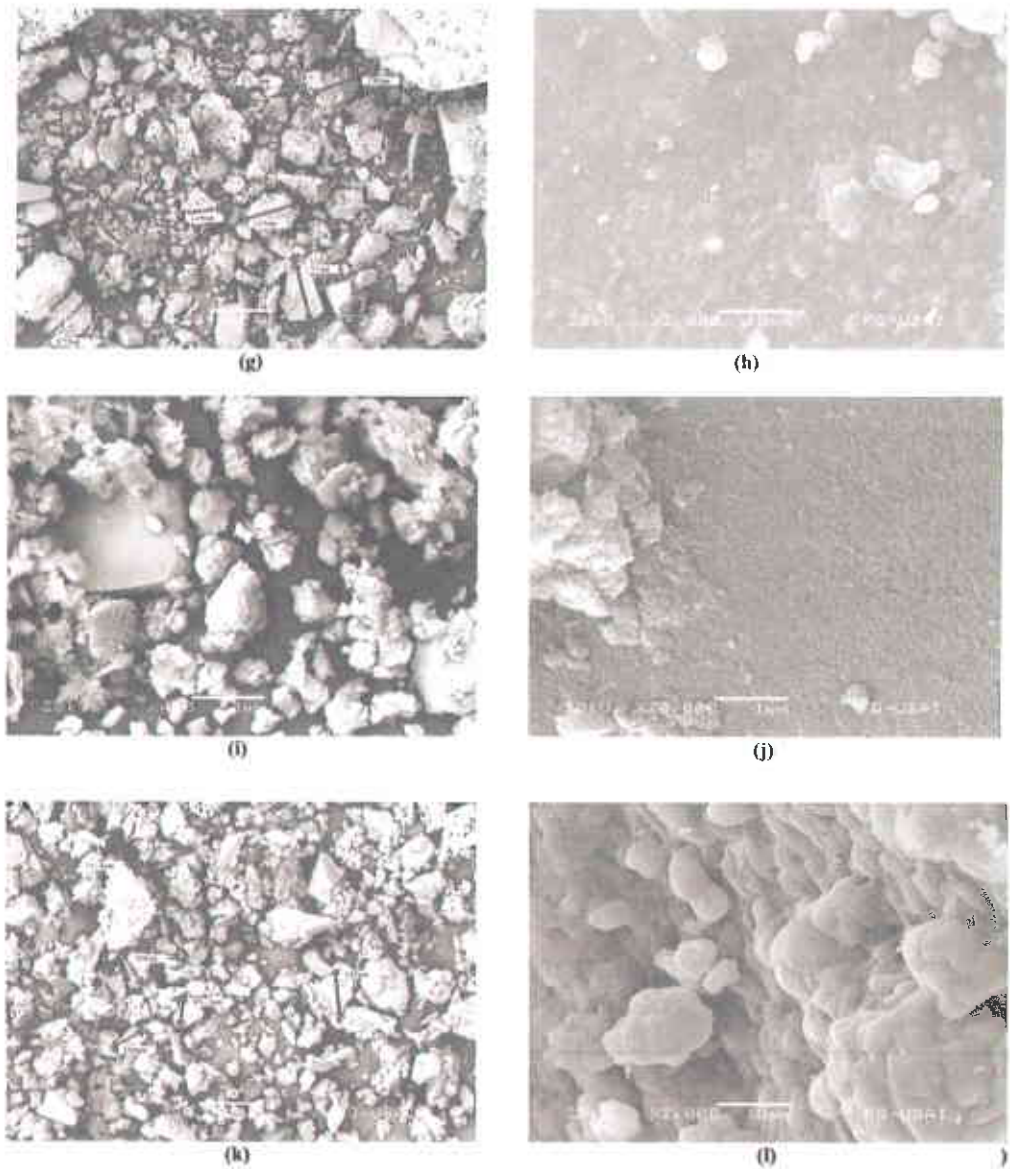


Figura 8.10 Microfotografías (SEM) correspondientes a los materiales gelificados a pH 5: (g,h) muestra B5Ma, (i,j) muestra P5Ma, (k,l) muestra P5Me. Ampliación:columna izquierda 90 X, columna derecha 2000, 20 000 y 2000X, respectivamente.

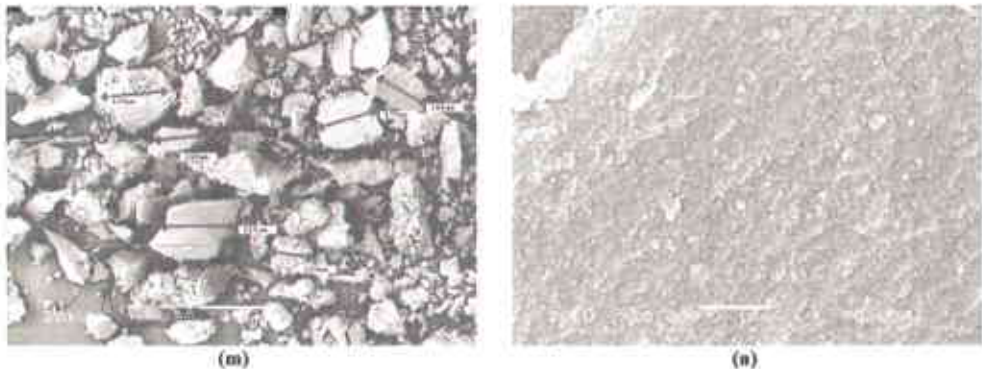


Figura 8.11 Microfotografías (SEM) correspondientes al biogel dopado con ASB desnaturalizada. Ampliación: columna izquierda 90X, columna derecha 20000X.

Las microfotografías muestran una gran similitud de la morfología de los diferentes geles sintetizados independientemente del tipo de agitación usada durante la etapa de hidrólisis (manual ó mecánica), del pH empleado en la etapa de gelificación, de la adición o no de la proteína y del estado (nativo o desnaturalizado) de ésta última. La superficie es rugosa en todos los casos y los poros superficiales que alcanzan a observarse (columna derecha) son pequeños, $< 1 \mu\text{m}$, y están repartidos aleatoriamente. Los tamaños de partícula son muy irregulares, ya que van desde los 50 hasta los 250 μm . Debe considerarse que la molienda del material se realizó de forma manual en un mortero de porcelana retirando el polvo más fino, pero sin efectuar una elutriación formal y exhaustiva.

En algunas microfotografías (8.9 f y 8.10 f) se alcanza a apreciar la morfología accidentada de la superficie, probablemente indicativa del crecimiento del gel por agregación de conglomerados.

En resumen se puede decir que las diferencias de comportamiento químico entre los biogeles sintetizados a pH 7 y pH 5 no se reflejan o no están relacionadas con la morfología superficial del material. De hecho, no se observan tampoco diferencias evidentes entre los materiales dopados y no dopados; tal vez esto sea debido al tamaño relativamente pequeño de la molécula de ASB. Con moléculas dopantes más grandes, como los anticuerpos (peso molecular 150 000), sí se han observado efectos notables en la porosidad superficial de los geles ^[30].

8.3.2 Adsorción de Gases (BET). En la *Tabla 8.7* y las *figuras 8.12-8.14* Se presentan los resultados obtenidos en el análisis por adsorción de N₂ para la caracterización de las muestras P7Ma y B7Ma, correspondientes al material sol-gel con ASB inmovilizada y un blanco respectivamente.

Tabla 8.7 Resultados del Análisis por el Método de Adsorción de Gases (BET).

