



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Caracterización fisicoquímica de mezclas pluronics - polímeros derivados
de la celulosa para su uso en formulaciones farmacéuticas**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Xelhua Elihut Marcos Benítez

**Dra. Silvia del Socorro Pérez Casas
Facultad de Química**

Ciudad Universitaria, Facultad de Química, Diciembre 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS

**Caracterización fisicoquímica de mezclas pluronics - polímeros derivados
de la celulosa para su uso en formulaciones farmacéuticas.**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. XELHUA ELIHUT MARCOS BENÍTEZ



TUTOR: Dra. Silvia del Socorro Pérez Casas

AÑO: 2016

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE

SECRETARIO

VOCAL

1ER. SUPLENTE

2DO. SUPLENTE

Dr. Miguel Antonio Costas Basín

Dr. Aarón Rojas Aguilar

Dra. Helgi Helene Jung Cook

Dr. Efrén Hernández Baltazar

Dra. María Josefa Bernad Bernad

LUGAR DE TRABAJO:

Laboratorio 301 de Biofísicoquímica, edificio F.

Departamento de Físicoquímica

Facultad de Química, UNAM

TUTOR DE TESIS:

Dra. Silvia del Socorro Pérez Casas

PRESENTACIÓN EN CONGRESOS:

POLYMAT SYLCOM, 2013, Huatulco, Oaxaca, México, del 13 al 17 de octubre.

Con el trabajo titulado “Surface tension study of interaction between PEO20-PPO70-PEO20 and hydroxyethyl cellulose in aqueous solution”.

20 th. International Symposium on Surfactant in Solution, SIS 2014, Coimbra, Portugal, del 22 al 27 de junio.

Con el trabajo titulado: “Thermodynamic properties of triblock copolymer and a biopolymer mixtures in aqueous solution”

3 Congreso de la Red Temática de Materia Condensada Blanda, 2014, San Luis Potosí, México, del 27 al 30 de Noviembre.

Con el trabajo titulado: “Termodinámica de la encapsulación de Amiodarona en P123 y F127”

PUBLICACIONES:

X. Marcos, E. Carrillo-Nava, S. Pérez-Casas; Interactions between a triblock copolymer and hydroxyethyl cellulose in aqueous solution and their use in the solubilization of Amiodarone” Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 504 (2016) 86-94.

X. Marcos, S. Pérez-Casas, J. Llovo, A. Concheiro, C. Álvarez-Lorenzo; Poloxamer-hydroxyethyl cellulose-a-cyclodextrin supramolecular gels for sustained release of griseofulvin, Int. J. Pharm. 500 (2016) 11-19.

M. L. Rodríguez-Loya, X. Marcos, S. Perez-Casas, E. Carrillo-Nava; Physicochemical study of the enhanced solubilization of poorly soluble compounds with biological activity through triblock copolymer aqueous solution. Enviado.

AGRADECIMIENTOS:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (becario 204883) para la realización de mis estudios doctorales.

A la Dra. Silvia del Socorro Pérez Casas por todo su apoyo durante la realización del proyecto.

Al Posgrado en Ciencias Químicas (UNAM) por el apoyo.

A los doctores Carmen Álvarez y Ángel Concheiro por recibirme en las instalaciones de la Universidad de Santiago de Compostela.

Al comité tutor por sus comentarios.

A todas las personas que han contribuido de alguna manera en este proyecto: compañeros, amigos y familiares. ¡Gracias por su apoyo!

“ESTE TRABAJO ESTA DEDICADO CON RESPETO Y CARIÑO AL PUEBLO DE MÉXICO, QUE SIN SU APOYO ECONÓMICO NO SE FORMARIAN TANTOS POSGRADUADOS”



Contenido

ABSTRACT	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN	5
1. MARCO TEORICO.....	7
1.1.SISTEMAS POLÍMERO-TENSOACTIVO.....	7
1.1.1. Generalidades.....	7
1.1.2. Aplicaciones de los Sistemas Polímero-Tensoactivo	9
1.1.3. Materiales Poliméricos.....	11
1.1.4. Comportamiento de las Fases en los Sistemas Polímero-Tensoactivo.....	14
1.1.5. Complejo Polímero-Tensoactivo.....	15
1.2. TENSIÓN SUPERFICIAL	16
1.2.1. Definición de la Tensión Superficial desde el Punto de Vista Termodinámico	16
1.2.2. Termodinámica de Superficie al Equilibrio	18
1.2.3. Ecuación de Gibbs.....	18
1.2.4. Proceso de Difusión	22
1.3. CALORIMETRÍA.....	24
1.3.1. Calorimetría Diferencial de Barrido para Líquidos.....	25
1.3.2. Formación de Micelas Poliméricas Tribloque PEO-PPO-PEO.....	25
1.4. MICELAS POLIMÉRICAS Y SU USO EN FARMACIA	27
1.4.1. Generalidades.....	27
1.4.2. Hidrogeles	28
2. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LA MEZCLA PLURONIC (PEO ₂₀ -PPO ₇₀ -PEO ₂₀)-HIDROXIETIL CELULOSA.....	32
2.1. OBJETIVO E HIPÓTESIS	32
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.2.1. Materiales.....	33
2.2.2. Estudios de Solubilidad de la Amiodarona y Cálculo del Porcentaje de Encapsulación..	33
2.2.3. Viscosidad Intrínseca	34
2.2.4. Tensión Superficial Dinámica (método gota pendiente).....	34
2.2.4. Calorimetría Diferencial de Barrido.....	35
2.2.5. Dispersión Dinámica de Luz.....	36

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
2.3.1. Solubilización de la Amiodarona	37
2.3.2. Tensión Superficial	40
2.3.3. Calorimetría Diferencial de Barrido.....	47
2.3.4. Tamaño de Partícula.....	53
2.4. CONCLUSIONES	61
3. FORMACIÓN DE UN GEL SUPRAMOLECULAR (P123+HEC+ α -CD).....	62
3.1. OBJETIVOS:	62
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	62
3.2.1. Materiales	62
3.2.2. Solubilidad de griseofulvina en mezclas P123-HEC.....	62
3.2.3. Formación del hidrogel (P123+HEC+ α CD).....	63
3.2.4. Estudios de liberación	63
3.3. RESULTADO Y DISCUSIÓN.....	64
3.3.1. Solubilidad de griseofulvina en mezclas P123-HEC.....	64
3.3.2. Formación del hidrogel supramolecular (P123+HEC+ α -CD).....	65
3.3.3. Liberación de griseofulvina.....	67
3.4. CONCLUSIONES	69
4. REFERENCIAS	70
5. ANEXOS.....	75
5.1. Publicaciones.....	75
5.2 Fundamentos de las Técnicas Experimentales.....	93
5.2.1. Fundamento de Viscosidad Intrínseca:.....	93
5.2.2. Fundamento del Método de Gota Pendiente	94
5.2.3. Fundamento de Calorimetría Diferencial de Barrido	95
7.2.4. Fundamentos de Dispersión Dinámica de Luz.....	97
5.3. Datos Experimentales	98
5.3.1. Datos de la curva de calibración de amiodarona en agua.....	98
5.3.2. Datos de tensión superficial dinámica de la Figuras 2.5 y 2.6.	99
5.3.3. Datos de tensión al equilibrio obtenidos con la ecuación de Ward y Tordai para tiempos largos, Figuras 2.7 y 2.10.	100

ABSTRACT

Mixtures of different kinds of polymers are used to improve the solubility of hydrophobic drugs. The addition of a second polymer to the formulation can enhance the function of the first one making it more efficient. For this reason these systems are extensively studied. The first aim of this work was to study the interactions between the copolymer poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO20-PPO70-PEO20, P123) and the biopolymer hydroxyethyl cellulose (HEC) in aqueous solutions through different techniques. In second place, we used this mixture to enhance the solubility of hydrophobic drugs (amiodarone (ADA) and griseofulvine (GRS)). Finally we achieved a slow release of GRS from an hydrogel formed by P123+HEC+ α cyclodextrins (CD).

Differential scanning calorimetry (DSC) was used to obtain the thermodynamic parameters of micellization of P123 solutions at different concentrations, and to measure the effect of adding HEC on the energetics of micellization. For pure P123 aqueous solutions the critical micelle temperature (CMT) decreases as the copolymer concentration increases. For this system, the enthalpy of aggregation (ΔH_{ag}) is independent of the concentration. Fixing the concentration of P123 and increasing gradually the concentration of HEC up to the solubility limit does not modify the ΔH_{ag} in comparison for the pure P123 system. This suggests that HEC does not affect P123 aggregation process.

The equilibrium surface tension (σ_{eq}) was measured using the pendant drop technique at 298.15 K for pure P123 aqueous solutions and for mixtures where the concentration of HEC was fixed and the concentration of P123 was gradually modified. The concentration of saturation (C_s) and the extended critical aggregation concentration (CAC_e) were calculated for the mixtures. The equilibrium surface tension values show that the addition of HEC to P123 solutions promotes the aggregation of P123 monomer on the HEC polymers until saturation.

Dynamic light scattering (DLS) was used to measure the hydrodynamic diameter (d_h) of different aggregates formed in solution. P123 micelles had a d_h of 18 nm, while HEC aggregates had 34 nm. The mixture of these two polymers formed aggregates with a d_h of 87 nm.

The solubility of the hydrophobic drug ADA was enhanced in the presence of P123 micelles. The inclusion of ADA into the P123 micelles did not modified the σ_{eq} , but decreased the ΔH_{ag} and reduced the micelles size. This suggests the binding of ADA to the hydrophobic core of the P123. The addition of HEC to the loaded micelles did not change the σ_{eq} , but augmented the ΔH_{ag} . We found an aggregate with bigger size than the individual components, suggesting that HEC provides a second protecting shell for the amiodarone. With values of DLS measurements, we propose a scheme for the formation of the different aggregates in water.

The solubility of GRS was greater in the P123+HEC mixture than that achieved with each polymer by separate. The addition of α cyclodextrin to this mixture, promoted the formation of a supramolecular hydrogel, without decreasing GRS solubility. This hydrogel sustained the slow release of the drug for at least three weeks.

RESUMEN

Los polímeros son utilizados para mejorar la solubilidad de fármacos hidrofóbicos y la mezclas de polímeros en la formulación puede ayudar a mejorar las propiedades como la microviscosidad, aumento de solubilidad, retardar el tiempo de liberación, aumentar el punto de turbidez entre otras. Por lo que estos sistemas han sido investigados ampliamente. El primer objetivo de este trabajo fue estudiar las interacciones entre el copolímero poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (PEO₂₀-PPPO₇₀-PEO₂₀, P123) y el biopolímero hidroxietilcelulosa (HEC) en solución acuosa por tres técnicas diferentes. El segundo objetivo, fue utilizar la mezcla P123+HEC para mejorar la solubilidad de los fármacos hidrofóbicos amiodarona (ADA) y griseofulvina (GRS). Finalmente, se logró la lenta liberación de GRS de un hidrogel formado por P123+HEC+ α ciclodextrina.

Por medio de la calorimetría diferencial de barrido se pudo obtener los parámetros termodinámicos de micelización para P123 en agua a diferentes concentraciones y medir el efecto de adicionar HEC en la energética de micelización. Las temperaturas críticas de micelización (CMT) para las soluciones de P123 disminuyen conforme la concentración de copolímero se incrementa. Para este sistema la entalpía de agregación (ΔH_{ag}) es independiente de la concentración. Fijando la concentración de P123 e incrementando gradualmente la concentración de HEC hasta los límites de solubilidad, no se modifica el ΔH_{ag} en comparación al sistema P123 puro. Esto sugiere que la adición de HEC no afecta la transición del P123.

También se obtuvieron valores de tensión superficial al equilibrio (σ_{eq}) por medio de los datos de tensión superficial dinámica a 298.15 K, de soluciones de P123 en agua y para mezclas donde la concentración de HEC se mantuvo constante y se modificó la concentración de P123 gradualmente. Se logró determinar la concentración de saturación (C_s) y la concentración de agregación crítica extendida (CAC_e) para las mezclas. Los valores de tensión superficial al equilibrio (σ_{eq}) mostraron que la adición de HEC a las soluciones de P123 promueve la agregación de monómeros de P123 sobre el polímero HEC hasta la saturación.

Utilizamos la técnica de dispersión dinámica de luz (DDL) para medir los diámetros hidrodinámicos (d_h) de los diferentes agregados formados en solución. Para las micelas de P123 el d_h fue de 18 nm, mientras que el agregado de HEC obtuvo un d_h de 34 nm. En solución acuosa la mezcla de los polímeros forma un agregado de 87 nm.

La solubilidad del fármaco hidrofóbico ADA se mejora notablemente en la solución micelar de P123 sin modificar la σ_{eq} de la solución micelar. La presencia de ADA disminuye la ΔH_{ag} y reduce el tamaño micelar. Esto sugiere la unión de ADA al centro hidrofóbico de la micela de P123. La adición de HEC a la solución con micelas cargadas de ADA no modifica el valor de σ_{eq} , pero aumenta el valor de ΔH_{ag} formando un agregado de mayor tamaño que sus componentes individuales, sugiriendo que HEC provee de una segunda capa protectora al fármaco. Con los valores de DDL, se pudo proponer un esquema de la formación de los diferentes agregados en agua.

Finalmente la mezcla P123+HEC se utilizó para la formación de un gel. Para fomentar la estabilidad del gel se adicionó α ciclodextrina que promueve el entrecruzamiento mejorando sus propiedades de estabilidad, adición y viscosidad. Este gel aumenta la solubilidad de griseofulvina (GRS) y sostiene la lenta liberación de fármaco al menos por tres semanas, mostrando un gran potencial para aplicaciones tópicas o mucosas.

INTRODUCCIÓN

Las mezclas de polímero y tensoactivo son ampliamente utilizadas en diversas industrias para la elaboración de detergentes, pinturas, alimentos y formulaciones farmacéuticas. Debido a que la mezcla de polímeros y tensoactivos en agua muestra comportamientos muy distintos a los de sus componentes individuales, por lo que es de gran interés investigar sus propiedades fisicoquímicas y los fenómenos de agregación.

Las investigaciones sobre los fenómenos de auto agregación han podido clasificar a las interacciones polímero-tensoactivo de acuerdo a la carga del polímero y del tensoactivo o de acuerdo con la región de concentración. Muchos estudios se centran en la interacción polímero-tensoactivo (P-T) a bajas concentraciones de polímero. Mientras que otros se centran en el equilibrio de fases, que son estudiados a altas concentraciones. Como resultado de estas investigaciones se ha podido introducir nuevos conceptos como: la concentración de saturación (C_s), la concentración de agregación crítica (CAC), la concentración de agregación crítica extendida (CACe) que se aplican a sistemas polímero-tensoactivo (P-T). Además se han construido modelos del complejo P-T, que dependen de la estructura de las moléculas individuales, en particular de la hidrofobicidad, el peso molecular y la carga del tensoactivo. Estos nuevos complejos formados en la mezcla, cambian las propiedades de la solución como pueden ser: la viscosidad, la solubilidad y el hinchamiento de los polímeros. El cambio en las propiedades fisicoquímicas de la mezcla es lo que permite sus amplias aplicaciones industriales.

En la industria farmacéutica, se busca la administración de medicamentos de tal forma que el fármaco alcance su lugar de acción a una determinada concentración, dentro del intervalo de dosis terapéuticas efectivas. La administración de medicamentos está limitada por la resistencia del fármaco para penetrar en las células o tejidos en tratamiento, su distribución en el organismo ya que no sólo se dirigen al sitio de acción, sino también al resto de células y tejidos. Como consecuencia, para obtener una concentración suficiente a nivel de las células blanco, es necesario administrar dosis relativamente elevadas, que conducen a efectos tóxicos. Para evitar este tipo de problemas se han utilizados diferentes estructuras que sirvan como sistemas de transporte y liberación para fármacos, dentro de los cuales se han probado los sistemas Polímero-Tensoactivo.

Los nuevos sistemas de transporte y liberación de fármacos presentan muchas ventajas como: protección de la sustancia activa contra la inactivación; mejora del transporte de principios activos

hasta lugares difíciles de alcanzar; aumento de la especificidad de acción y eficiencia a nivel celular y/o molecular; incremento de la vida media del fármaco en circulación; alteración de las características de solubilidad de la sustancia activa y reducción de su inmunogenicidad y antigenicidad; disminución de la toxicidad para ciertos órganos por modificación de la distribución tisular del principio activo, biodegradabilidad y preparación industrial a gran escala. En el presente trabajo se probó un copolímero tribloque y la hidroxietil celulosa, que son poco tóxicos, altamente disponibles y económicos, para formar una mezcla que ayude al transporte de fármacos.

1. MARCO TEORICO

1.1.SISTEMAS POLÍMERO-TENSOACTIVO

1.1.1. Generalidades

Actualmente existe una gran variedad de polímeros disponibles comercialmente. Esta variedad en la composición hace que sus propiedades fisicoquímicas varíen. La solubilidad del polímero está determinada por el balance entre las interacciones de los segmentos hidrofílicos y los segmentos hidrofóbicos con ellos mismos y con el disolvente. De igual manera la solubilización de los tensoactivos es gobernada por un sutil balance entre las interacciones hidrofóbicas y las hidrofílicas. Como resultado de este balance, las soluciones acuosas de mezclas polímero-tensoactivo muestran una gran variedad y sus propiedades son muy distintas, debido a las variaciones en las estructuras moleculares disponibles. Así, la investigación en el área de interacción de polímeros-tensoactivos y fenómenos de agregación ha aumentado rápidamente. Ampliando su potencial de aplicación en formulaciones farmacéuticas, productos de cuidado personal, detergentes industriales y de uso doméstico, pinturas y recubrimientos, etc. [1, 2] [3, 4].

Dentro de las investigaciones realizadas en sistemas mixtos polímero-tensoactivo, están los estudiados con tensoactivos no iónicos. Los cuales han presentado cambios considerables en las propiedades del sistema manteniendo la concentración micelar crítica, CMC, constante [5]. Por otro lado, en sistemas que contienen polímeros polielectrolitos y los tensoactivos con carga opuesta, la interacción es más evidente observándose que la CMC disminuya en dos o tres órdenes de magnitud. Debido a la fuerte interacción que predomina por la atracción electrostática entre las partes cargadas del polímero y las cabezas de los tensoactivos, fomentando la agregación [6]. Los tensoactivos aniónicos muestran una fuerte y cooperativa interacción con polímeros hidrofílicos como el poli(óxido de etileno) (PEO) y la polivinilpirrolidona (PVP), mientras que los tensoactivos catiónicos no muestran interacciones relevantes. Con estos resultados se entiende la necesidad de conocer mejor la estructura de los agregados formados y el papel de las interacciones.

Las investigaciones realizadas por Jones que estudió el sistema polivinilpirrolidona (PVP)-dodecilsulfoato de sodio (SDS), por diferentes técnicas permitiendo la introducción de nuevos términos para explicar la interacción entre el polímero y el tensoactivo [7]. Él define la concentración de agregación crítica (CAC o T1, concentración de inicio de la interacción entre el polímero y el tensoactivo) observada con mediciones de tensión superficial, y el punto de saturación (T2, concentración a la cual el polímero se encuentra saturado de tensoactivo), que se encontró incrementando la concentración del polímero y por último la concentración de agregación extendida

(CACe o T3, concentración en la que las micelas se forman fuera del polímero) (Figura 1.1). Jones postuló una micela polímero-núcleo, en el cuál las colas de tensoactivo están en paralelo a la cadena del polímero.