Muestra	Área específica m ² /g	Volumen de poro cc/g	Diámetro de poro (promedio) nm
P7Ma	288	0.695	9.7
B7Ma	571	0.585	4.1

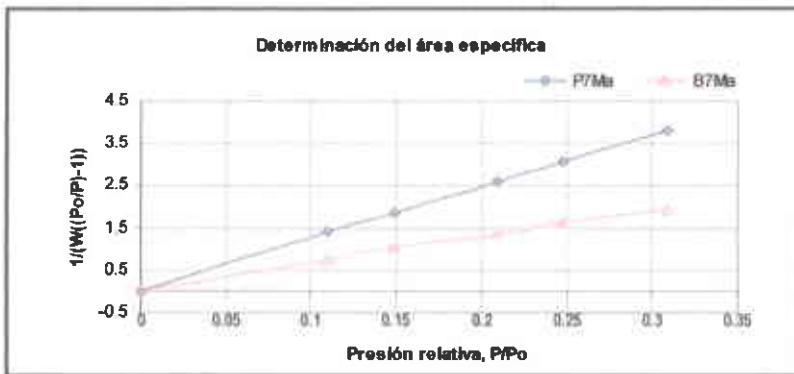


Figura 8.12 Determinación del área específica por el método BET para las muestras P7Ma y B7Ma.

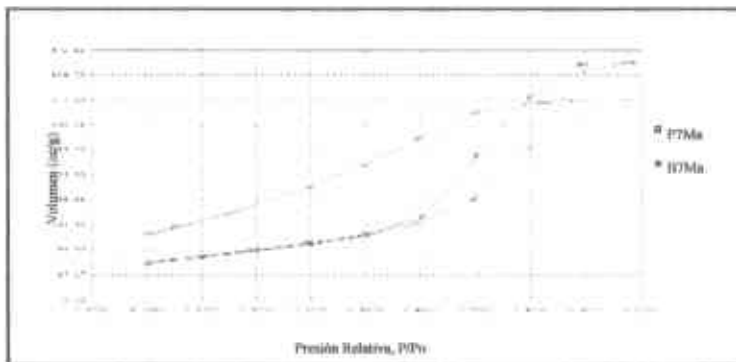


Figura 8.13 Comparación de las isotermas de adsorción de las muestras P7Ma y B7Ma.

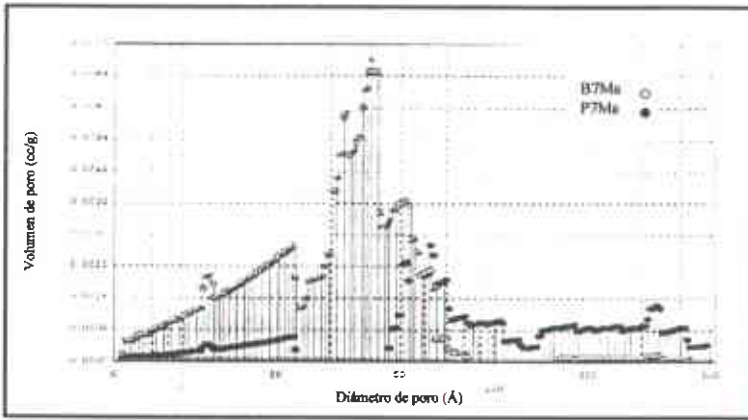


Figura 8.14 Comparación de la distribución del diámetro de poro para las muestras P7Ma y B7Ma.

Los resultados del análisis por adsorción de gases muestran que el material posee un área superficial considerable, tanto el gel con proteína como el gel blanco; inclusive desde el punto de vista práctico, esta característica los hace muy atractivos como posibles soportes para catálisis en fase sólida.

De acuerdo con los valores de diámetro de poro obtenidos, estos geles se clasifican como materiales mesoporosos. Se puede notar que el tamaño de poro es mayor en el biogel que en el gel blanco, muy probablemente debido a la proteína inmovilizada en el material. En efecto, aun cuando el tratamiento previo de la muestra implica un secado a alta temperatura que provoca un fuerte colapso de la estructura porosa, los poros que contienen proteína encapsulada se colapsan en menor grado que los demás, a pesar que durante el proceso la biomolécula cambie de configuración y se desnaturalice. Por su parte, todos los poros del gel blanco se contraen en la misma medida durante el secado, de ahí que el tamaño de poro promedio en este material sea significativamente menor. Lo anterior también se refleja en el menor volumen poroso del gel blanco con respecto al biogel, aunque en este caso la diferencia es menos notable. La razón de ello, es que los poros con biomolécula en su interior representan sólo una pequeña fracción de los poros totales. Por otra parte el área específica es directamente proporcional al volumen poroso e inversamente proporcional al radio promedio de los poros; por ello el gel blanco, con tamaño promedio de poro significativamente más pequeño, tiene la mayor área específica.

8.3.3 Análisis Térmico (Termoporometría). Los termogramas obtenidos por Calorimetría Diferencial de Barrido para los 7 geles descritos en la *Tabla 8.6*, se presentan en la *figura 8.17*.

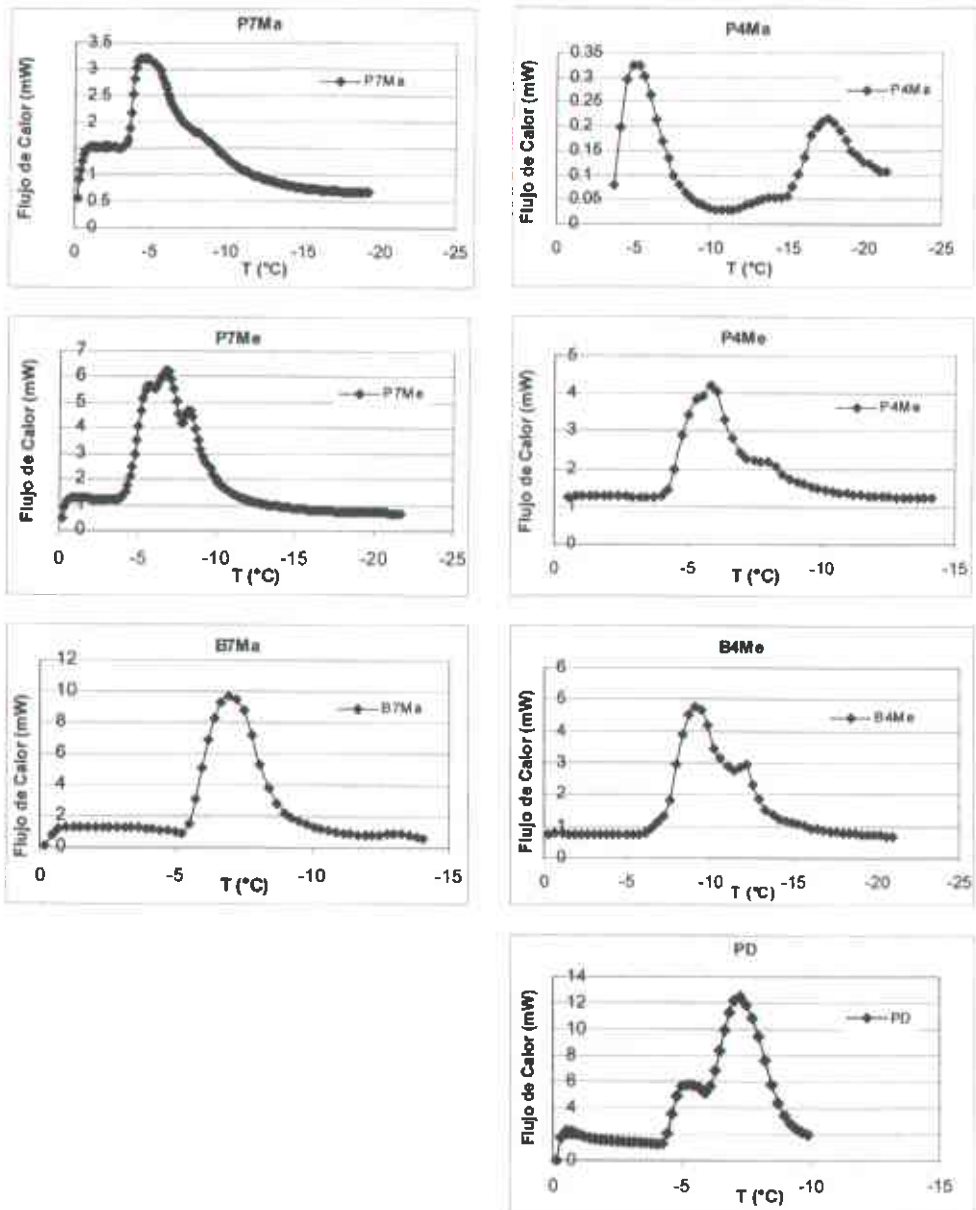


Figura 8.17 Termogramas correspondientes a los diferentes geles sintetizados.

Los termogramas fueron transformados en gráficos de distribución de tamaño de poro, aplicando la ecuación E-3.19, a los datos de Temperatura y Flujo de Calor proporcionados por el aparato^[101]. Estos gráficos se presentan en forma logarítmica para su mejor apreciación en la *figura 8.18*. Como puede observarse, salvo en un caso, todas las curvas presentan dos vértices claramente marcados y en algunos casos un hombro bien delineado. Esto hace pensar en, al menos, dos distribuciones de tamaño de poro que se empalman en mayor o menor grado. En la *Tabla 8.8* se reporta el radio promedio aparente de estas distribuciones para cada gel, tomando en los vértices de las curvas, así como los correspondientes diámetros de un poro promedio.

Tabla 8.8 Radios promedio de poro en 7 muestras de geles*.

GEL	R (nm) max1	R (nm) max2
P7Ma	10.2	6.9
P7Me	8.2	6.8
P5Ma	3.3	10
P5Me	9.8	7.2
B7Ma	7.9	-
B5Me	6.1	4.7
PD	7.9	10.1

* max1 y max2 representan los vértices de los picos más alto y más bajo, respectivamente, en la curva de distribución del tamaño de poro.

De acuerdo con la *figura 8.18* es obvio que en los geles no dopados (muestras B7Ma y B5Me) el tamaño de poro es menor que en los geles que contienen proteína (P7Ma, P7Me, P5Ma, P5Me y PD). La comparación de las curvas de distribución de tamaño de poro (DTP) de los geles dopados P5Ma y PD, y el gel no dopado B7Ma, permite concluir que la proteína encapsulada aparentemente genera y ocupa los poros de mayor tamaño (Radio promedio ~10 nm). Por otra parte, no se observa una diferencia evidente, en lo que concierne a tamaños de poro, entre los geles preparados a pH 5 y pH 7, ni tampoco parece haber algún efecto debido a la forma de agitación (manual-Ma o mecánica-Me) del sol durante la etapa de hidrólisis. Asimismo, el hecho de que la proteína agregada se encuentre desnaturalizada (muestra etiquetada PD) no tiene influencia definitiva en el tamaño de poro.

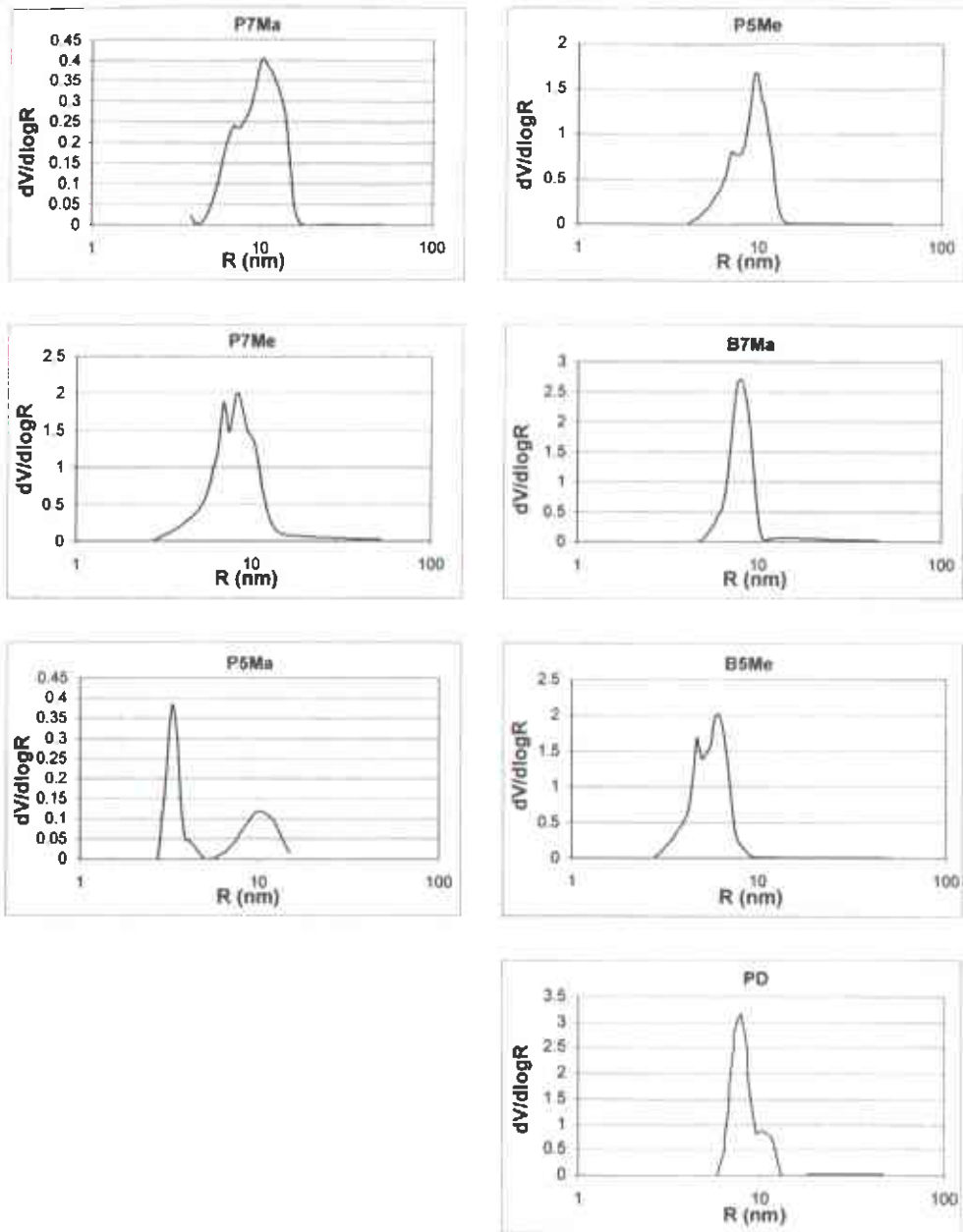


Figura 8.17 Gráficos de distribución de tamaño de poro (presentación logarítmica) de geles dopados y no dopados, preparados bajo diferentes condiciones experimentales.

El intervalo de tamaño de poro cubierto por las curvas DTP para todos los geles (Tabla 8.9) se sitúa en el rango de los mesoporos. En general se puede decir que los materiales preparados tienen poros desde un tamaño un poco mayor a 5 nm de diámetro (50 Å) hasta un máximo de 34 nm de diámetro (340 Å).

Tabla 8.9 Intervalo de diámetros (D) de poro en los materiales sol-gel sintetizados.