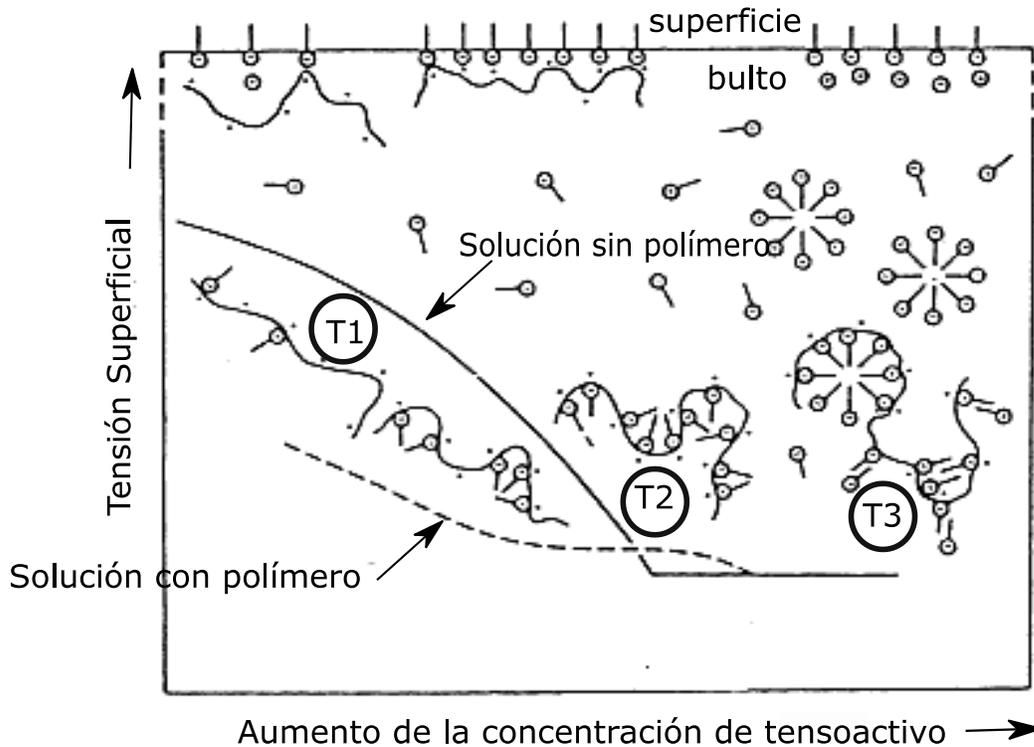


Figura 1.1. Representación del perfil de tensión superficial con el aumento de concentración para un tensoactivo aniónico en solución acuosa con/sin polímero catiónico. También se representa esquemáticamente la interacción entre el polímero y el tensoactivo con el aumento de concentración de tensoactivo. Marcando tres etapas: T1 el inicio de la interacción entre el tensoactivo y el polímero; T2 la saturación del polímero con moléculas de tensoactivo y T3 la formación de micelas de tensoactivo fuera del polímero. Adaptado de Ref. [1, 6].

Otras contribuciones fueron realizadas por Lewis y Robinson que observaron la concentración crítica de unión del SDS con varios polímeros, encontrando consistencia con el mecanismo de unión hidrofóbico similar a la formación de micelas [8]. Observaron también que el tensoactivo rompe la agregación entre polímeros permitiendo la interacción del tensoactivo con la superficie del polímero. Ellos consideraron al complejo saturado como una micela mixta.

Otro ejemplo es la mezcla entre el polímero HEUR (polímero hidrofóbico etoxilado de uretano, producto de la reacción del PEG y el disocianato) con tensoactivos como SDS y NP10. Mediante las

mediciones de tensión superficial se logró encontrar las concentraciones de asociación crítica (T1 y T2) en el primer caso, y T2 en el último caso. Además que las características de viscosidad aumentaron cuando el tensoactivo fue añadido a la solución de HEUR lo que indica una clara asociación en la solución. Pero al aumentar la concentración de polímero, la adición de tensoactivo no mejora la reología del sistema.

Otras contribuciones importantes han sido las de Shinoda y colaboradores, que notaron la cooperatividad en la unión polímero-tensoactivo [9]. Mediante estudios de tensión superficial, diálisis y solubilización de colorante determinaron CMC y CAC para el alquil sulfonato de sodio en ausencia y presencia de PVP. Encontraron la relación estequiométrica del tensoactivo unido al polímero saturado; también concluyeron que en etapas iniciales de la adsorción, moléculas de tensoactivo unido están en contacto una con otra en lugar de distribuirse uniformemente a lo largo de la cadena de PVP.

También se ha estudiado la dependencia del pH en la interacción de tensoactivos catiónicos y aniónicos con poli(óxido de etileno), PEO y poli(propilenglicol) PPO, la cual exhibe una unión débil, que disminuye al aumentar el pH, sugiriendo que la cabeza del tensoactivo interactúa con los oxígenos de éter del polímero [10].

Con las investigaciones realizadas se ha construido un modelo que explica el fenómeno de agregación entre el polímero y el tensoactivo llamado “modelo del collar”; en el que pequeñas micelas de tensoactivo se unen a la cadena desordenada del polímero. Existen excepciones en el modelo, en particular para tensoactivos que forman micelas rodillo o vesículas, y para polímeros con modificaciones hidrofóbicas; pero el modelo es aceptado como la estructura típica del complejo polímero-tensoactivo [1, 11].

1.1.2. Aplicaciones de los Sistemas Polímero-Tensoactivo

Como se mencionó anteriormente las investigaciones de los sistemas P-T siguen aumentando, debido a que algunas de las propiedades de estos sistemas cambian notablemente al utilizarse en mezcla, teniendo mejor resultados. Además que la variedad de estructuras disponibles, tanto de polímeros como de tensoactivos amplía sus aplicaciones, algunas de las propiedades son:

1.1.2.1 Mejoramiento de la viscosidad

Sistemas como dodecilsulfato de sodio (SDS)- poli(óxido de etileno) (PEO) y dodecilsulfato de sodio (SDS)-polivinilpirrolidona (PVP)- han presentado incremento en la viscosidad (hasta cinco veces) a ciertas concentraciones (T1 o CAC) de tensoactivo, independientemente del peso molecular del polímero, con un efecto viscoelástico. En el caso de la adición de un tensoactivo catiónico a un polímero no iónico, el aumento de la viscosidad es menos común debido a su débil interacción. Si la hidrofobicidad del polímero es relativamente alta, las interacciones pueden mejorar y modificar sus propiedades reológicas. Por ejemplo, polímeros tales como etilhidroxietilcelulosa (EHEC) muestran una baja temperatura de solubilidad (LCST) y se presenta una separación de fases a altas temperaturas, indicando su alta hidrofobicidad [12]. Cuando EHEC fue mezclado con bromuro de hexadecil trimetil amonio (CTAB) [13], se observó un incremento en la viscosidad y la formación de gel. Mostrando que

a cierta concentración y temperatura se manifiesta, el incremento de hidrofobicidad del polímero conduciendo a un incremento en la interacción con el tensoactivo catiónico. La gelación puede ser debida a la formación de una red y entrecruzamiento provocado por las micelas del tensoactivo[14].

1.1.2.2. Solubilización

Las soluciones de tensoactivos tiene la habilidad de disolver una variedad de materiales insolubles en agua, por ejemplo, hidrocarburos, éteres, perfumes, colorantes entre otros. Esta propiedad es utilizada en muchas formulaciones, el proceso involucra la solubilización del compuesto por medio de las micelas. La formación de complejos P-T es atractivo por la disminución en la CAC del tensoactivo. De acuerdo con esto, la solubilización de los compuestos puede ser mejorada con los sistemas P-T que la proporcionada por los sistemas de tensoactivos puros. Además se ha observado una mejora en la solubilización de colorantes [15] e hidrocarburos [16] con sistemas de polímeros sin carga y tensoactivos con carga. Una importante ventaja de este tipo de sistemas es que la solubilización se da a concentraciones extremadamente bajas.

En algunos casos, los polímeros son considerados normalmente insolubles y pueden ser solubilizados en una solución de tensoactivo. Con este tipo de solubilización es posible obtener al polímero original en diferentes estados como fibras o películas [1].

1.1.2.3 Elevación del Punto de Enturbiamiento

Muchos polímeros solubles tiene una relación inversa solubilidad/temperatura, y las soluciones presentan un punto de enturbiamiento, algunos ejemplos son los polímeros de óxido de polialquileno y con grupos amino, o múltiples grupos éter/hidróxido como los que se encuentran en polímeros solubles en agua basados en celulosa [12]. El fenómeno se explica mediante la deshidratación de los grupos polares éter, amino, hidróxilo, etc; que puede ser compensada por la adición de tensoactivos iónicos resultando en el aumento en el punto de enturbiamiento. Esto es claro en el caso de interacciones polímero con tensoactivo no iónico, por la formación de complejos de mayor solubilidad intrínseca. La prevención de enturbiamiento en las formulaciones puede ser importante para mantener la viscosidad y la estabilidad de la materia en suspensión.

En el caso ideal, el punto de enturbiamiento del polímero no es afectado por la adición de tensoactivo hasta una cierta concentración crítica alcanzada, además hay un incremento lineal del punto de enturbiamiento con el incremento de la concentración de tensoactivo. Mientras muchos sistemas P-T siguen este comportamiento, existen sistemas en los que disminuye el punto de enturbiamiento al aumentar la concentración de tensoactivo. Este comportamiento se ha encontrado en polímeros derivados de la celulosa (hidroxietilcelulosa) [17] y se puede decir que la respuesta del punto de enturbiamiento del polímero al añadirle un tensoactivo es influenciada por (i) la estructura del polímero, (ii) su peso molecular, (iii) la tendencia a la autoagregación, (iv) la presencia de una sal, (v) el tipo de sal y (vi) la naturaleza del tensoactivo añadido, incluyendo la carga.

1.1.3. Materiales Poliméricos

Debido a las características que presentan los sistema polímero-tensoactivo (P-T) y su amplia utilidad en la industria, en este trabajo se estudia la mezcla copolímero tribloque poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno), PPO₂₀-PEO₇₀-PPO₂₀, P123., con hidroxietil celulosa (HEC) . El P123 tiene una alta actividad superficial disminuyendo la tensión superficial del agua a 32.6 mNm⁻¹; mientras que la hidroxietil celulosa disminuye la actividad superficial del agua sólo a 60.4 mNm⁻¹. Por lo que en este trabajo, basados en la actividad superficial que tiene los dos materiales. Se considera al P123 como el tensioactivo y HEC como el polímero. Además que el peso molecular de P123 es menor que el de HEC.

1.1.3.1. Copolímeros Anfífilicos Tribloque

Los copolímeros tribloque de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno), PEO-PPO-PEO; también llamados plurónicos o poloxámeros (Figura 1.2). Son ejemplos de tensioactivos no iónicos que forman micelas poliméricas en agua con centro hidrofóbico (con los grupos PPO) protegido de los alrededores acuosos por una capa de PEO hidratada [18, 19]. Dentro de sus procesos de agregación, a un concentración fija con el aumento de temperatura experimenta una transición caracterizada por la temperatura de agregación crítica (CMT) y está dirigida principalmente por la entropía [20, 21]. El proceso se puede seguir por medio de calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en Inglés differential scanning calorimetry). En este tipo de experimentos al aumentar la temperatura, los grupos PPO y PEO exhiben un incremento en la hidrofobicidad, la cual es más probable debido al cambio conformacional de los segmentos; obteniendo una señal calorimetría correspondiente a la entalpía, ΔH. La principal característica de estos sistemas incluye su capacidad para solubilizar compuestos hidrofóbicos y su liberación en forma controlada. Estas características han hecho a las micelas poliméricas vehículos muy prometedores de liberación de fármacos [22-24]. Sin embargo, cuando las micelas poliméricas entran al cuerpo por las diferentes vías como son parenteral u oral, se exponen al medio fisiológico haciendo que la concentración de tensioactivo polimérico disminuya por debajo de su CAC y el equilibrio tienda a la disgregación de la micela.

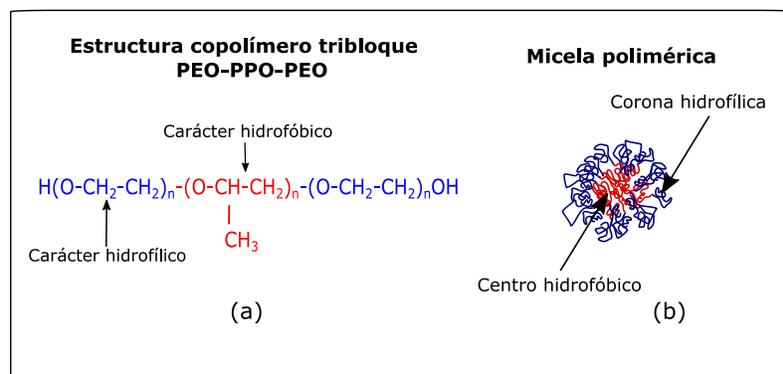


Figura 1.2. (a) Estructura de los copolímeros tribloque poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno). (b) Estructura de la micela polimérica.

1.1.3.2. Polímeros Modificados Hidrofóbicamente

Los polímeros modificados hidrofóbicamente constituyen un grupo versátil de materiales que combinan las propiedades de polímeros y tensoactivos. Son utilizados por sus propiedades de espesamiento, gelificación, formación de espuma, la emulsificación, etc.; que pueden cambiar por la adición de tensoactivos. La combinación de polímeros y tensoactivo aumenta su funcionalidad. Algunos de los polímeros son sintetizados con grupos funcionales que le permiten permanecer en la interfaz, estas estructuras proporcionan una mayor estabilidad a las emulsiones en comparación con los emulsionantes convencionales (tensoactivos).

1.1.3.2.1. Hidroxietil celulosa

La hidroxietil celulosa (HEC) es un polímero anfifílico derivado de la celulosa no iónico, clasificado como polímero modificado, que presentan una temperatura baja de solubilidad crítica (Figura 1.3). Las soluciones con este material pueden separarse en dos fases al aumentar la temperatura, lo que nos indica su alta hidrofobicidad, las soluciones se vuelven turbias. Se caracteriza por que su estructura es una mezcla de unidades hidrofóbicas e hidrofílicas distribuidas a lo largo del esqueleto polimérico (Figura 1.4)[25]. Este arreglo nos lleva a un complejo estructural con una distribución irregular de dominios hidrofóbicos, e interacciones entre cadenas de polímero. Este polímero ha sido estudiado en combinación con tensoactivos iónicos como dodecilsulfato de sodio [13], dodecanato de sodio [26] y bromuro de cetiltrimetil amonio [27]; así como tensoactivos no iónicos como los polietoxilados [28], tritones [29] y poloxameros. En estas mezclas, se ha sugerido que las cadenas alquílicas de las moléculas de tensoactivo interactúan con los dominios hidrofóbicos del polímero, aumentando la asociación intermolecular por medio de un mecanismo “bridging-type”[28], Figura 1.5, con interacciones tensoactivo no iónico-polímero son débiles [30] formando agregados mixtos que pueden involucrar sustituyentes de más de una cadena de polímero.

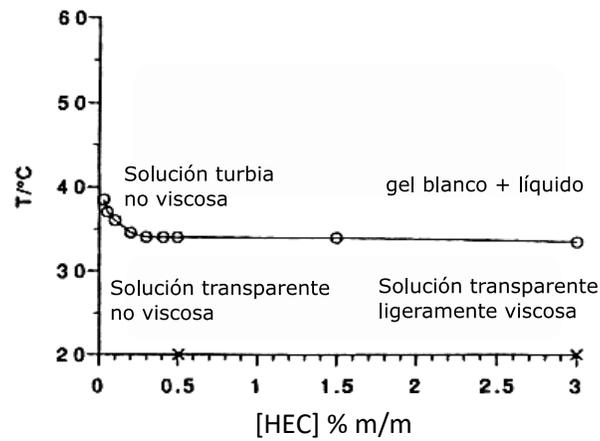


Figura 1.3. Diagrama de fases para la hidroxietil celulosa hidrofóbica en agua. Adaptado de la de REF [1].

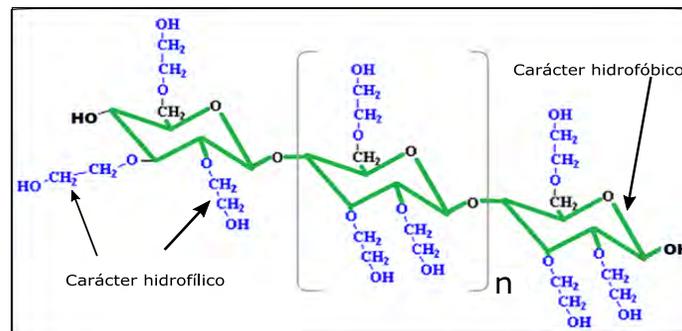


Figura 1.4. Estructura de la hidroxietil celulosa.

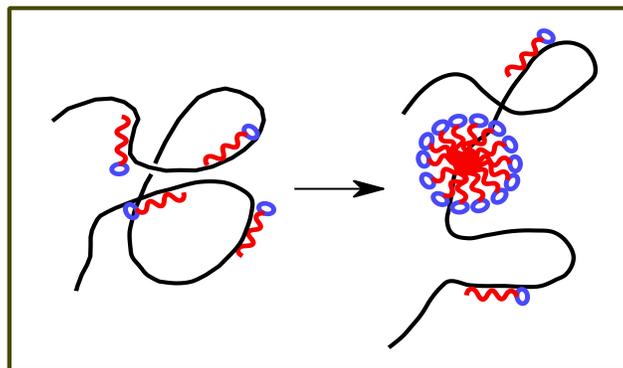


Figura 1.5. Representación de la interacción entre polímero y tensoactivo. El tensoactivo se alinea a la cadena de polímero, después comienza la agregación del tensoactivo.

1.1.4. Comportamiento de las Fases en los Sistemas Polímero-Tensoactivo

La tendencia a la separación de fases es generalmente más fuerte en mezclas que involucran especies poliméricas que en mezclas de moléculas pequeñas debido a la entropía de mezclado, que es termodinámicamente mucho más débil para moléculas grandes. Lo mismo se presenta en agregados de moléculas de tensoactivos. Por lo tanto el fenómeno de separación de fases es frecuente en soluciones polímero-tensoactivo.

En ocasiones la razón de adicionar otro compuesto es para alterar el comportamiento de la fase. Añadir un tensoactivo puede mejorar la solubilidad de los polímeros en algunos casos, mientras que en otros podría formar una fase mixta concentrada, en equilibrio con agua. Otra posibilidad es la formación de dos fases líquidas de similar contenido de solvente, cada una enriquecida con uno de los componentes coloidales, siendo útiles en aplicaciones de separación.

Tomando el caso simple de una mezcla ternaria: agua, tensoactivo y polímero; y la separación de fases donde se forman dos fases, se pueden distinguir dos clases de mezcla bifásica, en base a la distribución de los dos solutos macromoleculares. Este tipo de sistema puede segregarse en diferentes fases de similar concentración, o asociarse en una fase concentrada en equilibrio con una muy diluida. Introduciendo el término de segregativa para el primer caso y asociativa para el segundo.

En el caso particular de polímeros solubles en agua, que no presentan interacciones de corto alcance entre el polímero y el tensoactivo, las moléculas de polímero y los agregados de tensoactivo están siempre separados por al menos una capa de hidratación, presentando en la mayoría de los casos segregación.

Se han reportado experimentos de copolímeros (PPO-PEO) y con etil hidroxiétil celulosa (EHEC) de diferentes pesos moleculares. Para ambos polímeros se observa la separación de fases con mezclas de tensoactivos no iónicos. La extensa región de separación de fases incrementa con el decremento de la polaridad de los tensoactivos no iónicos o del polímero, y muy apreciablemente con el incremento de la temperatura. La etil(hidroxi)etilcelulosa EHEC con una temperatura baja de solubilidad crítica muestra una separación de fases con tensoactivos no iónicos en la cual el tensoactivo no iónico C12E8 no forma micelas mixtas. La temperatura de solubilidad crítica del EHEC no es afectado por la presencia del tensoactivo hasta altas concentraciones, donde la separación de fases ocurre [30].