GEL	INTERVALO DE D (nm)
P7Ma	8-34
P7Me	5.4-27
P5Ma	5.4-9.6 y 11.2-30
P5Me	8.2-28.4
B7Ma	9.4-21.6
B5Me	5.6-18.8
PD	11.6-25.6

Por comparación con trabajos anteriores en los que se encapsularon anticuerpo policlonales en sol-gel^[30], en el presente trabajo se tiene un menor radio promedio de poro para la distribución correspondiente a los poros más grandes (alrededor de 10 nm para los biogeles dopados con ASB y entre 14-16 nm para los dopados con anticuerpos). Por otra parte el intervalo de radios de poro de los geles dopados con ASB abarca hasta un tamaño máximo de ~13-17 nm, mientras que las curvas DTP de los geles con anticuerpo llegan a alcanzar tamaños de radio de poro de más del doble. Estas diferencias están obviamente relacionadas con el tamaño de las biomoléculas; los anticuerpos tienen un peso molecular del orden de 150 000 daltons, mientras que la albúmina tiene un peso molecular de 66 000 daltons.

El tamaño de poro promedio obtenido por la técnica de termoporometría es significativamente mayor que el obtenido por adsorción de N₂, como se observa en la Tabla 8.10. Esto no es de extrañar puesto que el tratamiento previo de la muestra para la determinación BET implica un secado total del gel que ocasiona un fuerte colapso de la estructura porosa. Como puede verse, la diferencia de los resultados encontrados con las dos técnicas es proporcionalmente mayor en el caso del gel blanco (B7Ma) que en el gel dopado (P7Ma). La razón de ello es debida a la proteína que impide que los poros que la contienen se encojan excesivamente.

De la anterior discusión se deduce que los tamaños promedio de poro de las curvas DTP obtenidos por termoporometría son más representativos del material "tal como se usa", es decir, embebido en solución acuosa y sin haber sufrido un fuerte encogimiento por secado intensivo.

Tabla 8.10 Comparación de diámetro promedio de poro en un biogel dopado con ASB y en un gel blanco, determinado por dos diferentes técnicas.

GEL	TÉCNICA BET (nm)	TERMOPOROMETRÍA (nm)
P7Ma	9,7	13,8-20,4
B7Ma	4,1	15,8

El radio promedio de poro y el intervalo de tamaños de poro que se deducen de los termogramas están íntimamente relacionados con la escala de la temperatura, es decir con la temperatura correspondiente al vértice del pico exotérmico y con el intervalo de temperaturas que abarca la base de dicho pico. En efecto la termoporometría se basa en el fenómeno físico de abatimiento de la temperatura de congelación del agua libre (agua interparticular). Entre más pequeño es el poro, mayor es el abatimiento de dicha temperatura. Por lo tanto, la exactitud en la determinación del tamaño de poro depende de la buena calibración del aparato en lo que a temperatura registrada se refiere. Obviamente, el barrido debe ser suficientemente lento para que el sistema en estudio alcance sin retrasos la temperatura impuesta por el calorímetro.

El procedimiento utilizado para obtener los termogramas consistió de 3 ciclos o etapas. En la primera etapa se realizó una corrida bajando la temperatura de 0 a -30°C a velocidad rápida; durante esta etapa no se registro ningún dato pues se ha reportado⁽¹⁰³⁾ que comúnmente se presenta un fenómeno de sobre-enfriamiento y el agua en algunos poros no alcanza a congelarse, aún si se hiciera un barrido lento de temperatura. La segunda etapa consistió en un barrido lento, incrementando la temperatura desde -30°C hasta la aparición del pico de fusión de agua intersticial congelada. Este pico endotérmico es de interés ya que permite comprobar la buena calibración del aparato, en lo que a temperatura se refiere, puesto que el inicio del pico de fusión del agua libre debe estar situado a 0°C . Finalmente en la tercera etapa se vuelve a hacer un barrido de 0 a -30°C , pero esta vez a baja velocidad ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) y registrando el flujo de calor. Los termogramas presentados en la *figura 8.17* corresponden a esta tercera etapa, en la cuál el fenómeno de sobre-enfriamiento ya no se presenta, aparentemente debido a que se encuentran presentes núcleos de hielo del agua intersticial.

Dado el anterior procedimiento, se considera que durante el barrido de enfriamiento de la última etapa, la temperatura del sistema correspondió razonablemente bien con la temperatura registrada por el calorímetro. Además, durante la segunda etapa del proceso, se observó que el pico de fusión del agua intersticial congelada iniciaba prácticamente en 0°C para todas las muestras. Por tanto, los resultados de tamaño de poro reportados en las *tablas 8.8 y 8.9* son confiables.

IX. CONCLUSIONES

- El estudio realizado confirma que el proceso sol-gel es idóneo para la inmovilización de las moléculas, ya que permite preservar en gran medida su conformación tridimensional como quedó demostrado por la alta capacidad de retención de la ASB encapsulada.
- El confinamiento en poros de dimensión finita protege hasta cierto punto a la biomolécula del efecto de agentes tóxicos, como los disolventes orgánicos, los cuales provocarían la inmediata e irreversible desnaturalización de estas moléculas en solución.
- Se encontró que el proceso de inmovilización a pH 7 además de ser más rápido da como resultado geles con una mayor capacidad de enlace y periodos de vida útil más prolongados que los biogeles con ASB inmovilizada a pH 5.
- La sustitución de la agitación manual por la mecánica, en los dos dispositivos evaluados, permite optimizar el proceso de obtención de geles acortando el tiempo requerido para la hidrólisis del precursor TEOS. Para un grado de hidrólisis equivalente se logró una disminución de aproximadamente 50% en el tiempo.
- Para aquellos casos en que fuese estrictamente necesario llevar a cabo un proceso de inmovilización a pH 5 o valores cercanos a éste (hongos, enzimas), se establecieron los periodos de tiempo apropiados para adicionar la SSAF y la biomolécula sin que ésta se desnaturalice y pierda su actividad.
- Los estudios preliminares realizados con los solutos de prueba, naproxeno y clorhidrato de propranolol mostraron que los biomateriales con proteínas encapsuladas en sol-gel pueden ser un excelente medio para el estudio de las interacciones fármaco-proteína, de gran importancia en la investigación médica y farmacológica.

- La cromatografía de análisis frontal en cartuchos empacados con el biomaterial es el mejor medio para obtener datos termodinámicos de relevancia como constantes de complejación fármaco-proteína y, eventualmente, capacidad máxima de enlazamiento (moles de fármaco por mol de proteína). Sin embargo, esta técnica no es apropiada cuando la interacción entre las dos entidades es relativamente débil y/o de cinética lenta.
- La técnica de cargas discontinuas, desarrollada en este trabajo, permite subsanar la limitación mencionada en el punto anterior. Dado su diseño, se puede esperar medir con un buen grado de confiabilidad la capacidad de enlazamiento de un fármaco con la proteína encapsulada, independientemente de la cinética del proceso o la fuerza de la interacción. No obstante, este punto deberá ser comprobado y demostrado en trabajos posteriores utilizando una amplia variedad de compuestos de prueba.
- La caracterización física del biomaterial permitió establecer, que éste posee una gran superficie específica ($288 \text{ m}^2/\text{g}$, determinada por el método BET de adsorción de N_2) combinada con una buena distribución de tamaño de poro (intervalo de diámetro de poro de 5-30 nm, determinado por termoporometría), lo que permite el acceso no restringido de pequeñas moléculas como los fármacos.
- Aunque todavía queda mucho por realizar en lo que se refiere a los estudios de interacción fármaco-proteína mediante biomateriales sol-gel, se considera que el presente trabajo ha contribuido a sentar bases firmes para el desarrollo de investigaciones futuras en esta área.