En contraste, al agregar tensoactivo C12E8 a una solución acuosa de celulosa modificada hidrofóbicamente (HM-EHEC) se observa un descenso inicial en la una temperatura de solubilidad crítica por la adición de pequeñas cantidades de tensoactivo que fue interpretado en términos de una atracción hidrofóbica adicional entre la micela mixta HM-EHEC-tensoactivo, conferido por las moléculas de tensoactivo. Eventualmente este efecto fue superado por la solubilización del tensoactivo a altas concentraciones, gradualmente disolviendo la micela mixta reticulada entre las cadenas de polímero, haciendo al complejo más y más soluble. A altas concentraciones de tensoactivo, solo un área se presenta a altas temperaturas para HM-EHEC (el cual forma el complejo P-S) que para el EHEC (donde no se forma el complejo P-S).

1.1.5. Complejo Polímero-Tensoactivo.

Una característica de los sistemas polímero-tensoactivo es su agregación en soluciones diluidas. Para visualizar mejor la manera de unión de los complejos existen dos perspectivas: la primera basada en el polímero y la segunda basada en el tensoactivo.

La primera perspectiva, supone que la molécula de polímero contiene ciertos sitios que pueden unir a las moléculas de tensoactivo. Así la interacción entre el polímero y el tensoactivo constituye una fuerte perturbación para el bulto en la solución de tensoactivo, la cual considera al polímero como un reservorio de ligandos de unión. El problema con esta perspectiva centrada en el polímero es que ignora en alguna medida el hecho de que las moléculas de tensoactivo son fuertemente hidrofóbicas, básicamente desean unirse o formar agregados. El hecho es que se asume que la asociación hidrofóbica es esencial en la agregación que involucra moléculas de tensoactivos en un medio acuoso.

La segunda perspectiva, propone que las moléculas de tensoactivo tienen una fuerte tendencia por la autoasociación. De acuerdo con la complejación P-T, es esencial la micelización del tensoactivo, aunque es perturbada por la presencia del polímero. En este modelo se explica la cooperatividad de unión de las moléculas de tensoactivo a ciertos polímeros. La CAC puede entonces ser considerada como la CMC del tensoactivo en la solución de polímero. Una característica inherente de la perspectiva centrada en el tensoactivo es que la unión del polímero al tensoactivo puede formar agregados infinitos aún en los límites de saturación de unión de una molécula de polímero.

En el modelo del collar, Figura 1.5, los agregados de tensoactivo son pequeños frijoles esparcidos sobre la cadena desordenada y desenredada del polímero; se cree que la cadena de polímero se enrolla alrededor de un agregado de tensoactivo que es a menudo más pequeño que una micela libre. Las cadenas de tensoactivo largas pueden unir varias micelas distribuidas dentro del polímero y separados por tramos de polímero libre. Se considera que el polímero está interaccionando con la superficie micelar, y puede cubrir las partes hidrofóbicas de la micela del ambiente hidrofílico.

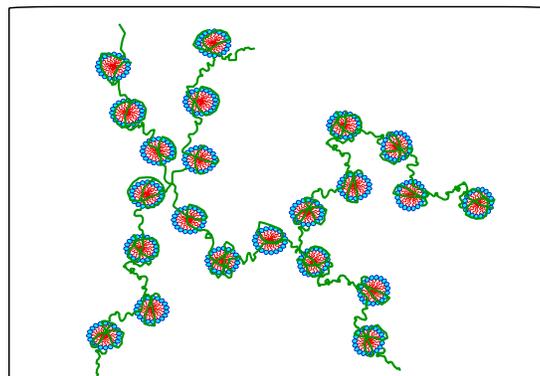


Figura 1.5. Modelo de collar que describe la agregación entre tensoactivo y polímero.

1.2. TENSIÓN SUPERFICIAL

1.2.1. Definición de la Tensión Superficial desde el Punto de Vista Termodinámico

La primera ley de la termodinámica establece que al suministrar calor, q , el sistema realiza trabajo, W . La diferencia entre ambas propiedades es el incremento de la energía interna del sistema, dU .

$$dU = \delta q + \delta w \quad (1.1)$$

U es una función de estado; q y W son funciones de trayectoria. La convención de signos es $q > 0$, el calor es suministrado al sistema; y si $w < 0$, si el trabajo es hecho por el sistema. Como consecuencia, para una reacción exotérmica, el calor es negativo.

Para un proceso reversible, si solamente hay trabajo de expansión, la ecuación (1.1) se expresa como

$$dU = TdS - PdV \quad (1.2)$$

Donde T es la temperatura absoluta, S es la entropía, P es la presión y V es el volumen del sistema. Si también se presenta trabajo superficial, por ejemplo por la expansión de la superficie, este término debe ser incluido en la ecuación (1.2)

$$dU = TdS - PdV + \sigma da \quad (1.3)$$

donde a es el área de la superficie y σ es la tensión superficial. El trabajo debido a la expansión de la superficie es $+\sigma da$. Que se explica de la siguiente manera: si consideramos un cilindro que contiene gas con volumen V_0 bajo una presión P_0 y una gota con radio r , volumen V_1 , y una presión interna P_1 (Figura 1.6), y el pistón se mueve hacia arriba, el cambio del volumen es

$$dV = dV_0 + dV_1 \quad (1.4)$$

El trabajo hecho por la expansión es

$$\delta w = -P_0 dV = -P_0 dV_0 - P_0 dV_1 \quad (1.5)$$

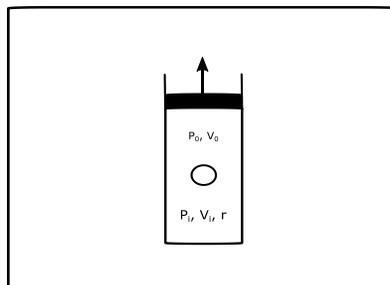


Figura 1.6. Sistema de dos fases expandiéndose.

Ya que la gota es esférica, conocemos su volumen como

$$V_1 = \frac{4\pi r^3}{3} \rightarrow dV_1 = 4\pi r^2 dr \quad (1.6)$$

y para el área

$$a = 4\pi r^2 \rightarrow da = 8\pi r dr \quad (1.7)$$

Obtenemos

$$dV_1 = \frac{r}{2} da \quad (1.8)$$

Considerando la ley de Laplace

$$P_0 = P_1 - \frac{2\sigma}{r} \quad (1.9)$$

Sustituimos la ecuación (1.8) y (1.9) en la ecuación (1.5) y resulta:

$$\delta w = -P_0 dV_0 - P_1 dV_1 + \sigma da \quad (1.10)$$

Los términos de $P_0 dV_0$ y $P_1 dV_1$ son para el trabajo de expansión-compresión. Por otra parte es claro que el término $+\sigma da$ es un trabajo debido al cambio de área, y así la ecuación (1.7) es obtenida. Usando esta ecuación podemos obtener otras funciones de estado: el cambio de entalpía H , la energía libre de Helmholtz A , energía libre de Gibbs G [4].

$$\begin{aligned} dU &= TdS - PdV + \sigma da \\ dH &= TdS + VdP + \sigma da \\ dA &= -SdT - PdV + \sigma da \\ dG &= -SdT + VdP + \sigma da \end{aligned} \quad (1.11)$$

Estas funciones de estado sólo se pueden aplicar a un sistema cerrado. Para sistemas abiertos el término de trabajo es $\sum \mu_i dn_i$, debido al intercambio de material que debe ser adicionado a las ecuaciones (1.11). Aquí μ_i es el potencial químico y n_i es el número de moles del componente i . De la ecuación (1.11) obtenemos

$$\sigma = \left(\frac{\partial U}{\partial a} \right)_{S,V} = \left(\frac{\partial H}{\partial a} \right)_{S,P} = \left(\frac{\partial A}{\partial a} \right)_{T,V} = \left(\frac{\partial G}{\partial a} \right)_{T,P} \quad (1.12)$$

De estas relaciones podemos definir a la tensión superficial como el incremento de energía interna, si expandimos la superficie manteniendo la entropía y el volumen constantes, así sucesivamente. Por lo tanto σ tiene unidades de energía por unidad de área.

1.2.2. Termodinámica de Superficie al Equilibrio

Para sistemas abiertos el cambio de materia con los alrededores es permitido por lo que escribimos la ecuación (1.7) como, así como para las otras funciones de estado

$$\begin{aligned}
 dU &= TdS - PdV + \sigma da + \sum \mu_i dn_i \\
 dH &= TdS + VdP + \sigma da + \sum \mu_i dn_i \\
 dA &= -SdT - PdV + \sigma da + \sum \mu_i dn_i \\
 dG &= -SdT + VdP + \sigma da + \sum \mu_i dn_i
 \end{aligned}
 \tag{1.13}$$

Donde n_i es el número de moles y μ_i es el potencial químico de la especie i . Con las ecuaciones (1.13) se obtienen las propiedades termodinámicas del sistema.

1.2.3. Ecuación de Gibbs

Considerando un sistema formado por dos fases inmiscibles, fase α y fase β , la energía interna total del sistema está dada por la ecuación (1.13). La energía interna para cada fase separadamente es

$$\begin{aligned}
 dU^\alpha &= TdS^\alpha - PdV^\alpha + \sum \mu_i dn_i^\alpha \\
 dU^\beta &= TdS^\beta - PdV^\beta + \sum \mu_i dn_i^\beta
 \end{aligned}
 \tag{1.14}$$

donde los superíndices α y β se refieren a las fases α y β respectivamente. Asumiendo una superficie plana entre las fases α y β , las condiciones de equilibrio requeridas son: que la presión, la temperatura y los potenciales químicos sean idénticos en todo el sistema

La energía interna de la superficie dU^S es

$$dU^S = dU - dU^\alpha - dU^\beta
 \tag{1.15}$$

Y con las ecuaciones (1.13) y (1.14), la ecuación (1.15) se convierte en

$$dU^S = TdS^S + \sigma da + \sum \mu_i dn_i^S
 \tag{1.16}$$

donde la entropía de la superficie se define como

$$dS^S = dS - dS^\alpha - dS^\beta \quad (1.17)$$

y el número de moles de la especie i en la superficie, está dado por

$$dn_i^S = dn_i - dn_i^\alpha - dn_i^\beta \quad (1.18)$$

Considerando que la superficie es en realidad una región de transición entre las fases α y β , se define la superficie como un plano matemático entre estas fases, con la suposición que no tiene grosor, ni volumen. Consecuentemente $V = V^\alpha + V^\beta$ y el término de presión en la expresión de la energía interna se cancela.

Si U_i^S y S_i^S son la energía interna y la entropía por mol de las especies i en la superficie respectivamente, entonces

$$U^S = \sum U_i^S n_i^S \rightarrow dU^S = \sum U_i^S dn_i^S \quad (1.19 \text{ a})$$

$$S^S = \sum S_i^S n_i^S \rightarrow dS^S = \sum S_i^S dn_i^S \quad \dots\dots\dots(1.19 \text{ b})$$

Si el área por mol de la especie i es a_i , el total del área superficial es

$$a = \sum a_i n_i^S \rightarrow da = \sum a_i dn_i^S \quad (1.20)$$

Esta ecuación es equivalente a $V = \sum n_i v_i$ donde V es el volumen total y v_i es el volumen molar de la especie i . Considerando una tabla con área a , que podemos cubrir con monedas de diferentes tamaños, cada especie de moneda i tiene un área a_i . Podemos cubrir esta tabla con monedas de diferentes maneras, la ecuación (1.20) siempre mantiene a_i constante para cada i . De esta manera la ecuación se convierte en

$$\sum u_i^S dn_i^S = T \sum s_i^S dn_i^S + \sigma \sum a_i dn_i^S + \sum \mu_i dn_i^S \quad (1.21)$$

Integrando la ecuación (1.21) con la restricción de que la composición de la superficie permanece constante, obtenemos

$$\sum u_i^S n_i^S = T \sum s_i^S n_i^S + \sigma \sum a_i \quad (1.22)$$

Y considerando las ecuaciones (1.19) y (1.20)

$$U^S = TS^S + \sigma a + \sum \mu_i n_i^S \quad (1.23)$$

La diferencia entre estas ecuaciones

$$dU^S = TdS^S + S^S dT + \sigma da + ad\sigma + \sum \mu_i dn_i^S + \sum n_i^S d\mu_i \quad (1.24)$$

Y con la ecuación (1.15) resulta que

$$0 = S^S dT + ad\sigma + \sum n_i^S d\mu_i \quad (1.25)$$

Así a temperatura constante, obtenemos la ecuación de adsorción de Gibbs

$$-d\sigma = \sum \Gamma_i d\mu_i \quad (1.26)$$

Donde $\Gamma_i = \frac{n_i^S}{a}$ es el número de moles de la especie i adsorbidas por unidad- de área superficie de la superficie, es decir es la adsorción de las especies i .

En el equilibrio, los potenciales químicos en la superficie y el bulto son idénticos, para sistemas ideales, podemos escribir

$$\mu_i = \mu_i^0(P, T) + RT \ln x_i \quad (1.27)$$

$\mu_i^0(P, T)$ es el potencial químico estándar de la especie i el cual depende de la temperatura y presión, y x_i , es la fracción mol de esta especie en el bulto. De esta manera la ecuación de Gibbs se convierte en

$$-d\sigma = RT \sum \Gamma_i d \ln x_i \quad (1.28)$$

Si aplicamos la ecuación (1.28) a una sistema que contiene un tensoactivo (1) y agua (0), entonces

$$-d\sigma = RT \left(\Gamma_0 \frac{dx_0}{x_0} + \Gamma_1 \frac{dx_1}{x_1} \right) \quad (1.29)$$

Ya que la suma de las fracciones es $x_0 + x_1 = 1$, en donde $dx_0 + dx_1 = 0$ de la ecuación (1.29)

$$-d\sigma = RT dx_1 \left(\frac{\Gamma_1}{x_1} - \frac{\Gamma_0}{x_0} \right) \quad (1.30)$$

De manera más general se puede utilizar la expresión (1.31) que es la isoterma de adsorción

$$\Gamma = - \frac{1}{RT} \frac{d\sigma}{d \ln x} \quad (1.31)$$

Que se puede expresar en función de la presión superficial

$$d\pi = -d\sigma$$

$$\Gamma = \frac{1}{RT} \frac{d\pi}{d \ln x} \quad (1.32)$$

En función de la derivada de π con respecto de x la expresión es

$$\Gamma = \frac{x}{RT} \left(\frac{d\pi}{dx} \right)_T \quad (1.33)$$

La ecuación (1.33) predice que al aumentar la concentración de tensoactivo aumenta la presión superficial, π , conforme aumenta la cantidad de tensoactivo en la superficie (en regiones diluidas); y la concentración de superficie Γ depende solamente de la derivada [31]. En la Figura 1.7 se observa el comportamiento anteriormente descrito, siendo la derivada $\frac{dx}{\ln x}$ máxima cuando se acerca a la región

de saturación en la superficie (señalada con un círculo en la Figura 1.7) y se comporta linealmente. Una vez que se llega a la saturación observamos una región asintótica que inicia cuando se alcanza la concentración micelar crítica en la que el tensoactivo ha saturado la superficie. En las vecindades entre la máxima derivada y la región asintótica las propiedades del sistema son:

$$x = x_{CMC}$$

$$\pi = \pi_s$$

$$\Gamma = \Gamma_s$$

Y la ecuación (1.33) se puede escribir

$$\Gamma_s RT = \left(\frac{d\pi}{d \ln x} \right)_{x \rightarrow x_{CMC}} \quad (1.34)$$

La ecuación (1.34) está representada por la recta tangente en la Figura 1.7, si integramos la ecuación obtenemos

$$\pi_{CMC} - \pi = \Gamma_s RT (\ln x_{CMC} - \ln x)$$

$$\pi = (\pi_{CMC} - \Gamma_s RT \ln x_{CMC}) + \Gamma_s RT \ln x \quad (1.35)$$

Cuya pendiente corresponde a $\Gamma_s RT$ y la ordenada al origen corresponde a $\pi_s - \Gamma_s RT \ln x_{CMC}$.

Podemos calcular la presión de saturación π_s con el promedio de los valores máximos de presión superficial [31].

A concentraciones mayores de tensoactivo las propiedades de superficie permanecen constantes.

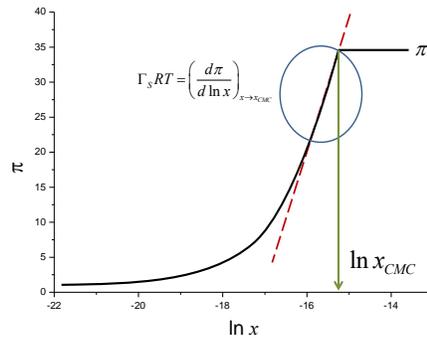


Figura 1.7. Representación de la ecuación de Gibbs. Adaptado de la Ref. [31].

1.2.4. Proceso de Difusión

Si consideramos una superficie de un tensoactivo en equilibrio con el bulto de la solución. Si la superficie es deformada, comprimida o expandida; el equilibrio entre la superficie y el bulto es perturbado y el sistema tratará de regresar al equilibrio cambiando el material activo superficialmente entre la superficie y el bulto. Es claro que la difusión es un proceso importante de relajación. Considerando un proceso simple de difusión entre dos compartimientos en contacto, uno contiene una solución de azúcar y el otro compartimiento agua; el proceso de difusión se lleva a cabo.

Podemos introducir un nuevo concepto, la subsuperficie. Entonces, la superficie es un plano matemático con el grosor igual a cero. Si viajamos a una distancia infinitesimal ε , del plano matemático, estamos en el bulto. El llamado substrato es la región adyacente a la superficie y junto al bulto. La concentración en esta capa es la concentración de la subsuperficie. Si tenemos una interfase aceite/agua se tendrán dos subsuperficies una en la fase agua y otra en la fase oleosa. Por tanto tenemos dos concentraciones de subsuperficie.

Los fenómenos termodinámicos y difusionales son descritos del comportamiento de la materia, sin considerar las moléculas. Ambos son teorías macroscópicas. Si consideramos la primera ley de Fick. Si la solución con concentración c está sujeta a un movimiento con una velocidad v , la cantidad de moles del soluto que viajan hacia la superficie a esta velocidad, por unidad de tiempo es el flujo, \dot{J}_c , que está dado por

$$J_c = cv \tag{1.36}$$

Si no se tiene convección ($v = 0$), de acuerdo a la ley de Fick, la difusión del flujo es:

$$J_d = -D\Delta c \quad (1.37)$$

Indicando que la difusión es un proceso dirigido desde lugares con altas concentraciones, como consecuencia termodinámica que nos dice que la entropía debe aumentar. En la ecuación (1.37), D es el coeficiente de difusión que asumimos es independiente de la concentración (D es constante a ciertas temperaturas). Durante el proceso de difusión, la fuerza F , que actúa sobre una molécula es el gradiente del potencial químico. En otras palabras en gradiente del potencial químico es la fuerza que dirige el proceso de difusión.

Ecuación de Ward y Tordai

La ecuación considera la superficie de las soluciones de tensoactivo en equilibrio con el bulto, la cual es repentinamente expandida o comprimida. La deformación de la superficie es una función por pasos. La condición es que la deformación de la superficie sea tan rápida para asegurar que ninguna molécula de tensoactivo se intercambie con el bulto durante la deformación. Si la expansión es muy rápida se obtiene un superficie limpia a $t = 0$. Cuyas condiciones iniciales son:

$$c = 0, \Gamma = \Gamma_0 \text{ en } t = 0$$

$$\Gamma = \Gamma_0 + 2\left(\frac{D}{\pi}\right)^{\frac{1}{2}} \left[c_0 \sqrt{t} - \int_0^{\sqrt{t}} c_s (t - \lambda) d\sqrt{\lambda} \right] \quad (1.38)$$

La ecuación (1.38) llamada de Ward and Tordai no es adecuada para describir los resultados experimentales ya que contiene dos términos no conocidos Γ , c_s y λ (función de deconvolución). Por lo que se hacen aproximaciones para tiempos largos y cortos de la ecuación de Ward y Tordai.

En esta tesis se trabajo con la aproximación a tiempos largos, a cual que se expresa en función de términos conocidos y medibles [32].

$$\sigma(t) = \sigma_{eq} + \frac{RT\Gamma_{eq}^2}{2C_0} \sqrt{\frac{\pi}{Dt}} \quad (1.39)$$

donde σ_{eq} es la tensión superficial al equilibrio (mN m^{-1}), Γ_{eq} es la concentración de superficie al equilibrio (mol m^{-2}), D representa el coeficiente de difusión ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$), C_0 es la concentración del copolímero en el bulto (mol m^{-3}), T es la temperatura (K), t es el tiempo (s) y R es la constante de los gases

1.3. CALORIMETRÍA

El término calorimetría se refiere a la medición del calor. La energía de un sistema puede ser cambiada por medio de trabajo o calor. Cuando la energía de un sistema cambia como resultado de la diferencia de temperatura entre el sistema y sus alrededores, se dice que la energía se ha transferido como calor. El calor sólo aparece en la frontera durante un cambio de estado y se manifiesta por un efecto producido en el entorno. El análisis de la energía involucrada en los procesos puede darnos información acerca del sistema y modificaciones, tales como reacciones químicas y procesos de interacciones moleculares

Se han creado instrumentos sumamente sensibles que han permitido la aplicación de técnicas que miden cambios de energía muy pequeños en función del tiempo. Éste es el caso de la microcalorimetría.

La mayoría de los microcalorímetros son instrumentos diferenciales con celdas gemelas; en una de ellas se tiene el material a medir y en la otra, el sistema de referencia. Cuando la señal diferencial es registrada, los efectos de las perturbaciones térmicas en los alrededores son cancelados [33]. En un calorímetro adiabático ideal no hay intercambio de calor entre las celdas del calorímetro y los alrededores. El calor asociado al proceso que se realiza dentro de la celda es directamente proporcional a la diferencia de temperatura observada entre los estados inicial y final, ΔT , como se muestra en la ecuación

$$q = E_a \Delta T \quad (1.40)$$

En donde q es el calor asociado al proceso, ΔT es la diferencia de temperatura entre el estado inicial y el final, E_a es la constante de calibración, que en el caso ideal es igual a la capacidad térmica del equipo. La potencia térmica, P , es proporcional al valor del incremento de temperatura de acuerdo a la ecuación

$$P = \frac{E_a \Delta T}{dt} \quad (1.41)$$

En estos calorímetros la celda de reacción está separada de los alrededores por medio del baño termostatzado. Si la temperatura de la celda calorimétrica y los alrededores se mantienen idénticas durante el experimento, no habrá intercambio de energía. En un proceso endotérmico, para mantener la temperatura constante, se libera energía eléctrica en la celda de reacción. En los procesos exotérmicos se puede instalar una barrera adiabática entre la celda y el baño termostato. La diferencia de temperatura entre la barrera y la celda del calorímetro se mantiene en cero durante la medición usando calentamiento eléctrico. En el caso de los calorímetros de conducción térmica, el calor liberado es transferido de una celda de reacción a los alrededores, y éste es el calor medido. Normalmente el flujo de calor se registra por la pared de la termopila que está entre las celdas del calorímetro y la fuente de

calor. La diferencia de temperatura sobre la termopila provoca un aumento en la señal de la potencia, que es proporcional al flujo de calor.

El flujo de calor $\frac{dq}{dt}$, es proporcional a la diferencia de temperatura del termopar, de acuerdo a la siguiente ecuación

$$\frac{q_i}{dt} = g_i \Delta T \quad (1.42)$$

Donde g_i es el coeficiente de conductividad térmica efectiva del termopar. Dado que la termopila está compuesta por n termopares, se puede expresar el flujo de calor total como se expresa en la ecuación

$$\frac{q_i}{dt} = g_i n \Delta T \quad (1.43)$$

De esta forma es posible obtener la energía relacionada con el proceso.

1.3.1. Calorimetría Diferencial de Barrido para Líquidos

La calorimetría diferencial de barrido, llamada DSC por sus siglas en inglés, es una técnica analítica más directa para estudiar sistemas moleculares, cuyas estructuras están estabilizadas por numerosas fuerzas débiles y, por consiguiente, susceptibles de experimentar transiciones conformacionales y/o cambios de fase al calentar o enfriar en un intervalo de temperatura experimentalmente entre -20 °C a 130 °C. Siendo una técnica adecuada para caracterizar termodinámicamente sistemas macromoleculares, biopolímeros y complejos [34]. Esta técnica mide la capacidad térmica aparente de una disolución macromolecular como una función continua de la temperatura. A partir de esta función es posible, si el sistema macromolecular está bien definido, la determinación de los parámetros termodinámicos asociados a la transición inducida por la temperatura: cambios de entalpía, ΔH , entropía, ΔS , energía de Gibbs, ΔG , y la capacidad térmica ΔC_p .

La técnica mide directamente la función de partición a través del 67. El conocimiento de los valores termodinámicos y su dependencia de las condiciones del entorno, tales como pH, fuerza iónica, naturaleza del disolvente, etc., unidos al conocimiento detallado de la estructura tridimensional de las macromoléculas.

1.3.2. Formación de Micelas Poliméricas Tribloque PEO-PPO-PEO

La micelización para los copolímeros anfífilicos de bloque es una característica inherente más compleja que la convencional para moléculas de bajo peso molecular convencionales. La composición y polidispersidad es apreciable aún para copolímeros con poca polidispersión. En la práctica, se encuentran grandes diferencias en los valores determinados de CMC para este tipo de compuestos por diferentes técnicas, debido a la sensibilidad del método.

En general, la micelización de los copolímeros tribloque, es un caso convencional de tensoactivo, que obedece el modelo de asociación cerrada, el cual asume que el equilibrio entre la dispersidad del

copolímero (unímero) y multimolecular agregados (micelas). Hay dos aproximaciones del proceso termodinámico: el modelo de separación de fases, en el cuál las micelas son consideradas una fase separada en la CMC, el modelo de acción de masas que considera las micelas y los unímero que están un equilibrio de asociación-disociación[18, 20, 35, 36]. En ambas aproximaciones el cambio de energía libre para la transferencia de un mol de anfifilo en solución a la fase micelar, ΔG (energía libre de micelización), en la ausencia de interacciones electrostáticas (los copolímeros PEO-PPO-PEO son no iónicos) está dado por

$$\Delta G = RT \ln(X_{CMC}) \quad (1.44)$$

Donde R es la constante de los gases, T es la temperatura, y X_{CMC} es la fracción mol de la concentración micelar crítica. Con la suposición de que la concentración de unimeros libres presente junto con las micelas es constante e igual al valor de la CMC, en el caso del modelo de separación de fases. Mientras que el modelo de acción de masas supone un número de agregación grande para la micela. Aplicando la ecuación de Gibbs-Helmholtz, se puede expresar la entalpía de micelización estándar, ΔH ,

$$\Delta H = -RT^2 \left[\frac{\partial \ln(X_{CMC})}{\partial T} \right]_P \quad (1.45)$$

$$\Delta H = R \left[\frac{\partial \ln(X_{CMC})}{\partial (1/T)} \right]_P$$

Finalmente, la entropía de micelización por mol de tensoactivo, ΔS , se puede obtener

$$\Delta S = \frac{(\Delta H - \Delta G)}{T} \quad (1.46)$$

En el caso de la micelización para los copolímeros

$$\frac{\partial \ln(X_{CMC})}{\partial (1/T)} = \frac{\partial(X)}{\partial (1/T_{CMT})} \quad (1.47)$$

Donde X es la concentración expresada como fracción mol, y T_{CMT} es la temperatura de micelización crítica; se convierte en

$$\Delta H = R \left[\frac{\partial \ln(X)}{\partial (1/T_{CMT})} \right]_P \quad (1.48)$$

El inverso de los datos de temperatura de micelización crítica graficados contra la función logaritmo de la concentración generalmente muestra linealidad, Figura 1.8. De la gráfica es posible calcular la entalpía de micelización estándar ΔH° [18].

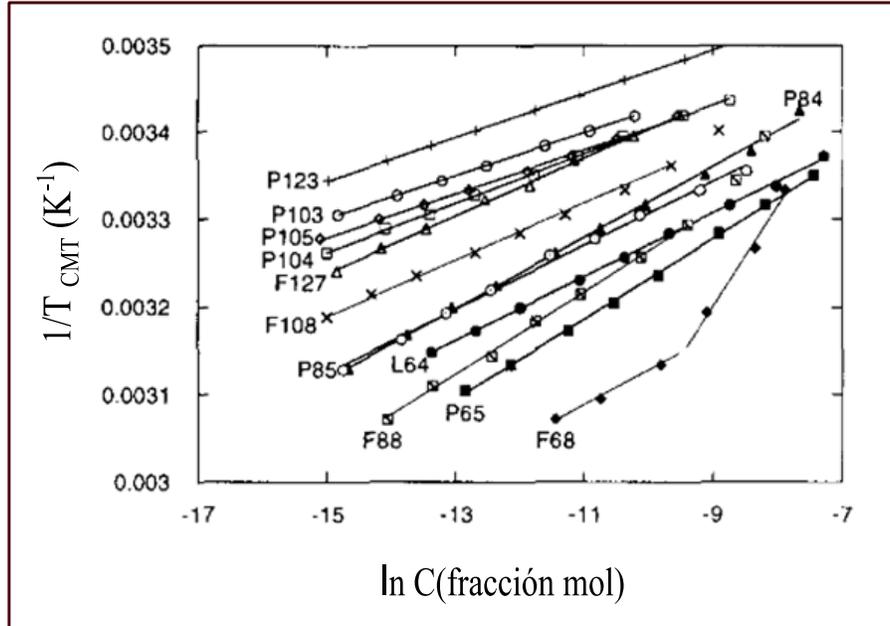


Figura 1.8. Gráfica del inverso de T_{CMT} contra logaritmo natural de la concentración para diferentes copolímeros PEO-PPO-PEO. Adaptado de la Ref. [18]

1.4. MICELAS POLIMÉRICAS Y SU USO EN FARMACIA

1.4.1. Generalidades

Los copolímeros de bloque que en solución acuosa, se asocian para formar estructuras con un dominio interno denominado núcleo micelar, que es capaz de solubilizar y albergar fármacos liposolubles, mientras que los bloques hidrofílicos conforman una corona que se encuentra en contacto directo con el medio externo. La encapsulación del fármaco dentro de la micela previene su interacción con el medio externo, aumentando la estabilidad fisicoquímica. La corona constituye una interfase entre el reservorio del fármaco y el medio [37-41]. Dependiendo de las propiedades como concentración, solubilidad, micro-viscosidad, espesor y porosidad y de la interacción fármaco/núcleo, la cesión del fármaco encapsulado será mayor o menor.

Las micelas poliméricas se pueden administrar por vía oral, ocular y comúnmente parenteral. Presentan una toxicidad más baja que los tensoactivos comunes. También, son físicamente más estables frente a

la dilución, manteniéndose agregadas aún después de ser diluidas hasta concentraciones finales por debajo de la CMC. Esto contribuye a que mantengan su integridad durante un tiempo más prolongado cuando se encuentran en el torrente circulatorio. Por el contrario las micelas de tensoactivos comunes se disgregan con facilidad al diluirse, liberando instantáneamente el fármaco encapsulado en su centro hidrofóbico al medio de dilución. La estabilidad física de las micelas poliméricas frente a la dilución depende de la diferencia entre la CMC [42] y la concentración final, el peso molecular, el HLB del polímero, y también de la naturaleza del fármaco encapsulado [43].

La capacidad de las micelas poliméricas para alojar a un fármaco se puede expresar de diferentes formas:

- 1) La relación entre las cantidades de fármaco dentro y fuera de la micela, denominada coeficiente de reparto micela-agua.
- 2) El número de moles de fármaco solubilizados por gramo de bloque hidrofóbico.
- 3) La relación de solubilización molar (relación molar fármaco/copolímero).

La incorporación de una molécula de fármaco al núcleo micelar es un proceso complejo que depende de los parámetros moleculares y fisicoquímicos tanto de la micela como del fármaco. Para el copolímero, las propiedades más relevantes son el peso molecular y el HLB. Los copolímeros con pesos similares generan núcleos más hidrofóbicos de mayor tamaño y con mayor capacidad de encapsulación. Las propiedades del fármaco como peso molecular, volumen, lipofilia (coeficiente de reparto, logP), punto de fusión, tendencia a la agregación y presencia de grupos funcionales específicos que pueden interactuar con la micela también condicionan su incorporación a la micela.

La intensidad de las interacciones entre las moléculas de fármaco afecta considerablemente la solubilidad. La solubilización requiere el establecimiento de interacciones soluto-disolvente de mayor intensidad que las fuerzas soluto-soluto. En el caso particular de la solubilización micelar, las interacciones fármaco-micela desempeñan un papel fundamental. Cuando más intensas sean, mayor será la capacidad de solubilización de las micelas. En general, fármacos con temperatura de fusión baja se encapsulan más eficientemente [49,50].

El estudio de los fenómenos de agregación y de las propiedades de las micelas poliméricas es esencial para comprender el comportamiento fisicoquímico y biológico de los nanotransportadores. Algunas propiedades que se pueden estudiar son: la concentración micelar crítica, la temperatura de micelar crítica, el tamaño hidrodinámico micelar y la distribución de tamaños a distintos tiempos, el punto de enturbiamiento, los fenómenos de inestabilidad que se manifiestan por un aumento de tamaño micelar, la polidispersión y la modificación del punto de enturbiamiento.

1.4.2. Hidrogeles

Los hidrogeles son redes tridimensionales poliméricas capaces de adsorber grandes cantidades de agua [42, 44], que pueden ser químicamente estables ó pueden degradarse, eventualmente desintegrarse y disolverse. Se pueden clasificar por la naturaleza de los enlaces que participan en la reticulación de las cadenas como físicos o químicos. Los geles físicos o llamados “reversibles”, en los cuales sus redes se mantienen por enredos moleculares, y/o fuerzas secundarias como: fuerza iónica, puente de hidrógeno o

fuerzas hidrofóbicas, Figura 1.9. Estos geles no son homogéneos, debido a que los agregados, dominios asociados hidrofóbicamente o iónicamente pueden formar la inhomogeneidad. También las cadenas terminales y las cadenas sueltas se pueden considerar como defectos en el gel físico.

Los hidrogeles químicos o llamados “permanentes” están formados por cadenas entrelazadas covalentemente. Este tipo de geles se pueden generar por el entrecruzamiento de polímeros solubles en agua o por la conversión de polímeros hidrofóbicos a polímeros hidrofílicos para formar la red. No son homogéneos, debido a que contienen regiones con baja capacidad de hinchamiento y alta densidad de entrecruzamiento, también hay regiones de alto hinchamiento y baja densidad de entrecruzamiento. Probablemente por la agregación hidrofóbica del agente reticulante, Figura 1.9.

Los hidrogeles físicos o químicos, presentan diferentes estructuras entre ellas están: las redes entrecruzadas de homopolímeros, copolímeros lineales, copolímeros de bloque y copolímeros de injerto; complejos polión-ión multivalente, polión-polión o puentes de hidrógeno; redes hidrofílicas estabilizadas por dominios hidrofóbicos; mezclas físicas. Presentan diferentes formas físicas (a) sólidos (ejemplo lentes de contacto suaves), (b) matrices de polvos compactos (ejemplo tabletas o capsulas de ingestión oral), (c) micropartículas (ejemplo transportadores bioadhesivos o tratamientos para quemaduras), (d) recubrimientos (ejemplo en implantes o catéteres; en capsulas o tabletas, o recubrimientos en el interior del capilar en la electroforesis capilar), (e) membranas u hojas (ejemplo parches transdérmicos de liberación prolongada, o para geles de electroforesis en dos dimensiones), (f) capsulas sólidas y (g) líquidas (ejemplo para formar geles por calentamiento o enfriamiento).

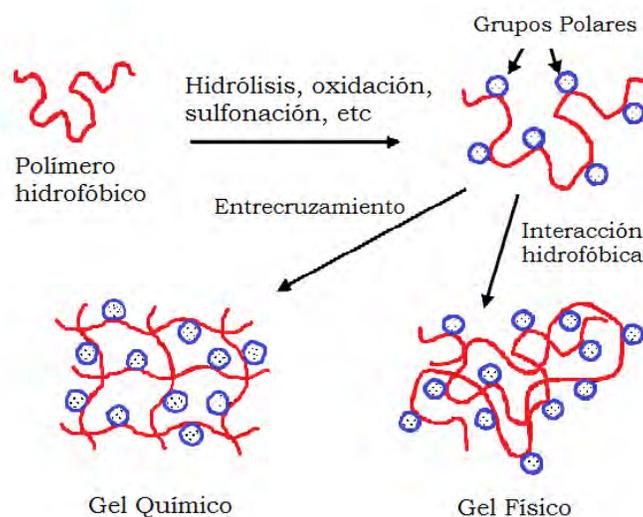


Figura 1.9. Esquema de los métodos de formación de hidrogeles por modificación química de un polímero hidrofóbico.

El agua en el hidrogel determina la permeación, cuando el hidrogel comienza a absorber agua, las primeras moléculas de agua entran a la matriz hidratando la parte hidrofílica en la estructura del polímero. Como resultado se tienen los primeros enlaces con el agua. Al hidratarse la red, se exponen los grupos hidrofóbicos obligados a interactúan con moléculas de agua, conduciendo a enlaces hidrofóbicos con el agua, segundos enlaces de agua. A los primeros y segundos enlaces con el agua se les llama agua total unida. Después la red embeberá agua adicional, debido a la fuerza osmótica de las cadenas de la red. Este hinchamiento adicional es opuesto al entrecruzamiento físico o químico, dando lugar a una fuerza de retracción elástica. Así, el hidrogel alcanzará un nivel de equilibrio de hinchamiento. El agua embebida que llena los espacios entre las cadenas de la red o el centro de los poros, macroporos o huecos, es llamada agua libre o de bulto. Si las cadenas de la red son degradables, el gel comienza a desintegrarse y disolverse, a una velocidad dependiendo de su composición.

Una característica interesante de los polímeros tribloque PEO-PPO-PEO es su transición (sol-gel) sin ninguna reacción química o estímulo externo. La fase sol se define como un fluido corriente mientras que la fase gel no fluye, Figura 1.10. Esta transición se presenta por arriba de una cierta concentración de polímero llamada, concentración crítica de gelificación CCG. La CCG es inversamente proporcional al peso molecular del polímero y la formación de las interacciones en la red es un requisito que determina la gelación. Las interacciones deben ser suficientemente fuertes para evitar la disolución del polímero en el disolvente [45].

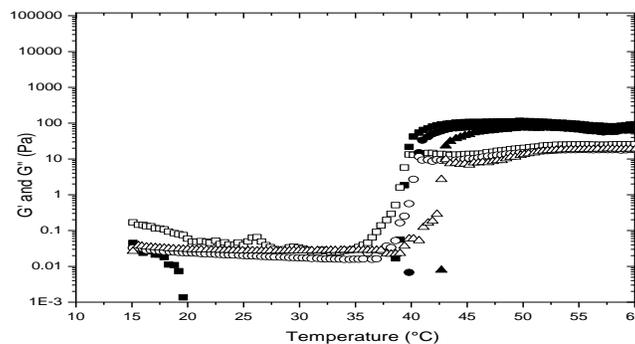


Figura 1.10. Dependencia de los módulos de almacenamiento (G' , símbolos cerrados) y de pérdida (G'' , símbolos abiertos). Para una solución acuosa de P123 (14 % m/m): (Δ) sin griseofulvina, (\circ) con 50 $\mu\text{g/mL}$ de griseofulvina y (\square) 100 $\mu\text{g/mL}$ de griseofulvina. Tomado de la REF. [46]

La determinación del límite entre la fase sol y gel depende del método experimental. Una simple evaluación es la prueba de tubo invertido, cuando un tubo que contiene una solución es inclinado. Se define como fase sol si la solución fluye al mover el tubo. En la fase gel no hay flujo. El flujo es una función del tiempo, la velocidad de inclinación, cantidad de solución y el diámetro del tubo. Cuando la gelación es inducida por el calentamiento, en los experimentos de calorimetría diferencial de barrido aparece un pico endotérmico durante el calentamiento determinando la transición de temperatura, así como la entalpía de gelación [45, 47].