X. PERSPECTIVAS

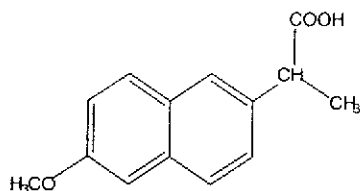
- Determinar el comportamiento de la ASB en solución acuosa (condiciones fisiológicas), antes de proceder a la inmovilización.
- Realizar la síntesis de biogeles con una mayor cantidad de ASB.
- Realizar la caracterización del biogel empleando Microscopía de Tunelaje, ya que este análisis puede llevarse a cabo con el gel húmedo, lo que proporcionaría datos más realistas sobre las propiedades morfológicas del biogel tal y como se encuentra durante los experimentos.
- Realizar ensayos carga/análisis con otro tipo de fármacos o analitos.
- Realizar ensayos con mezclas de solutos para determinar la selectividad en la capacidad de enlace de la ASB.



XI. APÉNDICE A

11.1 SOLUTOS DE PRUEBA

11.1.1 *Naproxeno*



(+)-6-metoxi- α -metil-2-ácido naftalenoacético

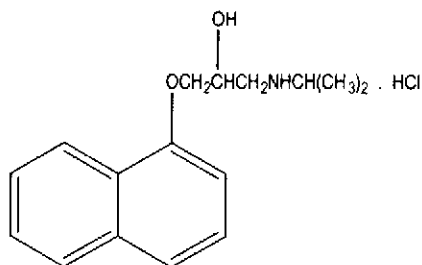
$C_{14}H_{14}O_3$ $PM= 230.26$ g/mol

Polvo o cristales blancos, p.f. $155^{\circ}C$, pKa 4.15, prácticamente insoluble en agua a pH 2, soluble en agua a pH 8, soluble en alcohol. Longitud máxima de absorción 254 nm^[107].

Es un derivado del ácido propiónico con propiedades antiinflamatorias (AINE), analgésicas y antipiréticas. Se comercializa como ácido y como sal sódica. Entre los antiinflamatorios no esteroideos se destacan los derivados del ácido arilacético o ácidos arilacéticos constituidos por un grupo arílico unido al ácido acético, que son analgésicos y antiinflamatorios muy potentes. El naproxeno tiene un grupo arílico que es el naftaleno unido al ácido propiónico.^[108] Está indicado para el tratamiento de los síntomas de la artritis reumatoide, dolor postoperatorio, cefaleas. Sus efectos analgésicos son comparables con los de la aspirina o la indometacina con las dosis habituales.

Parece absorberse completamente en el tracto gastrointestinal después de la administración oral. Los niveles plasmáticos máximos (aproximadamente 55 mg/mL) se alcanzan dentro de las 2-4 horas de una dosis de 500 mg. Más del 99% está unido a la albúmina sérica. La vida media plasmática es de alrededor de 13 h^[42].

11.1.2 *Propranolol*^[42, 109]



1-(isopropilamina)-3-(1-naftiloxi)-2-propranolol clorhidrato
1-[(1-metiletil(amino))]-3-(1-naftaleniloxi)-2-propranolol
C₁₆H₂₂ClNO₂ PM: 295.81 g/mol

Sólido blanco, punto de fusión entre 162-165°C, soluble en agua, alcohol, ligeramente insoluble en cloroformo y prácticamente insoluble en éter. En soluciones acuosas el propranolol se descompone con oxidación de la cadena de isopropilamina, acompañada por una disminución de pH y decoloración de la solución. Las soluciones son más estables a pH=3 y se descomponen rápidamente a pH alcalino. El valor de pKa es 9.45.

El propranolol es un bloqueador β-adrenérgico muy utilizado en el tratamiento clínico. Este fármaco se une competitivamente a los adrenoreceptores, disminuye la eficacia de los β-agonistas y consecuentemente la presión sanguínea, el impulso y la fuerza de contracción cardiaca. La estructura química del propranolol indica la presencia de un centro quiral que es el sitio específico por el cual ocurre la unión al receptor para realizar su actividad biológica. Cada isómero presenta un efecto farmacológico distinto; en una mezcla racémica el isómero *d*-propranolol es 40 veces más potente como antiarrítmico y antihipertensivo que el *l*-propranolol, de aquí se deriva la importancia de la resolución y la determinación del contenido de este principio activo en medicamentos.

XII. APÉNDICE B

12.1 Ecuación y curva de la isoterma Lagmuir.

La distribución de un soluto entre un adsorbente y una fase líquida, a una temperatura dada, puede representarse mediante un gráfico de concentración de soluto en el adsorbente en función de la concentración de soluto en la fase líquida al equilibrio. Esta gráfica recibe el nombre de isoterma de adsorción. En el caso de adsorbentes que interaccionan con los solutos a través de un número limitado de sitios (usualmente llamados sitios activos), las isotermas de adsorción son generalmente del tipo Lagmuir y obedecen a la ecuación:

$$C_{ad} = \frac{C_{ad(sat)} K C_{liq}}{1 + K C_{liq}} \quad (E-12.1)$$

Donde C_{ad} y C_{liq} , son las concentraciones del soluto en el adsorbente y en la fase líquida, respectivamente, al equilibrio; $C_{ad(sat)}$ representa la concentración de soluto en el adsorbente a saturación (cuando todos los sitios activos del adsorbente han sido ocupados por moléculas de soluto); K es la constante de asociación del soluto con el sitio activo.

Las isotermas tipo Lagmuir presentan tres zonas diferenciadas. En la región de bajas concentraciones de soluto o zona lineal, la concentración de soluto adsorbido aumenta proporcionalmente con la concentración en la fase líquida. En la región de altas concentraciones, la curva tiende asintóticamente al valor $C_{ad(sat)}$, conformando lo que se conoce como "meseta de saturación". En esta región, la concentración del soluto en el adsorbente es prácticamente constante e independiente de la concentración en la fase líquida. Finalmente, en la zona intermedia, el incremento de concentración en el adsorbente al aumentar la concentración en solución es cada vez más pequeño a medida que esta última aumenta.

Las zonas antes descritas corresponden a las siguientes condiciones:

- 1) $K C_{liq} \ll 1$ (zona lineal)
- 2) $K C_{liq} \gg 1$ (meseta de saturación)
- 3) Los términos "1" y " $K C_{liq}$ " no son despreciables uno frente a otro (zona intermedia).

En la *figura 12.1* se presenta, a manera de ilustración, el perfil de una isoterma tipo Lagmuir.

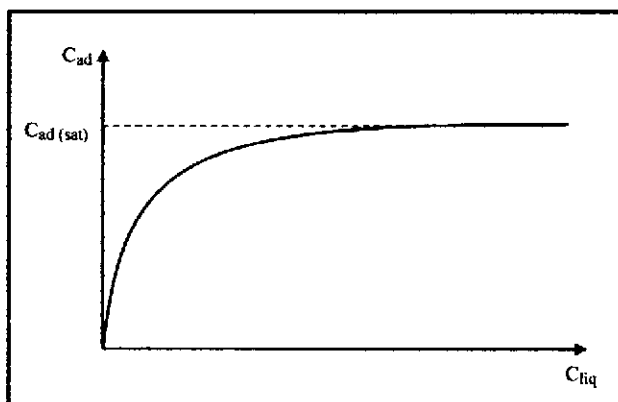


Figura 12.1 Representación de una isoterma tipo Lagmuir.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hage, D. 2002. *High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding*. **J. Chromatogr. B.** 768: 3-30.
2. *Encyclopedia of Chromatography*. 2001. Edited by Jack Cazes. Ed. Marcel Dekker. New York. USA.
3. Zusman, R. and Zusman, I. 2001. *Glass fibers covered with sol-gel glass as a new support for affinity chromatography columns: a review*. **J. Biochemical and Biophysical Methods.** 49: 175-187.
4. Hage, D. and Austin, J. 2000. *High-performance affinity chromatography and immobilized serum albumin as probes for drug- and hormone-protein binding*. **J. Chromatogr. B.** 739: 39-54.
5. Roy, I. and Nath, M. 2003. *Smart Polymeric Materials: Emerging Biochemical Applications*. **Chemistry and Biology.** 10:1161-1171.
6. Bhatia, R., Brinker, J., Gupta, A. and Singh, A. 2000. *Aqueous Sol-Gel Process for Protein Encapsulation*. **Chem. Mater.** 812: 2434-2441.
7. De Moraes, S., Passos, J., Schossler, P., Caramão, E., Costa, T. and Benvenutti, E. 2003. *Silica-titania sol-gel hybrid materials: synthesis, characterization and potential application in solid phase extraction*. **Talanta.** 59: 1039-1044.
8. Jin, W. and Brennan, J. 2002. *Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials*. **Anal. Chim. Acta.** 461: 1-36.
9. Jacobson, S. and Guiochon, G. 1992. *Enantiomeric Separations Using Bovine Serum Albumin Immobilized on Ion-Exchange Stationary Phases*. **Anal. Chem.** 64: 1496-1498.
10. Braun, S. Rappoport, R. Zusman, D. Avnir and M. Ottolenghi. 1990. *Biochemically active sol-gel glasses: The trapping of enzymes*. **Mater Lett.** 10: 1-5.
11. Yamanaka, S., Nishida, F., Ellerby, L., Nishida, C., Dunn, B., Valentine, J. and Zink, J. 1992. *Enzymatic activity of glucose oxydase encapsulated in transparent glass by the sol-gel method*. **Chem. Mater.** 4: 495-497.
12. Ellerby, L., Nishida, C., Nishida, F., Yamakana, S., Dunn, B., Selverstone, J. and Zink, J. 1992. *Encapsulation of Proteins in Transparent Porous Silicate Glasses Prepared by the Sol-Gel Method*. **Science.** 255: 1113-1115.
13. Wang, R., Narang, V., Prasad, N. and Bright, F. 1993. *Affinity of antifluorescein antibodies encapsulated within a transparent sol-gel glass*. **Anal. Chem.** 65: 2671-2675.

14. Gill, I. and Ballesteros, A. 2000. *Bioencapsulation within synthetic polymers (Part I): sol-gel encapsulated biologicals*. **Trends Biotechnol.** 18: 282-296.
15. Gonnelli, M. and Strambini, G. 2003. *Structure and dynamics of proteins encapsulated in silica hydrogels by Trp phosphorescence*. **Biophysical Chemistry.** 104: 155-169.
16. Livage, J. 1997. *Sol-gel processes*. **Current Opinion in Solid State & Materials Science.** 2: 132-138.
17. Brinker, J. and Scherer, G. 1990. *Sol-Gel Science. The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Academic Press, USA.
18. Sakai-Kato, K., Kato, M., Nakakuki, H. and Toyooka T. 2003. *Investigation of structure and enantioselectivity of BSA-encapsulated sol-gel columns prepared for capillary electrochromatography*. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 31: 299-309.
19. Morales, E. 2003. *Preparación de sensores químicos y bioquímicos por la técnica sol-gel*. **Tesis de Maestría en Ciencias Químicas**. UNAM. pp 65-70.
20. Vera L. E., Morales, E. and García, M. P. 2004. *Activity and reusability of sol-gel encapsulated α -amilase and catalase. Performance in flow-through systems*. **J. Sol-Gel Science. Technol.** 30: 197-204.
21. Dunn, B., Miller, J. M., Dave, B. C., Valentine, J. S. and Zink, J. I. 1998. *Strategies for encapsulating biomolecules in sol-gel matrices*. **Acta Mater.** 46: 737-741.
22. Rodríguez, S. A. and Colón, L. A. 1999. *Investigations of a sol-gel derived stationary phase for open tubular capillary electrochromatography*. **Anal. Chim. Acta.** 397: 207-218.
23. Siouffi, A. 2003. *Silica gel-based monoliths prepared by the sol-gel method: facts and figures*. **J. Chromatogr. A.** 1000: 801-818.
24. Lecloux, A. and Pirard, J. 1998. *High-temperature catalysts through sol-gel synthesis*. **J. Non-Cryst. Solids.** 225: 146-152.
25. Dunbar, R. A., Jordan, J. D. and Brigh, F. V. 1996. *Development of chemical sensing platforms based on sol-gel derived thin films: Origin of film age vs performance trade offs*. **Anal Chem.** 68: 604-610.
26. Lan, E. H., Dave, B. C., Fukuto, J. M., Dunn, B., Zink, J. I. and Valentine, J. S. 1999. *Synthesis of sol-gel encapsulated heme proteins with chemical sensing properties*. **J. Mater. Chem.** 9: 45-53.

27. Loy, D. A., Russick, E. M., Yamanaka, S. A. and Baugher, B. M. 1997. *Direct formation of aerogels by sol-gel polymerization of alcoxysilanes in supercritical carbon dioxide.* **Chem. Mater.** 9: 2264-2268.
28. Venton, D. L. 1984. *Entrapment of a highly specific antiprogestosterone antiserum using polysiloxane copolymers.* **Biochim. Biophys. Acta.** 797: 343-347.
29. Glad, M. 1985. *Use of silane monomers for molecular imprinting and enzyme entrapment in polysiloxane-coated porous silica.* **J. Chromatogr. A** 347: 11-23.
30. Vázquez, L., J. C. 2003. *Desarrollo, evaluación y caracterización de inmunoabsorbentes para la extracción en fase sólida de pesticidas a partir de muestras acuosas y su determinación por cromatografía de líquidos.* **Tesis de Doctorado. UNAM.** pp. 53-56, 133-137, 202-205, 217-224.
31. Cichna, M., Markl, P., Knopp, D. and Niessner, R. 2001. *On-line coupling of sol-gel generated immunoaffinity columns with high-performance liquid chromatography.* **J. Chromatogr. A.** 919:51-58.
32. Kato, M., Sakai-Kato, K., Matsumoto, N., and Toyo'oka T. 2002. *A Protein-Encapsulation Technique by the Sol-Gel Method for the preparation of Monolithic Columns for Capillary Electrochromatography.* **Anal. Chem.** 74: 1915-1921.
33. Dave, B., Dunn, B., Selverstone, J. and Zink, J. 1994. *Sol-Gel Encapsulation Methods for Biosensors.* **Anal. Chem.** 66 (22): 1120A-1127A.
34. Kato, M., Matsumoto, N., Sakai-Kato, K. and Toyo'oka T. 2003. *Investigation of chromatographic performances and binding characteristics of BSA-encapsulated capillary column prepared by sol-gel method.* **J. Pharm. Biomed. Anal.** 30: 1845-1850.
35. Liu, D. M. and Chen, I-W. 1999. *Encapsulation of protein molecules in transparent porous silica matrices via an aqueous colloidal sol-gel process.* **Acta Mater.** 47: 4535-4544.
36. Santos, E., Radin, S. and Ducheyne, P. 1999. *Sol-gel derived carrier for the controlled release of proteins.* **Biomaterials.** 20: 1695-1700.
37. Lin, J. and Brown, C. 1997. *Sol-gel glass as a matrix for chemical and biochemical sensing.* **Trends in Anal. Chem.** 16 (4): 200-211.
38. Eggers, D. and Valentine, J. 2001. *Crowding and Hydration Effects on Protein Conformation: A study with Sol-Gel Encapsulated Proteins.* **J. Mol. Biol.** 314: 911-922.
39. Edmiston, P., Wambolt, C., Smith, M. and Saavedra, S. 1994. *Spectroscopic Characterization of Albumin and Myoglobin Entrapped in Bulk Sol-Gel Glasses.* **J. Colloid Interface Sci.** 163: 395-406.
40. Dunn, B. and Zink, J. 1997. *Probes of Pore Environment and Molecule-Matrix Interactions in Sol-Gel Materials.* **Chem. Mater.** 9: 2280-2291.