Los hidrogeles son utilizados en la industria farmacéutica en distintas áreas. En la ingeniería de tejidos, debido al gran tamaño de sus poros, se pueden utilizar como dispositivos de intercambio pasivo o sistemas que encapsulan células de tejidos humanas o animales, también pueden liberar factores de crecimiento, creando poros en los cuales las células pueden penetrar y proliferar.

Otro uso es como nanoacarreadores que interactúan revistiendo la mucosa del tracto gastrointestinal, colón, vagina, nariz y otras partes del cuerpo, debido a su habilidad para prolongar su tiempo de residencia en el sitio de localización.

Los hidrogeles residen naturalmente en los tejidos más que cualquier otra clase de materiales biosintéticos, su alto contenido de agua contribuye a su biocompatibilidad.

Los excipientes son incluidos en las formulaciones farmacéuticas como vehículos inertes que proveen el peso necesario, consistencia y volumen para la correcta administración de los ingredientes activos. Pero en las formas farmacéuticas modernas ofrecen papeles multifuncionales como mejora de la estabilidad, liberación y biodisponibilidad de los ingredientes activos, mejora la aceptación por el paciente y las funciones tecnológicas. El uso de polímeros derivados de plantas en la industria farmacéutica incluye la fabricación de matrices sólidas, implantes, películas, micropartículas, nanopartículas, sistemas inhalables e inyectables así como en formulaciones viscosas líquidas

2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA MEZCLA PLURONIC (PEO₂₀-PPO₇₀-PEO₂₀)-HIDROXIETIL CELULOSA

2.1. OBJETIVO E HIPÓTESIS

Objetivo General:

- Hacer un estudio sistemático de las propiedades de superficie y los parámetros termodinámicos (ΔH_{ag}) de la mezcla Pluronic (PEO₂₀-PPO₇₀-PEO₂₀, P123)- Hidroxietil celulosa (HEC) que coadyuve a mejorar la solubilidad de amiodarona (ADA).

Objetivos Particulares:

- Conocer la capacidad de los polímeros P123 y HEC para aumentar la solubilidad de ADA.
- Identificar el fenómeno de agregación entre el P123 y HEC, por medio de los cambios sobre el perfil tensiométrico del P123 (con mayor actividad superficial) al adicionar HEC y ADA.
- Conocer los parámetros termodinámicos relacionados con el proceso de agregación entre el P123 y HEC, P123 y ADA y P123-ADA-HEC, por medio de la calorimetría diferencial de barrido.
- Identificar el tamaño de las posibles estructuras formadas por los componentes individuales o sus mezclas, por medio de dispersión dinámica de luz.

Hipótesis:

- 1) Los Pluronicos se utilizan para solubilizar fármacos, sin embargo estas micelas se disgregan en medio fisiológico. En esta tesis planteamos la hipótesis de que al adicionar HEC a una solución de micelas de P123 cargada con un fármaco hidrofóbico se formarán agregados de mayor tamaño. Este agregado podría retardar la disgregación de la micela. Si esta interacción ocurre entre los polímeros entonces se observarán cambios en las propiedades de superficie, termodinámicas y en mediciones de dispersión dinámica de luz.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Materiales

Se utilizaron los siguientes compuestos: a) un copolímero tribloque con una composición promedio PEO₂₀- PPO₇₀-PEO₂₀ comercialmente llamado P123 de la marca Aldrich y utilizado sin ninguna purificación adicional. La masa molar reportada por el proveedor es 5750 g mol⁻¹; b) la hidroxietil celulosa (HEC) conocido comercialmente como Natrosol de la marca Hercules; cuya masa molar fue determinada en este trabajo por el método de viscosidad intrínseca resultando en 335 000 g mol⁻¹; c) el clorhidrato de amiodarona (ADA) grado farmacéutico de la marca Parafarm y utilizado sin ninguna purificación adicional, con una masa molar de 681.77 g mol⁻¹. El agua utilizada fue destilada y desionizada con un sistema de filtros Millipore (Simplicity). Las soluciones poliméricas se prepararon por pesada con una balanza analítica Ohaus, dejándose bajo agitación magnética durante 24 h para asegurar su completa disolución.

2.2.2. Estudios de Solubilidad de la Amiodarona y Cálculo del Porcentaje de Encapsulación.

2.2.2.1. Curva de Calibración para Amiodarona

Se elaboró una curva de calibración para amiodarona en agua por triplicado mediante espectroscopía UV-visible a 240 nm en un intervalo de concentraciones entre 5-30.5 µg/mL. El espectrofotómetro utilizado fue de la marca Cary-Bio50 Varian/Agilent, Australia.

2.2.2.2. Cálculo de la Solubilidad

Se prepararon diferentes soluciones acuosas de P123 ((P123_x + H₂O), $x=1, 2.5, 3.5, 10.5$ % m/m) y HEC ((HEC_y + H₂O), $y=0.5, 1, 2.5$ y 3.5 % m/m) para estudiar la capacidad de las soluciones poliméricas de aumentar la solubilidad de amiodarona. Se pesó una cantidad conocida de fármaco (aproximadamente 10 mg) dentro de viales con capacidad de 10 mL, después se agregaron 5 mL de cada una de las soluciones poliméricas. Estas soluciones con fármaco fueron preparadas por triplicado y se mantuvieron en agitación a temperatura ambiente por 48 h. Pasado el tiempo, las soluciones saturadas fueron filtradas con un filtro de membrana de PVDF con un tamaño de poro de 0.22 µm. El filtrado obtenido, se colocó en una celda de cuarzo durante 15 min a 298.15 K para termostatarlas. La concentración de fármaco en el filtrado se determinó por medio de espectroscopía con adecuada dilución en agua cuando fue necesario.

2.2.2.3. Porcentaje de Encapsulación Eficaz (EE %)

El porcentaje de encapsulación eficaz (EE %) se calculó de acuerdo al protocolo propuesto por Linares-Alba *et al* [48]. Para los sistemas: (P123_x + H₂O), con $x=1$ y $x=3$ % m/m; (P123_x + H₂O) + HEC_y con $x=1, y=0.5$ % m/m; y $x=3, y=0.62$ % m/m. Las soluciones de P123 con ADA se prepararon como se mencionó previamente, seguida de la adición de HEC sólido. Después de 24 h de agitación, se observa la completa disolución de los compuestos, las soluciones se centrifugaron a 14 000 g usando

filtro para centrífuga Amicon Ultra 0.5 mL (Millipore Co.) para remover el fármaco no encapsulado. La concentración de ADA en el filtrado se determinó y el EE % se calculó con la siguiente ecuación:

$$EE\% = \frac{C_{total} - C_{libre}}{C_{total}} \times 100 \quad (2.1)$$

2.2.3. Viscosidad Intrínseca

La masa molar promedio de HEC se determinó usando el método de viscosidad intrínseca y la ecuación Mark-Houwink (una explicación más detallada se encuentra en el anexo 5.2.1). Para obtener la viscosidad capilar, se utilizó un viscosímetro capilar Cannon-Ubbelohde 0B (state College, PA USA). Todas las mediciones fueron hechas a 298.15 K (utilizando un baño termostato). Obteniendo un valor de 335 000 g mol⁻¹.

2.2.4. Tensión Superficial Dinámica (método gota pendiente)

La tensión superficial dinámica es una técnica capaz de calcular la tensión superficial en función del tiempo, partiendo de una superficie sin tensoactivo hasta que se alcanzan las condiciones de equilibrio. En este proceso las moléculas de tensoactivos que se encuentran en el seno de la disolución se trasladan hasta la interface aire-agua donde serán adsorbidas. El intervalo de tiempo en el que se alcanza la tensión superficial de equilibrio depende del tipo de tensoactivo y de la concentración, variando de milisegundos a horas [49]. El fundamento de la técnica se encuentra en el anexo 5.2.2.

Equipo

Las mediciones de tensión superficial dinámica fueron realizadas al menos tres veces utilizando un tensiómetro automático con ángulo de contacto OCA-20 (Dataphysics Instruments, Germany) a 298.15 K. Este equipo está conformado por una base en la que se fija un marco que sirve de carril para una barra móvil y como soporte para un cubo de acrílico desmontable. Sobre el cubo se encuentra una celda de doble chaqueta que permite trabajar a temperatura constante.

Las jeringas de precisión fueron llenadas con soluciones preparadas 24 h antes de las mediciones. Una vez llena la jeringa fue introducida dentro de la celda transparente y termostatizada por 20 min aproximadamente para alcanzar el equilibrio térmico. Con la solución dentro de la jeringa se formó una gota que fue grabada durante 5 u 8 h, usando una luz de contraste para mejorar el video. La tensión superficial se calculó por medio del software del equipo.

2.2.4. Calorimetría Diferencial de Barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en Inglés “Differential Scanning Calorimetry) es una técnica experimental muy utilizada para estudiar sistemas moleculares, cuyas estructuras son estabilizadas por interacciones débiles; susceptibles de experimentar transformaciones conformacionales y/o cambios de fase al calentar o enfriar el sistema en un intervalo de temperatura [50]. Algunos materiales que se caracterizan por esta técnica son las proteínas, polímeros, liposomas, vesículas etc. El fundamento de la técnica se encuentra en el anexo 5.2.3.

Equipo VP-DSC de Microcal

El equipo utilizado para determinar las capacidades térmicas en este trabajo fue un VP-DSC de Microcal (Northampton, MA, USA). El equipo cuenta con un analizador que permite programar y controlar barridos de temperatura en un intervalo de 283.15 a 353.15 K. El equipo utiliza un mecanismo interno basado en el efecto peltier, no requiriendo dispositivos internos para calentar o enfriar.

Como se utilizan muestras líquidas, para evitar la ebullición y la formación de burbujas, el microcalorímetro cuenta con un sistema de presurización con tapón de rosca que al cerrar, permite mantener una presión de exceso de 3 atm durante la medición. Las celdas se encuentran montadas en un bloque fijo de forma cilíndrica con un volumen de 0.532 mL. Debido a que el microcalorímetro funciona de modo adiabático, las celdas son recubiertas con dos corazas concéntricas, una coraza interna y otra externa que las separa del medio exterior, que son controladas por un sistema de retroalimentación por lo que sus temperaturas, son semejantes a las de las celdas.

A este tipo de equipos se les denomina diferencial ya que lo que se mide es la potencia de compensación que el equipo suministra para igualar la temperatura entre dos celdas semejantes. Una de ellas, actúa como referencia, que en el experimento convencional contiene el disolvente, mientras que la otra contiene la muestra, que es una disolución de la macromolécula, la cual es el objeto de estudio.

El procesamiento de los datos experimentales, se lleva a cabo mediante el software VP-Viewer de Microcal, que permite calcular áreas bajo la curva (ΔH de transición conformacional) a partir de las gráficas de potencia contra temperatura (termogramas).

Las soluciones son previamente desgasificadas durante 15 min en un equipo de vacío ThermoVac. Una vez desgasificadas, se utiliza una jeringa de vidrio limpia y seca de 0.5 mL Hamilton (Reno, NV, USA) que se llena con la disolución. La aguja de la jeringa se inserta en el agujero de la celda. Introduciendo el contenido de manera que no se formen burbujas en el interior. Después de retirar la jeringa se elimina el exceso del fluido en el reservorio, repitiéndose el procedimiento en la otra celda. Una vez que las celdas fueron llenadas, se coloca el tapón presurizador quedando cerrado herméticamente.

Primero, se realiza un barrido de agua contra agua en el equipo antes de realizar las mediciones de las soluciones. Después, los barridos de las soluciones se realizaron 6 veces para observar la repetibilidad de los resultados. La capacidad térmica fue analizada después de la substracción del barrido de agua contra agua, estableciendo las líneas bases de pre- y post- transición independientes. Construyendo una línea base sigmoideal debajo del pico de transición, para el análisis.

2.2.5. Dispersión Dinámica de Luz

La dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés “dynamic light scattering”) es una técnica que mide el movimiento Browniano y lo relaciona con el tamaño de las partículas; basada en el fenómeno físico de la dispersión de la luz debido a la interacción radiación-materia. Esto se logra iluminando las partículas con un láser y analizando las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada [51]. El Fundamento de la técnica se encuentra en el anexo 5.2.4.

Equipo

El equipo utilizado para medir los diámetros hidrodinámicos fue un Nanosizer ZS ZEN (3600) (Malvern Instruments, USA), con un ángulo de 173° . El arreglo típico de un sistema de dispersión dinámica de luz está formado por 6 componentes principales. (1) Un rayo láser que es la fuente de luz que ilumina la muestra contenida en una celda (2). Para soluciones diluidas la mayor parte del rayo láser pasa a través de la muestra, pero una fracción es dispersada por las partículas de la muestra en un ángulo θ . Un detector (3) es usado para medir la intensidad de luz dispersada en un ángulo 173° . (4) Un atenuador para reducir la intensidad del rayo láser y por lo tanto la intensidad de la luz dispersada. (5) El correlacionador es el dispositivo en el que la señal de intensidad de dispersión que viene del detector, se hace pasar por un tablero de procesamiento de señal digital (compara la intensidad de dispersión en intervalos de tiempo consecutivos para derivar la velocidad a la que la intensidad es variable). Finalmente los datos obtenidos son analizados mediante un (6) software y se obtiene el tamaño.

Para realizar las mediciones de los diámetros hidrodinámicos (d_h), las soluciones fueron filtradas con un filtro de membrana de PVDF con un tamaño de poro de $0.22 \mu\text{m}$, después del filtrado las soluciones se colocaron en una celda de cuarzo y fueron termostatizadas. Basados en los experimentos de calorimetría diferencial de barrido las mediciones de d_h se realizaron a tres diferentes temperaturas dependiendo del sistema, en el caso de la solución de HEC, la medición del d_h se realizó a 298.15 K .

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Solubilización de la Amiodarona

La amiodarona (ADA) es un fármaco hidrofóbico con una solubilidad en agua del 0.04 % m/m (determinada en este trabajo por espectroscopia UV- Visible). Algunos ejemplos de los espectros de absorbancia de amiodarona en agua se muestran en la Figura 2.1. El espectro muestra un claro pico a 240 nm que incrementa al aumentar la concentración de fármaco. Dicho pico se utiliza para caracterizar las soluciones con fármaco.

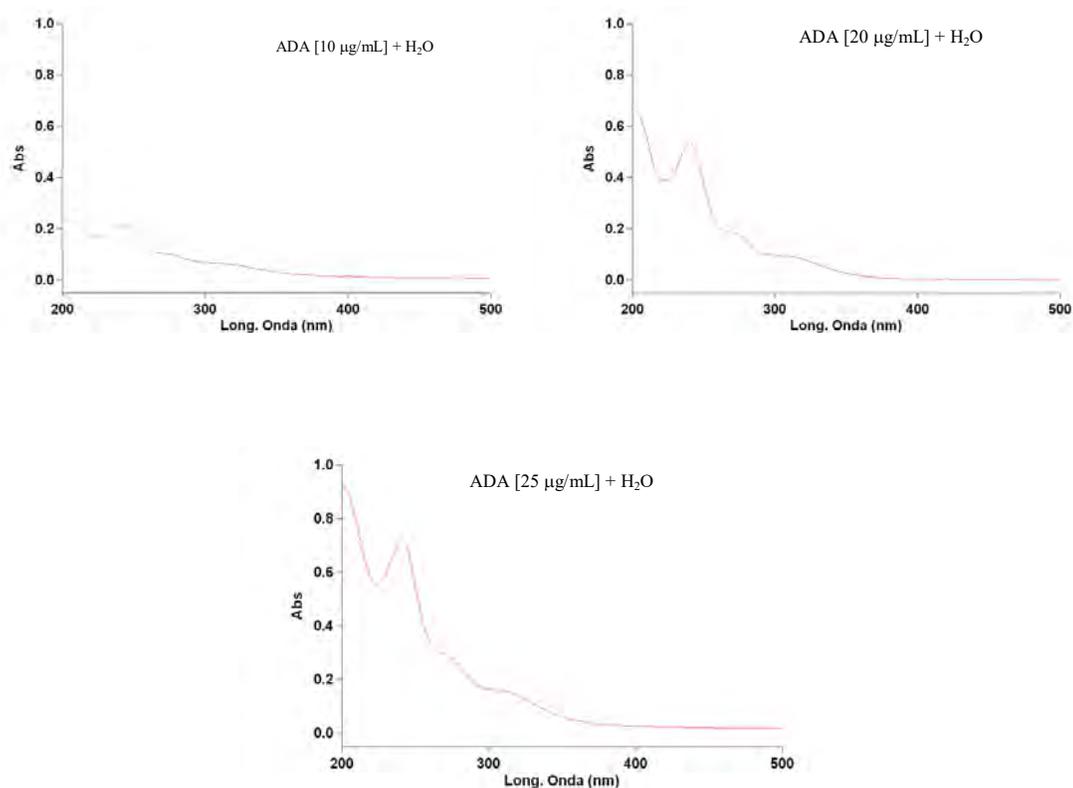


Figura 2.1. Ejemplos de espectros de absorción para el sistema ADA + H₂O a diferentes concentraciones.

La curva de calibración se calculó a partir de diferentes disoluciones de amiodarona en agua en un intervalo de concentración entre 5-30.5 $\mu\text{g/mL}$. Las cuales fueron leídas por espectroscopía UV-visible. Construyendo la gráfica de absorbancia vs concentración, Figura 2.2, se ajusta a los datos experimentales la ecuación de una línea recta cuya r^2 es 0.9982. Con los datos del ajuste lineal es posible calcular las concentraciones de fármaco en las diferentes soluciones poliméricas.

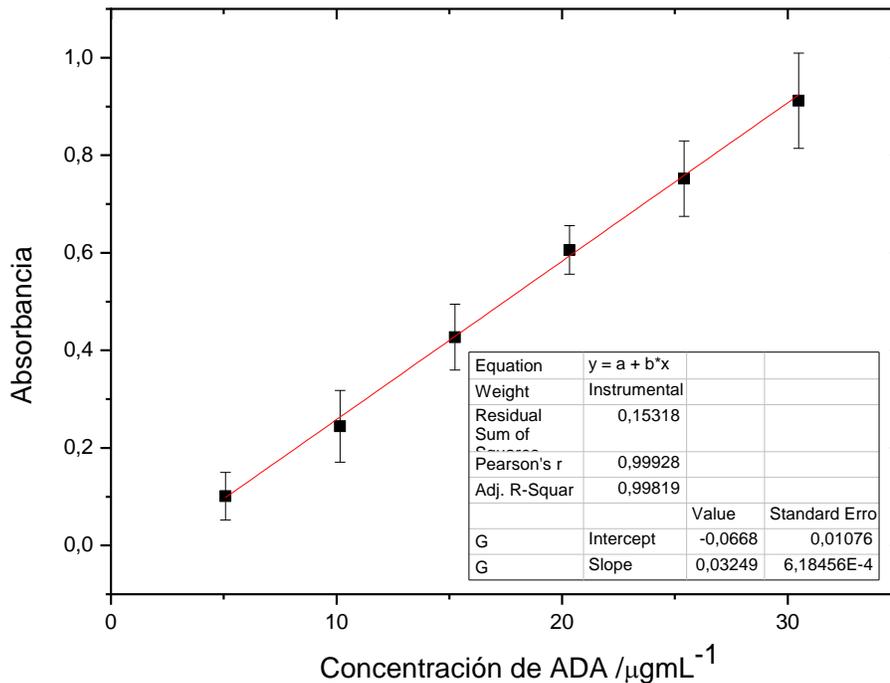


Figura 2.2. Curva de calibración de amiodarona en agua. Los datos experimentales se encuentran en el Anexo 5.3.1

Primero, se evalúa la capacidad de los polímeros P123 y HEC en solución acuosa para solubilizar ADA. Los resultados se reportan en % m/m como se pidió en la revista *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, para su publicación. En el caso de la solución con HEC, no es capaz de solubilizar ADA, ya que no se encuentra un pico en el espectro de UV-visible a 240nm como se observa en la Figura 2.3 (a). Por otra parte, en los espectros de absorbancia para las soluciones de P123, Figura 2.3 (b), (c), (d), si se observa un pico a 240 nm que permite obtener la cantidad solubilizada de ADA. El valor del pico de absorbancia en las diferentes soluciones depende de la dilución. Los resultados de muestran en la Tabla 2.1, las soluciones de P123 aumentan la cantidad de ADA solubilizada, al aumentar la concentración.