41. Wade, L.G. 1993. *Química Orgánica*. 2a edición. Prentice-Hall Hispanoamericana, México.
42. Gennaro, A., R. 2003. *Remington Farmacia*. Tomos 1 y 2. 20ª edición. Ed. Médica Panamericana. México. pp. 504-506, 1565.
43. Ercelen, S., Klymchenko, A. and Demchenko, A. 2003. *Novel two-color fluorescence probe with extreme specificity to bovine serum albumin*. **FEBS Letters**. 538: 25-28.
44. Gelamo, E., Silva, C., Imasato, H. and Tabak, M. 2002. *Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants; spectroscopy and modelling*. **Biochim. Biophys. Acta**. 1594: 84-99.
45. Huang, B. and Kim, H. 2004. *Probing Three-Dimensional Structure of Bovine Serum Albumin by Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry*. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.** 15: 1237-1247.
46. Friedli, G., L. "Interaction of deamidated soluble wheat protein (SWP) with other food proteins and metals". A Thesis presented for the Award of Doctor of Philosophy to the University of Surrey. [en línea] [Referencia del 24 de Marzo 2004] Disponible en World Wide Web: <http://www.friedli.com/research/PhD/chapter5.htm>
47. Silva, D., Cortez, C., Cunha-Bastos, J. and Louro, S. 2004. *Methyl parathion interaction with human and bovine serum albumin*. **Toxicology Letters**. 147: 53-61.
48. Sulkowska A. 2002. *Interaction of drugs with bovine and human serum albumin*. **J. Mol. Structure**. 614: 227-232.
49. Ferrer, M., Duchowicz, R., Carrasco, B., García de la Torre, J. and Acuña, U. 2001. *The Conformation of Serum Albumin in Solution: A Combined Phosphorescence Depolarization-Hydrodynamic Modelling Study*. **Biophysical Journal**. 80: 2422-2430.
50. Bill, X. H. and Kim, H-Y. 2004. *Probing Three-Dimensional Structure of Bovine Serum Albumin by Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry*. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.** 15: 1237-1247.
51. Farkas, N., Belagyi, J. and Lórinçzy, R. 2003. *Calorimetric and spectroscopic properties of small globular proteins (bovine serum albumin) after free radical generation*. **Thermochim. Acta**. 404: 141-148.
52. Militello, V., Casarino, C., Emanuele, A., Giostra, A., Pullara, F. and Leone, M. 2004. *Aggregation kinetics of bovine serum albumin studied by FTIR spectroscopy and light scattering*. **Biophysical Chemistry**. 107: 175-187.
53. Carter, D. C. and Ho, J. X. 1994. Structure of Serum Albumin. **Adv. Protein Chem.** 45: 153-203.

54. Yang, J. and Hage, D. 1993. *Characterization of the binding and quiral separation of D- and L-tryptophan on a high-performance immobilized human serum albumin column.* **J. Chromatogr.** 645: 241-250.
55. Velasco, M. A. Velásquez. 1993. *Farmacología*. 16^a ed. Ed. Interamericana, Mc Graw Hill. España.
56. Fitos, I., Visy, J. And Simonyi, M. 2002. *Species-dependency in chiral-drug recognition of serum albumin studied by chromatographic methods.* **Journal Biochemical and Biophysical Methods.** 54: 71-84.
57. Haginaka, J. 2001. *Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparations.* **J. Chromatogr. A.** 906: 253-273.
58. Jia Z., Ramstad T. and Zhong M. 2002. *Determination of protein-drug constants by pressure assisted capillary electrophoresis (PACE)/frontal análisis(FA).* **J. Pharm. Biomed. Anal.** 30:405-413.
59. Ohmishi T., Latif A., Shibukawa A., Karoda Y., Nakagawa T., Glzawy E., Askal H. and Comos E. 2002. *Frontal análisis of drug-plasma lipoprotein binding using capillary electrophoresis.* **J. Pharm. Biomed. Anal.** 27: 607-614.
60. Nakamaru, Y. and Sato, C. 2000. *Identical independent sites for dye ligand on bovine serum albumin demonstrated by multivariate analysis.* **Biochim. Biophys. Acta.** 1480: 321-328
61. Erim F. and Kraak J. 1998. *Vaccancy affinity capillary electrophoresis to study competitive Protein-drug binding.* **J. Chromatogr. B.** 710: 205-210
62. Kratochwil, N., Huber, W., Muller, F., Kansy, M. and Gerber, P. 2002. *Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach.* **Biochemical Pharmacology.** 64: 1355-1374.
63. Foster, R. W. 1991. *Farmacología Básica*. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
64. Lammers, N., De Bree H., Groen, C., Ruijten, H. and De Jong, B. 1989. *Determination of Drug Protein-Binding by High Performance Liquid Chromatography Using a Chemically Bonded Bovine Albumin Stationary Phase.* **J. Chromatogr. B.** 496: 291-300.
65. Birnbaum, S. And Nilsson, S. 1992. *Protein-Based Capillary Affinity Gel Electrophoresis for the Separation of Optical Isomers.* **Anal. Chem.** 64: 2872-2874.
66. Birla, L., Cristian, A. and Hillebrad, M. 2004. *Absorption and steady state fluorescence study of interaction between eosin and bovine serum albumin.* **Spectrochimica Acta Part A.** 60: 551-556.
67. Sulkowska, A., Równicka, J., Bojko, B. and Sulkowski, W. 2003. *Interaction of anticancer drugs with human and bovine serum albumin.* **Journal of Molecular Structure.** 651-653: 133-140.

- 68 Lough, W., J. 1986. *Chiral Liquid Chromatography*. Jhon Wiley and Sons. USA.
68. Pedersen, L., Mollerup, J., Hansen, M., Hansen, E. and Jungbauer, A. 2003. *Whey proteins as a model system for chromatographic separation of proteins*. **J. Chromatogr. B.** 790: 161-173.
69. Hahn, R., Deinhofer, K., Machold, C. and Jungbauer, A. 2003. *Hydrophobic interaction chromatography of proteins II. Binding capacity, recovery and mass transfer properties*. **J. Chromatogr. B.** 790: 99-114.
70. Ye, M., Zou, H., Liu, Z., Wu, R., Lei, Z. and Ni, J. 2002. *Study of competitive binding of enantiomers to protein by affinity capillary electrochromatography*. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 27: 651-660.
71. Abe, Y., Fukui, S., Koshiji, Y., Kobayashi, M., Shoji, T., Nishizawa, H., Suzuki, H. and Iwata, K. 1999. *Enantioselective binding sites on bovine serum albumin to dansyl amino acids*. **Biochim. Biophys. Acta.** 1433: 188-197.
72. Zhang, Q., Zou, H., Wang, H. and Ni, J. 2000. *Synthesis of a silica-bonded bovine serum triazine chiral stationary phase for high-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers*. **J. Chromatogr. A.** 866: 173-181.
73. Witsuba, D. and Schuring, V. 2000. *Enantiomer separation of quiral pharmaceuticals by capillary electrochromatography*. **J. Chromatogr. A.** 875: 255-276.
74. Simek, Zdenek and Vespalec, R. 1993. *Chromatographic properties of chemically bonded bovine serum albumin working as a chiral selector in alkaline mobile phases*. **J. Chromatogr.** 629: 153-160.
75. Yanagisawa, Y., Nakazato, K. and Nagai, T. 1997. *Binding of methamphetamine to serum albumin in varios species in vitro*. *Pharmaceutical Research.* 35(2): 99-102.
76. Tanaka, N., Kobayashi, H., Ishizuka, N., Minakuchi, H., Nakanishi, K., Hosoya. And Ikegami, T. 2002. *Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations*. **J. Chromatogr. A.** 965: 35-49.
77. Hubbuch, J., Linden, T., Knieps, E., Thommes, J. and Kula, M. 2003. *Mechanism and kinetics of protein transport in chromatographic media studied by confocal laser scanning microscopy. Part II. Impact on chromatographic separations*. **J. Chromatogr. A.** 1021: 105-115.
78. Aguilar, A. "Caracterización y Metrología". [en línea] En libro de resúmenes: XXIV Congreso Nacional Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales. [Referencia del 12 de Febrero 2005] Disponible en World Wide Web: http://www.smcsyv.org.mx/es/congreso/XXIV/sesiones/caracterizacion_metrologia.htm.
79. Millot, M. 2003. *Separation of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis, using immobilized proteins as chiral selectors*. **J. Chromatogr. B.** 623: 1-28.