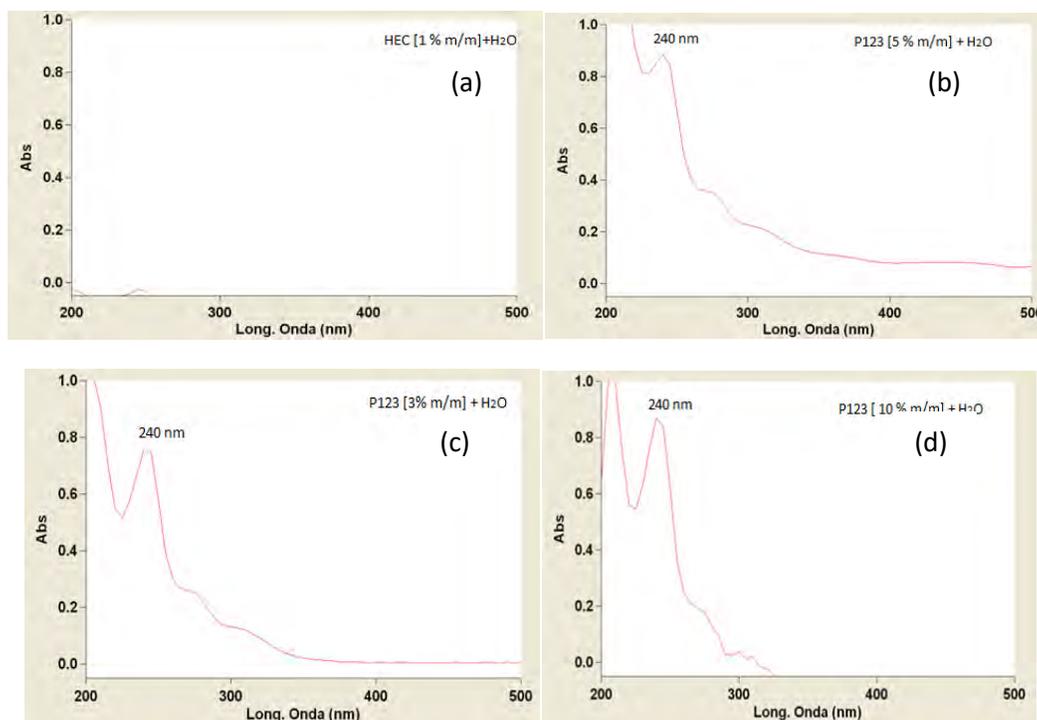


Figura 2.3 Espectros de absorción para diferentes concentraciones de soluciones poliméricas. El valor de absorbancia depende de la dilución de la solución.

Sin embargo, si HEC se adiciona al sistema (P123+ H₂O)+ADA, se obtiene una solución transparente (sistema (P123+ H₂O)+ADA+HEC) cuyo espectro de absorción presenta el pico a 240 nm, Figura 2.4, que no altera la solubilidad del ADA obtenida en las soluciones de P123 al 1 y 3 % m/m, respectivamente. La presencia de ADA dentro de las micelas poliméricas se confirmó con la determinación del porcentaje de encapsulación (EE%) en algunas de las formulaciones y con los datos de tensión superficial (se presentan más adelante). La adición de HEC a la solución de P123 al 1 % m/m incrementa la eficiencia de encapsulación en 30 %. Por el contrario, el EE% no se modificó por la presencia de HEC en las soluciones con P123 a 3% m/m (Tabla 2.1).

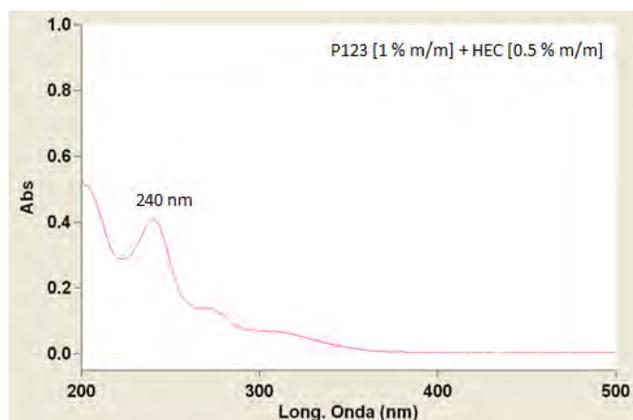


Figura 2.4. Espectro de absorción para el sistema P123 [1% m/m] + HEC.

Tabla 2.1. Solubilidad de ADA y EE% en diferentes sistemas.

Sistema	Solubilidad / % m/m	EE %
(ADA + H ₂ O)	0.04 ± 0.01	-
(HEC + H ₂ O) + ADA	0	-
(P123 _x + H ₂ O) + ADA		
<i>x</i> / % m/m		
1	0.22 ± 0.01	64
2.5	0.5 ± 0.01	-
3	0.84 ± 0.02	94
5	1.20 ± 0.1	-
10	2.00 ± 0.7	-
(P123 _x + H ₂ O) + ADA + HEC _y		
<i>x</i> / % m/m <i>y</i> / % m/m		
1 0.5	0.22 ± 0.1	98
3 0.62	0.84 ± 0.02	95

2.3.2. Tensión Superficial

El comportamiento de los sistemas puros (P123 + H₂O) y (HEC + H₂O) y sus mezclas (Tabla 2.2) fueron estudiados por tensiometría de gota pendiente a 298.15 K. Con esta técnica se obtiene la tensión superficial dinámica en función del tiempo. Ejemplos de los datos experimentales obtenidos con esta técnica para una solución del sistema (P123 + H₂O) se muestran en la Figura 2.5. Donde se observa una

disminución de la tensión superficial con respecto del tiempo; en los primeros 400 segundos se observa una rápida caída de la tensión superficial debido a que la interface se encuentra desocupada y los monómeros de P123 viajan hacia ella; entre 400 y 1700 segundos la disminución en la tensión superficial es lenta conforme se van ocupando los lugares en la interface; pasando los 1700 segundos los valores de la tensión superficial están entre 34.32-34.12 mNm^{-1} prácticamente constante. El mismo comportamiento se observa en todas las soluciones estudiadas. La disminución en la tensión superficial depende del material y la concentración de la solución.

Tabla 2.2. Composición de los sistemas estudiados por tensión superficial dinámica.

Sistema	P123/ % m/m	HEC/ % m/m
(HECy + H ₂ O)	$x = 0$	$y = 1 \times 10^{-4}$ to 2
(P123x + H ₂ O)	$x = 3 \times 10^{-6}$ a 0.5	$y = 0$
(P123x + H ₂ O) + HECy	$x = 5 \times 10^{-6}$ a 0.061	$y = 0.001$
(P123x + H ₂ O) + HECy	$x = 5 \times 10^{-6}$ a 0.03	$y = 0.005$
(P123x + H ₂ O) + ADA ^a	$x = 0.5$	$y = 0$
(P123x + H ₂ O) + ADA ^a + HECy	$x = 0.5$	$y = 0.005$

^a La concentración de ADA es 0.16 % m/m.

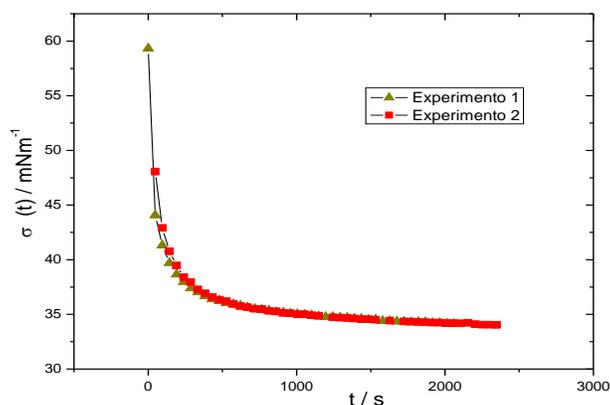
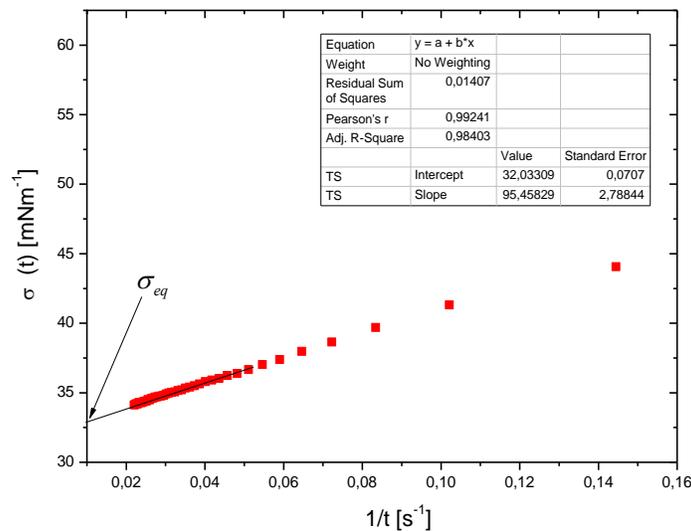


Figura 2.5. Muestra la tensión superficial dinámica de una solución de (P123 (0.003 % m/m) +H₂O) a 298.15 K (-▲-) experimento 1; (-■-) experimento 2. Los datos experimentales se encuentran en el Anexo 5.3.2.

Para obtener adecuadamente la tensión superficial al equilibrio (σ_{eq}) de los datos de tensión superficial dinámica, se utilizó la ecuación de Ward y Tordai para tiempos largos [32] ecuación 1.39.

De esta forma, cuando $\sigma(t)$ es graficada vs $t^{-1/2}$, se observa un comportamiento lineal del cual la ordenada al origen corresponde a la σ_{eq} [52, 53]. La Figura 2.6 es un ejemplo de el ajuste lineal del modelo de Ward and Tordai, cuya r^2 es 0.98403; el mismo ajuste se realizo con todos los experimentos de tensión superficial dinámica para los sistemas de la Tabla 2.2. Con los valores de σ_{eq} (Anexo 5.3.3) se construyen las Figuras 2.7 y 2.10.



$$\sigma(t)_{t \rightarrow \infty} = \sigma_{eq} - \frac{\Gamma_{eq}^2 RT}{2C_0} \sqrt{\frac{\pi}{D}} \sqrt{\frac{1}{t}}$$

Figura 2.6. Ajuste de la ecuación de Ward y Tordai para tiempos largos a los datos de tensión dinámica de una solución de (P123 (0.003 % m/m) + H₂O). Los datos experimentales se encuentran en el Anexo 5.3.2.

La Figura 2.7 muestra la tensión superficial al equilibrio como función de la fracción mol de P123 o HEC. El perfil del sistema (P123 + H₂O) puro muestra dos puntos de inflexión en la gráfica, el primero ha sido atribuido a la transición de monómeros a unimicelas, mientras que el segundo se atribuye a la transición de unimicelas a micelas (concentración de agregación crítica, CAC). Después de estos dos puntos de inflexión, la tensión superficial se mantiene constante e independiente de la concentración. En el caso de (HEC + H₂O) a 298.15 K, la tensión superficial es constante a 60.4 mN m⁻¹ en todo el rango de concentraciones estudiadas y este valor está de acuerdo con los previamente reportados por Djuve et al [52].

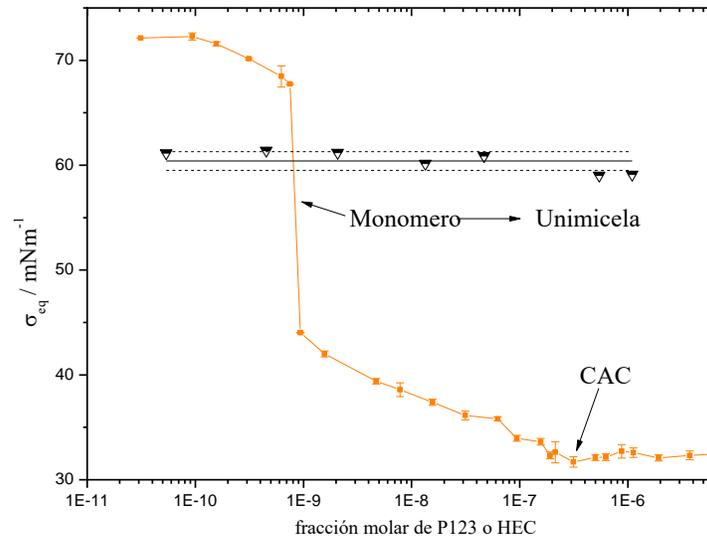


Figura 2.7. Tensión superficial al equilibrio (σ_{eq}) para el sistema (P123 + H₂O) como función de la fracción molar de P123 (■). σ_{eq} para el sistema (HEC + H₂O) como función de la fracción molar (▼) a 298.15 K. Anexo 5.3.3.

La Figura 2.8 (a) muestra la tensión superficial dinámica para (P123 + H₂O) a tres diferentes concentraciones: por debajo de las CAC ($x=0.001\%$), en la CAC ($x=0.0068\%$) y mayor a la CAC ($x=0.02\%$). Por debajo de la CAC, la tensión superficial disminuye lentamente con el tiempo. Para las concentraciones en la CAC, la caída en la tensión superficial es rápida, tomando la tensión de equilibrio a 3000 s, cuyo valor es $32.3\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. La Figura 2.8 (b) muestra el sistema (P123 + H₂O) + HEC con una concentración 0.001% en este sistema a concentraciones de P123 por debajo de la CAC, aumenta el valor de σ_{eq} comparado con el sistema sin HEC para tiempos menores a 1500 segundos. Esto puede sugerir que los monómeros de P123 pueden interactuar con HEC y la superficie estará menos ocupada por monómeros de P123. En la Figura 2.8 (b) también se muestra un rápido decremento en la tensión superficial cuando la concentración de P123 es la de la CAC y por arriba de la CAC. Sin embargo, la Figura 2.8 (c) muestra que en las soluciones de (P123 + H₂O) + HEC con 0.005% , toma más tiempo obtener el equilibrio que con $y=0.001\%$, ya que después de los 1000 segundos en el sistema $y=0.001\%$ la tensión superficial en la solución con $x=0.0068\%$ no varía y en el sistema con $y=0.005\%$ después de los 1000 segundos la tensión superficial sigue disminuyendo lentamente. Este efecto sugiere un incremento en la interacción entre HEC y los monómeros de P123 que forman el complejo, el cual disminuye la actividad superficial de la mezcla. Este comportamiento ha sido previamente reportado para sistemas polímero-tensioactivo e indica que la actividad superficial del complejo polímero-

tensoactivo depende de la interacción entre los componentes y los cambios conformacionales en la adsorción [6, 54]. Por lo tanto, un aumento en la tensión superficial aparece a bajas concentraciones cuando HEC está presente.

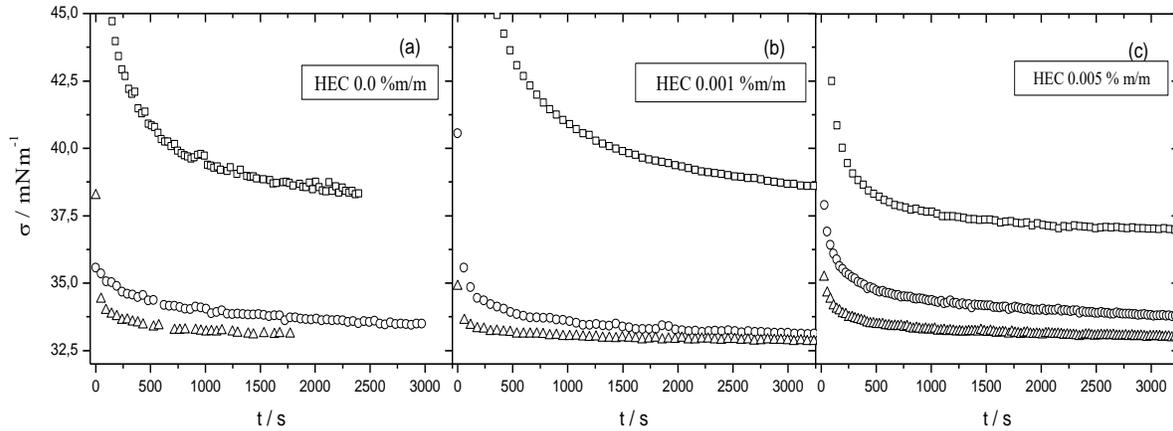


Figura 2.8. Tensión superficial dinámica (σ) vs. t para el sistema $(P123x + H_2O) + HECy$, donde x es la concentración de P123 menor a la CAC (\square , $x = 0.001 \text{ \% m/m}$), en la CAC (\circ , $x = 0.0068 \text{ \% m/m}$) y mayor a la CAC (Δ , $x = 0.02 \text{ \% m/m}$); y es la concentración de HEC que toma valores de (a) 0.00 \% m/m ; (b) 0.001 \% m/m y (c) 0.005 \% m/m respectivamente. Los datos experimentales se encuentran en el Anexo 5.3.4 Tablas A5, A6 y A7.

La Figura 2.9 muestra un ejemplo de la gráfica de $\sigma(t)$ vs $t^{1/2}$ para el sistema $(P123x + H_2O) + HEC$ [0.005 \% m/m] a cinco diferentes concentraciones de P123. Observamos que a bajas concentraciones la pendiente es más grande y disminuye con el aumento de la concentración de P123. De esta manera es posible obtener la tensión al equilibrio, aplicando la ecuación 1.39.

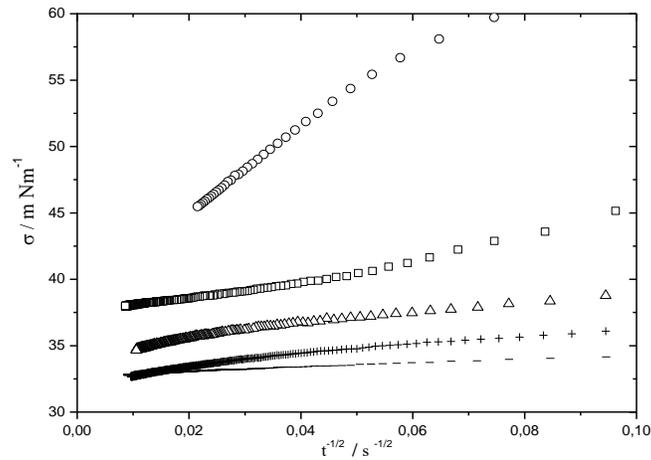


Figura 2.3. Tensión superficial dinámica(σ) vs. $t^{-1/2}$ para el sistema (P123x + H₂O) + HECy, donde $y = 0.005$ % m/m; $x = 0.00075$ % m/m (○), 0.002 % m/m (□), 0.004 % m/m (Δ), 0.006 % m/m (+) y 0.015 % m/m (-).

Con los valores de σ_{eq} (Anexo 5.3.3) fue posible la construcción de la Figura 2.10, la cual muestra la dependencia de σ_{eq} con la concentración para los sistemas (P123x + H₂O) y (P123x + H₂O) + HECy (con $y = 0.001$ y 0.005 % m/m). Los perfiles tensiométricos para las mezclas muestran tres cambios de pendientes interpretados como CAC_1 , C_s y CAC_e . Estos cambios son más claros en la representación de σ_{eq} vs la fracción molar de P123, como se muestra en la Figura 2.10. La CAC_1 indica el comienzo de la interacción entre los monómeros de P123 y HEC, provocando un cambio en la tensión superficial al equilibrio. La adición de más P123 después de la CAC_1 provoca un segundo cambio en la gráfica indicando la saturación de agregado P123-HEC, este punto es llamado concentración de saturación, C_s . Después la σ_{eq} disminuye hasta estabilizarse a la misma concentración llamada concentración de agregación crítica extendida, CAC_e (alrededor de 0.006 % m/m, fracción mol = 1.88×10^{-7}), se forman micelas libres (fuera del polímero). Estos resultados concuerdan con los reportados para la mezcla de copolímeros tribloque y tensoactivos no iónicos [55]; la interacción entre HEC y SDS [56] y la interacción copolímero tribloque-quitosan [57].

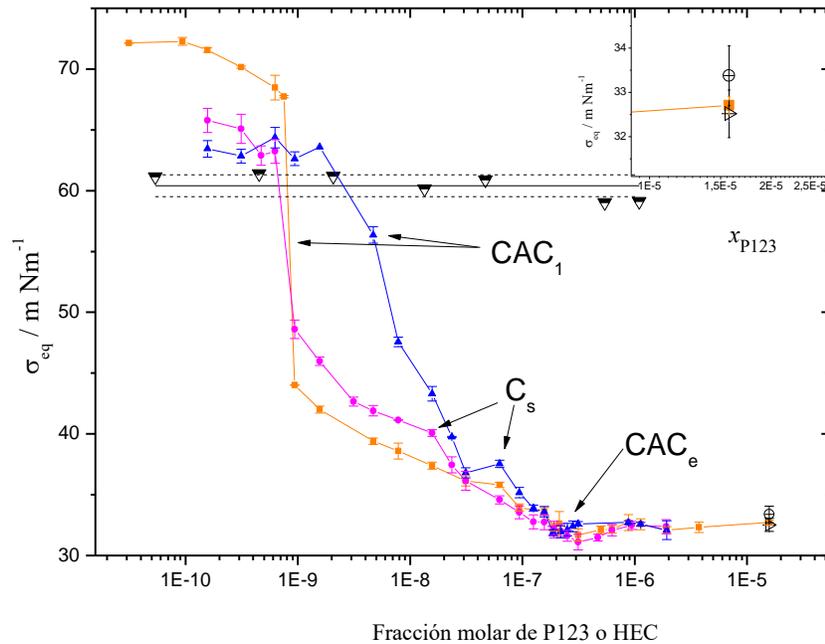


Figura 2.10. Datos de σ_{eq} para diferentes sistemas: (P123x + H₂O) (■), (P123x + H₂O) + HEC [0.001 % m/m] (●) y (P123 x + H₂O) + HEC [0.005 % m/m] (▲). La gráfica insertada muestra la σ_{eq} para (P123 [0.5 % m/m] + H₂O) + ADA [1.2 % m/m] (⊕) y (P123 [0.5 % m/m] + H₂O) + ADA [1.2 % m/m] + HEC [0.005 % m/m] (⊞). (Anexo 5.3.3).

Las diferencias entre los perfiles tensiométricos de (P123 + H₂O) y (P123 + H₂O) + HEC_y con y igual 0.001 % m/m (Figura 2.10) pueden ser atribuidos a la adsorción de tensoactivo (monómeros de P123) sobre el polímero (HEC) así como en la interface, como sugiere Goswami et al.[55]. Más allá de C_1 , HEC está saturado con monómeros de P123 (C_s) y la reducción en la tensión superficial surge debido a la adsorción en la interface. Los resultados en la σ_{eq} son más grandes comparadas con el sistema de referencia. Adicionar más monómeros de P123 provoca que la σ_{eq} tome valores cercanos a los del sistema de referencia en la CAC_e .

El efecto de HEC sobre el sistema de referencia es más notorio en el sistema [(P123 + H₂O) + HEC_y con $y=0.005$ % m/m] a concentraciones por debajo de C_s . La Figura 2.10 muestra el comportamiento de este sistema, se observa que el valor de CAC_1 se recorre a la derecha y un cambio abrupto en la gráfica se observa entre la fracción molar de P123 9.39×10^{-9} y 1.56×10^{-8} indicando que la composición de la

superficie está cambiando. La adición de más P123 después de C_s , hace que la σ_{eq} tome valores similares al sistema (P123 + H₂O). Cerca de la concentración CAC_e la diferencia en los valores de σ_{eq} entre los sistemas es despreciable.

También se prepararon soluciones con ADA, de las cuales se obtuvieron sus σ_{eq} . Como control, primero se determinó el valor de σ_{eq} de una solución acuosa de ADA a una concentración por debajo de su límite de solubilidad (ADA [0.01 % m/m] + H₂O, $\sigma_{eq} = 54 \text{ mN m}^{-1}$). Los sistemas (P123 [0.5 % m/m] + H₂O) + ADA [1.2 % m/m] y [(P123 [0.5 % m/m] + H₂O) + ADA [1.2 % m/m] + HEC [0.005 % m/m]] a concentraciones mayores a su CAC_e , y una concentración de ADA cuatro veces más de su límite de solubilidad, las σ_{eq} obtenidas indican que el valor es prácticamente el mismo que el obtenido para el sistema (P123 + H₂O) a esa concentración (están representadas en la gráfica insertada de la Figura 2.10). El obtener valores de σ_{eq} prácticamente iguales en la solución de P123 sin ADA y con ADA nos sugiere que las moléculas de ADA se están nanoencapsulada dentro de los diferentes agregados formados por P123 y (P123 + HEC). De otra manera, si las moléculas de ADA no estuviera dentro de los agregado, al ser moléculas hidrofóbicas, viajarían a la superficie acomodándose en la interface agua-aire modificando la tensión superficial, por lo que el valor de σ_{eq} sería diferente del sistema (P123 + H₂O).

2.3.3. Calorimetría Diferencial de Barrido

El objetivo principal de los experimentos de calorimetría fue caracterizar el efecto del HEC y ADA en la energética del proceso de agregación del P123. La Figura 2.11 muestra las trazas calorimétricas típicas del sistema (P123 + H₂O); al aumentar la temperatura se observa el pico endotérmico característico del sistema. Al enfriar y volver a calentar el sistema las trazas calorimétricas se superponen, indicando la reversibilidad del proceso.

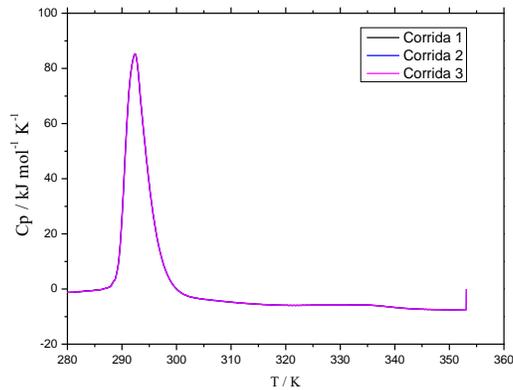


Figura 2.11. Trazas calorimétricas para tres corridas de una solución de (P123 [2.3 % m/m] + H₂O)

Como se mencionó en la sección 1.3.2., de las trazas calorimétricas se obtiene la temperatura micelar crítica (CMT). Algunos autores la definen como el inicio de la formación de micelas, bajo la suposición de que a temperaturas menores a la transición calorimétrica existen solamente monómeros en la solución. Así el área del pico es la energía involucrada para que un mol de monómeros pase a formar micelas. [20, 35]. Para seleccionar adecuadamente la CMT, se preparó una solución de P123 (1% m/m) la cual se midió por dos técnicas, calorimetría diferencial de barrido y tensión superficial, Figura 2.12. Los resultados muestran que la tensión superficial disminuye con el aumento de temperatura hasta un valor aproximado de 34 mN m⁻¹ a 18.9 °C después σ_{eq} se mantiene constante hasta una temperatura de 30 °C. Si se observa la traza calorimétrica, el inicio de la transición comienza a 18.2 °C. Las diferencias en las temperaturas pueden ser por la sensibilidad de las técnicas. Así el valor de la CMT en este trabajo se determinó como la temperatura de inicio de la transición en la traza calorimétrica.

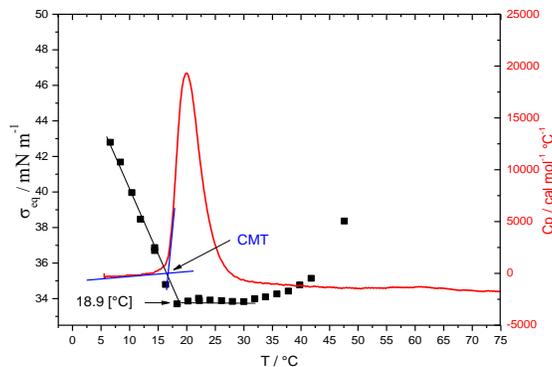


Figura 2.12. Determinación de la CMT para una solución (P123 [1 % m/m] + H₂O).

Para la interpretación del concepto de CMT, se realizaron mediciones de dispersión dinámica de luz a 283.15 K (una temperatura antes de la transición observada), 291.15 K (una temperatura aproximada a la T_m) y 303.15 K (una temperatura después de la transición observada). Los resultados se muestran en la Tabla 2.4. A 298.15 K se encontró polidispersidad de tamaños (tres tamaños diferentes que cambian con la muestra medida) lo que contradice la idea que a temperaturas menores a la transición sólo existen monómeros en solución. A 291.15 K se observan dos picos, uno a 76 nm (el más abundante) y otro a 2709 nm; lo que sugiere que los agregados observados a 283.15 K se disgregan y reorganizan. A 303.15 K se encontró un solo tamaño que se adjudica al tamaño de la micela (18 nm), y los agregados observados a 291.15 K se reorganizan en un agregado de menor tamaño. Una discusión más detallada de los resultados de dispersión dinámica de luz se encuentra en la sección 2.3.4.

Tabla 2.3. Resumen de los diámetros hidrodinámicos (d_h) encontrados para el sistema (P123 + H₂O) a diferentes temperaturas.

Sistema	T /K	d_h / nm	%
(P123 + H ₂ O)	283.15	197 ± 42	59
		69 ± 19	30
		4.7 ± 0.4	10
	291.15	76 ± 20	93.6
		2709 ± 1073	6.4
	303.15	18 ± 2	100

Los resultados indican que antes de la transición ya existe una mezcla de agregados y monómeros, que durante la transición se disgregan y reorganizan constantemente hasta reorganizarse (después de la transición) en agregados homogéneos (un solo tamaño que se le asigna a la micela) Tabla 2.3, Figura 2.13. Así el área de la traza calorimétrica es la energía que necesitan estos agregados poco estables para disgregarse y reorganizarse en agregados uniformes (entalpía de agregación, ΔH_{ag}), la CMT nos indica el inicio del reacomodo de los agregados y la T_m es el máximo de la transición.

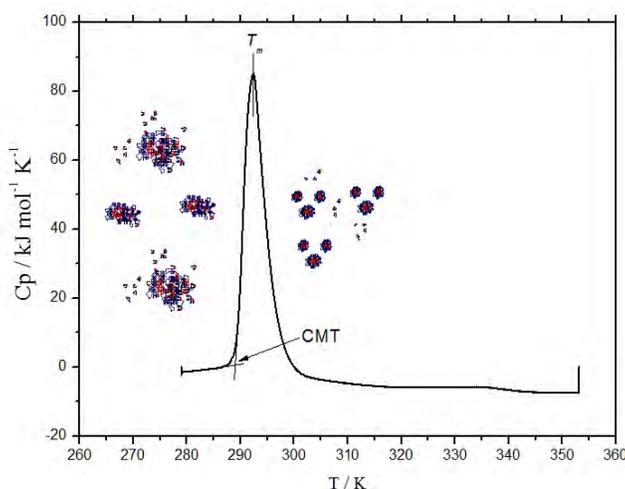


Figura 2.13. Interpretación de la transición calorimétrica en las soluciones de P123.

El primer grupo de experimentos fueron del sistema (P123 + H₂O) con una concentración de polímero entre 0.34 y 3.45 % m/m, las cuales son mayores a su CAC (0.006 % m/m). En el segundo grupo de experimentos, estudiamos el fenómeno de agregación del sistema cuando HEC fue adicionado a diferentes concentraciones al sistema ((P123 + H₂O), a una concentración fija de P123. El tercer grupo de experimentos involucra sistemas compuestos de P123 a composición fija en presencia de un fármaco hidrofóbico, ADA, y finalmente, un cuarto grupo de experimentos que implica la mezcla completa, el sistema (P123+ H₂O)+ADA+HEC.

La Figura 2.14 (a) muestra las trazas calorimétricas del sistema (P123 + H₂O) a diferentes concentraciones. En ellas se observan picos endotérmicos caracterizados por sus T_m 's y CMT. El proceso de disgregación/agregación registrado por la traza calorimétrica es un proceso cooperativo, aunque la curva es amplia en comparación con otras transiciones de orden/desorden por ejemplo, el plegamiento de proteínas [58]. Estas observaciones experimentales son el resultado de la dependencia que presenta el equilibrio de disgregación/agregación con la temperatura y la heterogeneidad química de la muestra. De las trazas calorimétricas mostradas en la Figura 2.14 (a), se puede observar que un incremento en la concentración de P123, recorre la traza calorimétrica hacia la izquierda. Esto indica que a altas concentraciones de P123 se promueve la transición a temperaturas inferiores. El ΔH_{ag} fue calculado de la integración de la dependencia de temperatura del C_p y normalizada con la concentración de las soluciones de P123. Los resultados de las mediciones de DSC para soluciones del sistema (P123 + H₂O) se resumen en la Tabla 2.3.

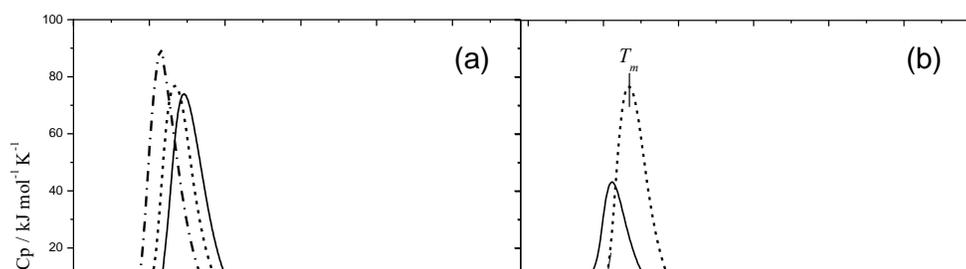


Figura 2.14. (a) Trazas calorimétricas del sistema $(\text{P123}x + \text{H}_2\text{O})$ donde x toma valores de 0.34 % m/m (—), 0.61 % m/m (····) y 3.45 % m/m (— · —); (b) Trazas calorimétricas de los sistemas: $(\text{P123 [1 % m/m]} + \text{H}_2\text{O})$ (—) y $(\text{P123 [1 % m/m]} + \text{H}_2\text{O}) + \text{ADA [0.23 % m/m]}$ (····). La concentración de P123 es 1.00 % m/m en ambos casos.

Tabla 2.4. Resumen de los termogramas del sistema $(\text{P123} + \text{H}_2\text{O})$.

P123 / % m/m	$\Delta H_{ag}^{(a)} / \text{kJ mol}^{-1}$	T_m / K	CMT / K
(P123 + H ₂ O)			
0.34	419.8 ± 1.4	294.6	291.4
0.61	421.2 ± 1.4	293.9	290.8
0.98	449.7 ± 0.9	293.3	290.2
2.30	429.2 ± 1.5	292.4	289.1
3.06	465.6 ± 1.2	291.8	288.8
3.42	427.5 ± 1.2	291.6	288.7
3.45	440.0 ± 1.2	291.5	288.6

^(a) El promedio del valor del ΔH_{ag} para el sistema $(\text{P123} + \text{H}_2\text{O})$ es $436.0 \pm 16.6 \text{ kJ mol}^{-1}$.

En el caso del sistema $(\text{P123} + \text{H}_2\text{O})$, la variación de la concentración no afecta en gran medida el valor normalizado de ΔH_{ag} , cuyo promedio es $436.0 \pm 16.6 \text{ kJ mol}^{-1}$, este valor es congruente con el valor promedio reportado por Da Silva *et al.* para el mismo sistema ($442.0 \pm 32.3 \text{ kJ mol}^{-1}$) [59]. Por otro lado, la CMT y los valores de T_m disminuyen con un aumento en la concentración de P123. Esto

concuerta con el cambio de entalpía endotérmica observado por otros autores [34, 60, 61]. El cambio de la temperatura T_m es 3.12 K cuando la concentración de P123 cambia de 0.34 a 3.45. % m/m.

Cuando el sistema (HECy + H₂O, y=1.0 % m/m) fue evaluado por DSC en el mismo intervalo de temperaturas que el sistema anterior, no mostró ninguna transición (Figura 2.15). Además, cuando se añade diferentes cantidades de HEC, dentro del límite de solubilidad (0-0.65 % m/m, antes de que aparezca una solución opalescente con la posterior separación de fases) en el sistema (P123x + H₂O) con x= 3 % m/m, encontramos que las trazas calorimétricas no cambian en comparación con aquellas obtenidas para el sistema de referencia, Figura 2.15. Por lo tanto, los valores del ΔH_{ag} , la T_m y la CMT son los mismos que para el sistema (P123 + H₂O) concluyendo que la adición de pequeñas cantidades de HEC no afecta el proceso de agregación del P123.

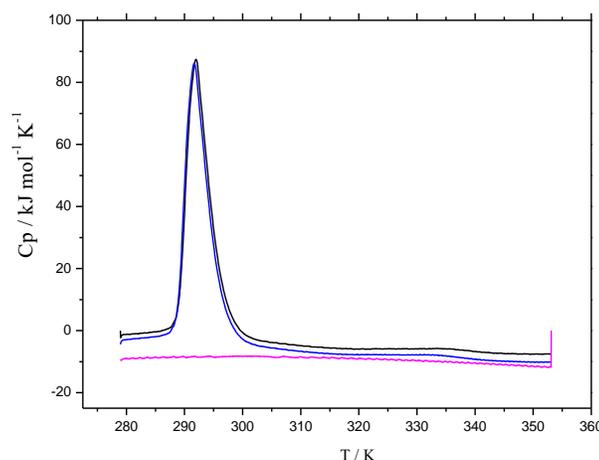


Figura 2.15. Ejemplo de termogramas para los sistemas: (—) (P123_x + H₂O), (—) (P123_x + H₂O) + HEC con x= 3 % m/m. (—) (HEC [1 % m/m] + H₂O)

Una situación completamente diferente es observada cuando ADA fue agregada al sistema (P123 + H₂O) formando el sistema (P123+ H₂O)+ADA. Se observaron cambios significativos en las trazas calorimétricas (Figura 2.14 (b)) y en los parámetros termodinámicos de agregación (Tabla 2.4). La adición del fármaco hidrofóbico disminuye dramáticamente el ΔH_{ag} alrededor del 60 % del valor obtenido en el caso de (P123 + H₂O). Los valores de T_m para los sistemas también reflejan este hecho, ya que son menores en comparación con el sistema (P123 + H₂O) y la diferencia se incrementa conforme la concentración de P123 aumenta.