80. Universidad de Alicante. Secretariado de Instrumentación Científica y Apoyo a la Investigación. "Adsorción Física de Gases" [en línea]. Muñoz, G., M y Llopis, V., S. España. [Referencia del 08 de Diciembre 2004] Texinfo. Disponible en World Wide Web: http://www.ua.es/es/investigacion/sti/carac_textural.htm
81. Leinweber, F. and Tallarek, U. 2003. *Chromatographic performance of monolithic and particulate stationary phases. Hydrodynamics and adsorption capacity*. **J. Chromatogr. A.** 1006: 207-228.
82. Feng, B., Weng, J., Yang, B. C., Chen, J. Y., Zhao, J. Z., He, L., Qi, S. K. and Zhang, X. D. 2003. *Surface characterization of titanium and adsorption of bovine serum albumin*. **Materials Characterization.** 49: 129-137.
83. Mansur, H., Vasconcelos, W., Lenza, R., Oréface, R., Reis, E. and Lobato, Z. 2000. *Sol-gel silica based networks with controlled chemical properties*. **J. Non-Cryst. Solids.** 273: 109-115.
84. Arafa, I., Fares, M. and Barham, A. 2004. *Sol-gel preparation and properties of interpenetrating, encapsulating and blend silica-based urea-formaldehyde hybrid composite materials*. **European Polymer Journal.** 40: 1477-1487.
85. Arizmendi, C. "Determinación del área superficial de los catalizadores, BET (Brunauer-Emmett-Teller)". [en línea] México [Referencia del 21 de Noviembre 2004] Texinfo. Disponible en World Wide Web: <http://www.monografias.com/trabajos/ecuarrheni/ecuarrheni.shtml>
86. Chumbley, S. "The world of Scanning Microscopy". Iowa State University. Materials Science & Engineering Dept. [en línea]. [Referencia del 21 de Noviembre 2004]. Disponible en World Wide Web: <http://www.mse.iastate.edu/microscopy/home.html>
87. Davidson, M. "Introduction to Optical Microscopy, Digital Imaging and Photomicrography". Iowa State University. Materials Science & Engineering Dept. [en línea]. [Referencia del 09 de Enero 2004]. Disponible en World Wide Web: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/index.html>
88. Meyers, R. A. *Encyclopedia of Analytical Chemistry. Applications, Theory and Instrumentation*. Jhon Wiley & Sons. (6): 5534-5549, (7):5971-5975.
89. Rámila, A. and Vallet-Regi, M. 2001. *Static and dynamic in vitro study of a sol-gel glass bioactivity*. **Biomaterials.** 22: 2301-2306.
90. Colomer, M. and Anderson, M. 2001. *High porosity silica xerogels prepared by a particulate sol-gel route: pore structure and proton conductivity*. **J. Non-Cryst. Solids.** 290: 93-104.
91. "Adsorción de gases por sólidos. Isotermas de adsorción desorción. Porosidad". [en línea]. [Referencia del 16 de Diciembre 2004]. Disponible en World Wide Web: www.uco.es/~iq2sagri/TranspAdsGases.pdf.

92. Rodríguez, R. F. "Carbón activado: estructura, preparación y aplicaciones". Adsorción de gases por sólidos. [en línea]. [Referencia del 09 de Junio de 2004]. Disponible en World Wide Web: <http://www.prof.uniandes.edu.co/%7Einfquimi/revista01/id71.htm>.
93. Maloney, T. Helsinki. "Measurement of pore size distribution with DSC". Mettler Toledo [en línea]. [Referencia del 18 de Diciembre 2004]. Disponible en World Wide Web: <http://www.astrascientific.com/Usercom/tausc12u.pdf>.
94. Coradin, T., Coupé, A. and Livage, J. 2003. Interactions of bovine serum albumin and lysozyme with sodium silicate solutions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 29: 189-196.
95. Rigby, S., Fletcher, R. and Riley, S. 2004. Characterisation of porous solids using integrated nitrogen sorption and mercury porosimetry. **Chemical Engineering Science**. 59: 41-51.
96. Rigacci, A., Achard, P., Ehrburger-Dolle, F. and Pirard, R. 1998. Structural investigation in monolithic silica aerogels and thermal properties. **J. Non-Cryst. Solids**. 225: 260-265.
97. Maloney, T. C. 2000. Measurement of pore size distribution with DSC. Interpreting DSC curves; Part 2: Isothermal measurements. Information for users of METTLER TOLEDO thermal analysis systems. pp: 15-17.
98. Deffay, R., Prigogine, I. Bellemans, A. 1966. *Surface tension and adsorption*. New York. Wiley.
99. Beurroies, I., Deboyl, R., Llewellyn, P. and Rouquerol, J. 2004. A comparasion between melting-solidification and capillary condensation hysteresis in mesoporous materials: application to the interpretation of thermoporometry data. **Thermochim. Acta**. 421: 11-18.
100. Iza, M., Woerly, C., Danumah, C., Kaliaguine, S. and Bousmina, M. 2000. Determination of pore size distribution for mesoporous materials and polymeric gels by means of DSC measurements: thermoporometry. **Polymer**. 41: 5885-5893.
101. Yamamoto, T., Endo, A., Inagi, Y., Ohmori, T. and Nakaiwa, M. 2005. Evaluation of Thermoporometry for Characterization of mesoporous materials. **Colloid Interface Sci**. 171: 614-620.
102. Ishikiriya, K. and Todoki, M. 1995. Pore Size Distribution Measurements of Silica Gels by Means of Differential Scanning Calorimetry. II. Thermoporosimetry. **J. Colloid Interface Sci**. 171: 103-111.
103. Ishikiriya, K., Todoki, M. and Motomura, K. 1995. Pore Size Distribution (PSD) Measurements of Silica Gels by Means of Differential Scanning Calorimetry. I. Optimization for Determination of PSD. **J. Colloid Interface Sci**. 171: 92-102.
-

104. Vera, A. L., Gallegos, P. J. and Camacho, F. E. 1999. *Frontal analysis of aqueous phenol solutions in amberlite XAD-4 columns. Implications on the operation and design of solid phase extraction systems.* **Talanta.** 50: 509-526.
105. Bronshtein, A., Aharonson, N., Avnir, D., Turniansky, A. and Altstein, M. 1997. *Sol-gel matrixes doped with atrazine antibodies: Atrazine binding properties.* **Chem. Mater.** 9: 2632-2639.
106. Merck. *The Merck Index.* Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 1996. Merck Research Laboratories Division of Merck & CO. USA.
107. Goodman & Gilman. 1999. *Las Bases Biológicas de la Terapéutica.* Ed. Médica Panamericana.
108. Ruiz, R., Ávila, R. And González, J. 1998. *Propranolol y sus Estéres: Detección y Resolución Enantiomérica.* **Rev. Cubana Farm.** (32)2: 130-139).