Cuando HEC fue adicionado al sistema (P123 + H₂O) + ADA, la CMT y la T_m mostraron leves diferencias comparadas con las obtenidas para el sistema sin HEC (Tabla 2.5). Sin embargo el ΔH_{ag} para el sistema (P123 + H₂O) + ADA + HEC es mayor (aumentó en 53 kJ mol⁻¹) en comparación al sistema (P123 + H₂O) + ADA. Aunque la presencia de HEC no tiene influencia en los parámetros termodinámicos de agregación para P123 solo, la presencia del fármaco hidrofóbico, ADA, afecta estos parámetros termodinámicos y hace evidente la interacción entre P123 y HEC.

Tabla 2.5. Resumen de los datos para los termogramas de los sistemas: (P123 + H₂O) + ADA y (P123 + H₂O) + ADA + HEC.

P123 / % m/m	$\Delta H_{ag} / \text{kJ mol}^{-1}$	T_m / K	CMT / K
(P123 + H ₂ O) + ADA			
1.00 ^(a)	259 ± 5	291.2	288.4
3.00 ^(b)	290 ± 2	289.2	286.3
(P123 + H ₂ O) + ADA + HEC			
1.00 ^(a)	312 ± 9	290.1	287.0
3.00 ^(b)	327 ± 10	289.0	285.4

^a La concentración de ADA es 0.22 % m/m.

^b La concentración de ADA es 0.84 % m/m.

2.3.4. Tamaño de Partícula

El diámetro hidrodinámico (d_h) para los diferentes sistemas fue investigado usando dispersión dinámica de luz a tres temperaturas diferentes: antes (283.15 K), durante (291.15 K) y después (303.15 K) de la transición observada en los experimentos de calorimetría diferencial de barrido. En todas las mediciones, la concentración de P123 fue 0.5 %, la cual está por arriba de la CAC; la concentración de HEC fue 0.5 % y La concentración de ADA fue 1%. Se reportan los resultados del d_h encontrados por intensidad y una representación esquemática de la formación de agregados en los diferentes sistemas estudiados se encuentra en la Figura 2.21.

Para el sistema (P123 + H₂O), antes de la CMT, se observaron tres poblaciones, Figura 2.16 (a). El diámetro más pequeño fue asignado al monómero. Al aumentar la temperatura a 291.K se observaron dos picos, uno a 76 nm (el más abundante) y otro a 2709 nm, a esta temperatura la polidispersidad disminuye en el sistema, Figura 2.16 (b). Se observó que a 283.15 K ya existe un agregado de 69 nm (30 %) que aumenta su proporción en el sistema a más de 90 % a 291.15 K, Tabla 2.6. Lo que nos sugiere que el sistema se encuentra en constante movimiento en el que los agregados de disgregan y reorganizan. Cuando las mediciones fueron hechas después de la transición (303.15 K), sólo una población fue observada a 18 nm (Figura 2.16 (c)), la cual fue asignada al tamaño de la micela de P123, Tabla 2.6 (Figura 2.21 (a)). El tamaño para la micela coincide con el encontrado por Bhattacharjee *et al.*[62].

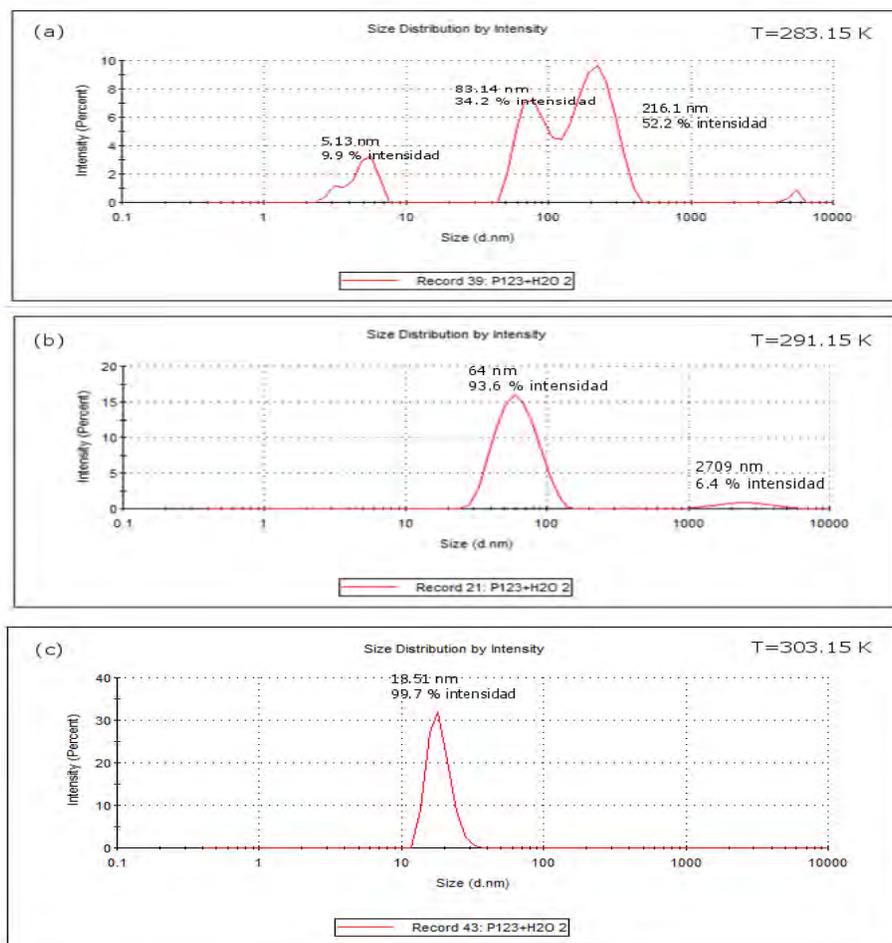


Figura 2.16. Ejemplo de distribución de tamaños de partícula para el sistema (P123 + H₂O) a diferentes temperaturas.

En el sistema (HEC + H₂O), las mediciones del tamaño de partícula fueron realizadas a 298.15 K debido a que no presentó transición en los experimentos de calorimetría. Observamos dos poblaciones (Figura 2.17), la más pequeña y abundante se atribuye al agregado de HEC (34 nm) Tabla 2.6, Figura 2.21.

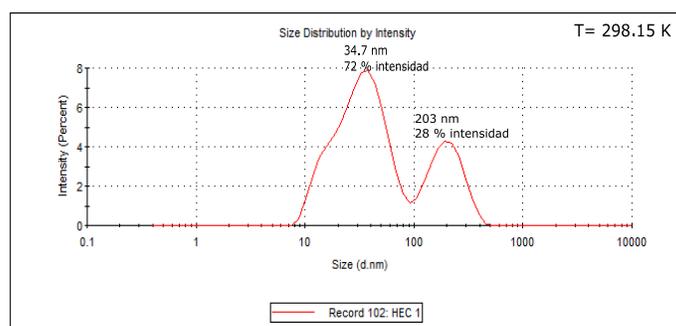


Figura 2.17. Ejemplo de distribución de tamaños de partícula para el sistema (HEC + H₂O) a 298.15 K.

Tabla 2.6. Resumen de los diámetros hidrodinámicos (d_h) encontrados a diferentes temperaturas (283.15 K, 291.15K y 303.15K) para los sistemas puros (P123 + H₂O) y (HEC + H₂O).

Sistema	T /K	d_h / nm	%	Estructura
(P123 + H ₂ O)	283.15	197 ± 42	59	Monómero de P123
		69 ± 19	30	
		4.7 ± 0.4	10	
	291.15	76 ± 20	93.6	
		2709 ± 1073	6.4	
303.15	18 ± 2	100	Micela de P123	
(HEC + H ₂ O)	298.15	34 ± 4	72	
		194 ± 50	23	

Cuando el sistema (P123 + H₂O) + HEC fue medido a temperaturas menores CMT (Tabla 2.7), se presentaron dos picos, Figura 2.18 (a). A 291.15 K se observaron más poblaciones (Figura 2.18 (b)), el sistema se reorganiza, y el pico de 22 nm (el menos abundante) observado a 283.15 K aumentó a 52 % de intensidad. Con el aumento de temperatura los tamaños se modificaron, a 303.15 K se observaron dos poblaciones. Un pico a 25 nm que no cambió con la temperatura (Tabla 2.7), que podría representar micelas de P123 (el tamaño fue mayor al encontrado en el sistema (P123 + H₂O)). Mientras que el segundo pico, el más abundante, con un tamaño de 87nm, Figura 2.18 (c), fue asignado al complejo P123 + HEC. Considerando que el tamaño de los agregados de HEC fue 34 nm es posible sugerir que el complejo se encuentra formado por al menos dos micelas de P123 envueltas por un agregado de HEC (Figura 2.21 (b)).

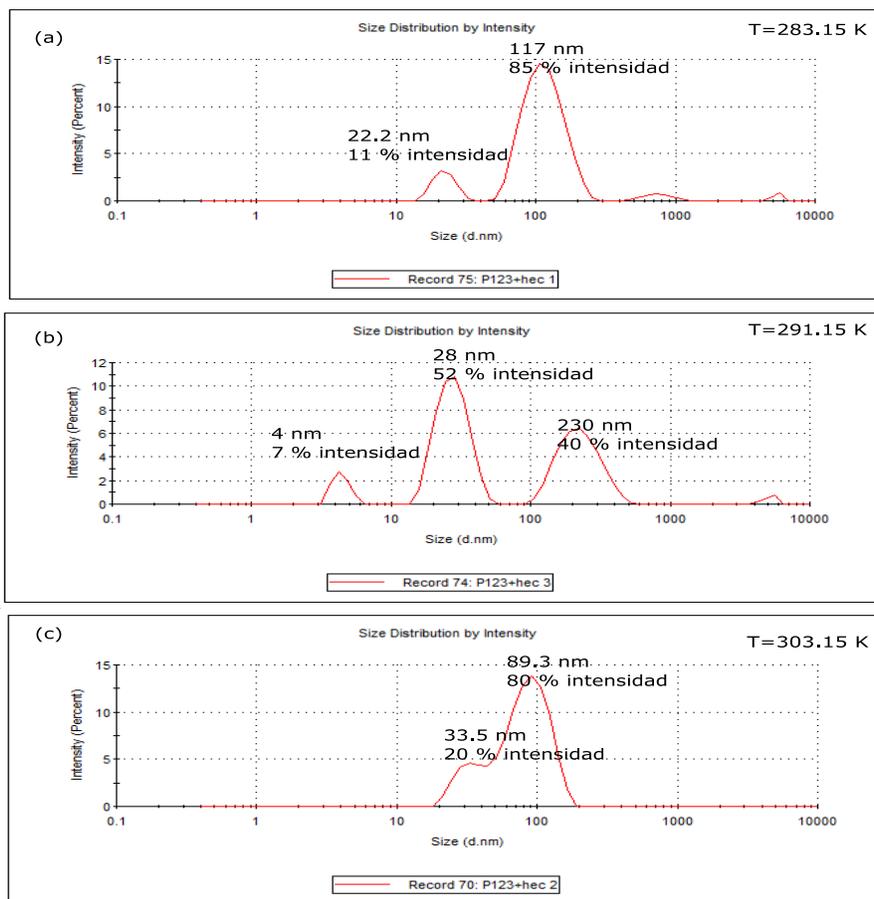


Figura 2.18. Ejemplo de distribución de tamaños de partícula para el sistema (P123 + H₂O) + HEC a diferentes temperaturas.

En el caso del sistema (P123 + H₂O + ADA), Tabla 2.7, un pico se observó a temperatura por debajo de la CMT (192 nm), Figura 2.19 (a). Cuando la temperatura se elevó (291.15 K, Figura 2.19 (b)), aparecen más poblaciones, el mismo fenómeno observado en los sistemas anteriores a la misma temperatura. Siendo el pico más abundante a 114 nm, lo que sugiere la reorganización del sistema. A 303.15 K se observaron dos picos, un pico a 15 nm (el más abundante) fue asignado a las micelas de P123 cargadas con ADA (Figura 2.19 (c) y Figura 2.21 (c)) y otro a 169. Una posibilidad es que el agregado observado a 283.15 K y 291.15K esté formado por algunas micelas de P123 cargadas de ADA que al aumentar la temperatura se disgregue en micelas de P123 cargadas con ADA. El efecto de ADA en el sistema (P123 + H₂O) fue la reducción del tamaño micelar en 16.5 %. Este comportamiento puede ser atribuido a un aumento en las interacciones hidrofóbicas entre el segmento PPO y ADA.

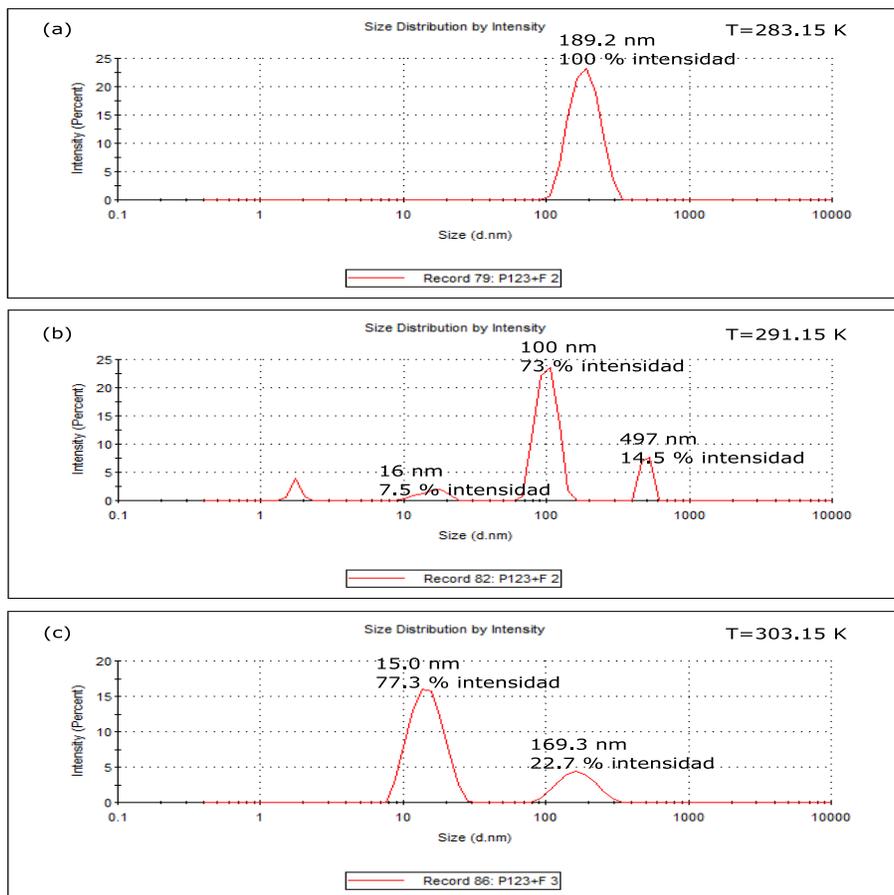


Figura 2.19. Ejemplo de distribución de tamaños de partícula para el sistema (P123 + H₂O + ADA) a diferentes temperaturas.

Finalmente, cuando HEC se adiciona al sistema (P123 + H₂O) + ADA, se observaron tres picos a cualquier temperatura (Figura 2.20, Tabla 2.7). A 283.15 K, el pico alrededor de 284nm fue el más abundante, Figura 2.20 (a). Este pico también se observa a altas temperaturas pero es menos abundante. Los otros dos picos a 283.15 K cambiaron de tamaño cuando la temperatura aumenta. El pico observado en 42 nm (Figura 2.20 (a)) parece reducir su tamaño con el aumento de temperatura, a 291.15 K se observó a 21 nm (Figura 2.20 (b)) y a 303.15 K a se observó en 15 nm (Figura 2.20 (c), suponiendo que es el mismo agregado). A una temperatura de 305.15 K el pico alrededor de 284 nm fue asignado al complejo (micela P123-cargada + HEC) (Figura 2.21 (d)), sugiriendo que el HEC envuelve micelas de P123 cargadas con ADA, proveyendo al fármaco de una segunda capa protectora.

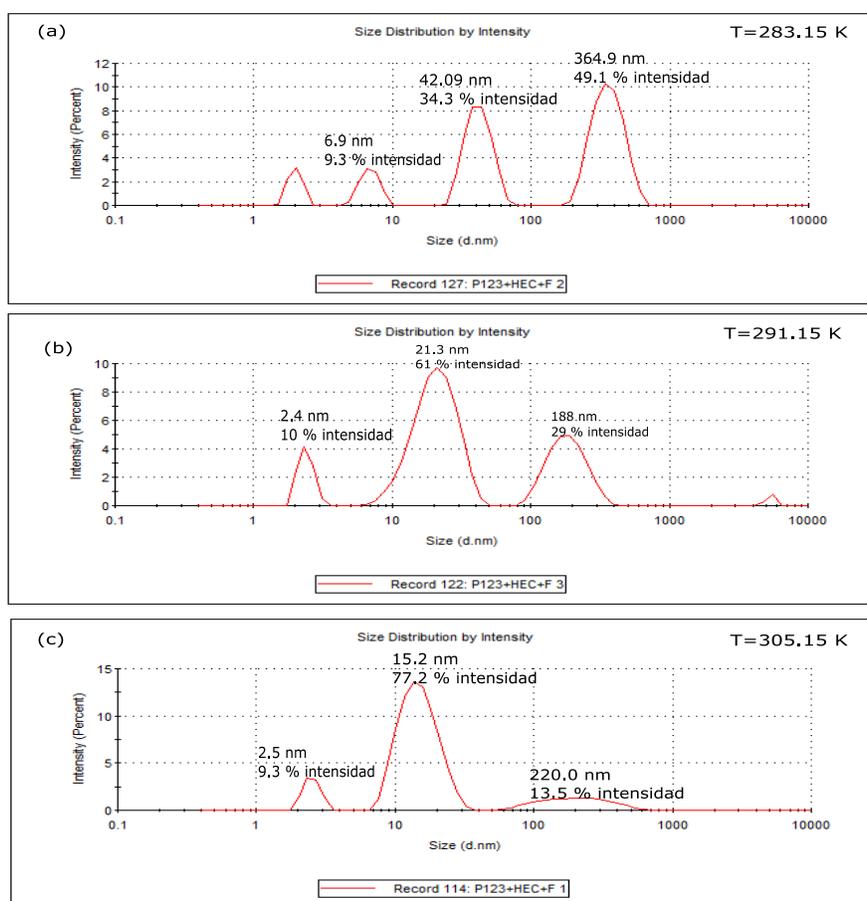


Figura 2.20. Ejemplo de distribución de tamaños de partícula para el sistema (P123 + H₂O) + ADA + HEC a diferentes temperaturas.

Tabla 2.7. Resumen de los diámetros hidrodinámicos (d_h) encontrados a diferentes temperaturas para los sistemas puros (P123 + H₂O) y (HEC + H₂O).

Sistema	T /K	d_h / nm	%	Estructura
(P123 + H ₂ O) + HEC	283.15	132 ± 47	85	Complejo (Micela de P123 + HEC)
		28 ± 8	15	
	291.15	28 ± 6	53	
		230 ± 71	40	
		4,6 ± 0,5	7	
		87 ± 2	86	
303.15	25 ± 8	14		
(P123 + H ₂ O) + ADA	283.15	192 ± 16	100	Micela de P123-cargada
		114 ± 21	76	
	291.15	1229 ± 183	15	
		27 ± 4	9	
	303.15	15 ± 1	75	
		150 ± 38	25	
(P123 + H ₂ O) + ADA + HEC	283.15	284 ± 115	40	Complejo (Micela de P123 + HEC)
		681 ± 94	38	
		35 ± 10	12	
	291.15	24 ± 10	69	
		273 ± 78	21	
		2,3 ± 0,5	10	
	303.15	15.8 ± 0.6	77	
		290 ± 62	13	
	3 ± 1	10		

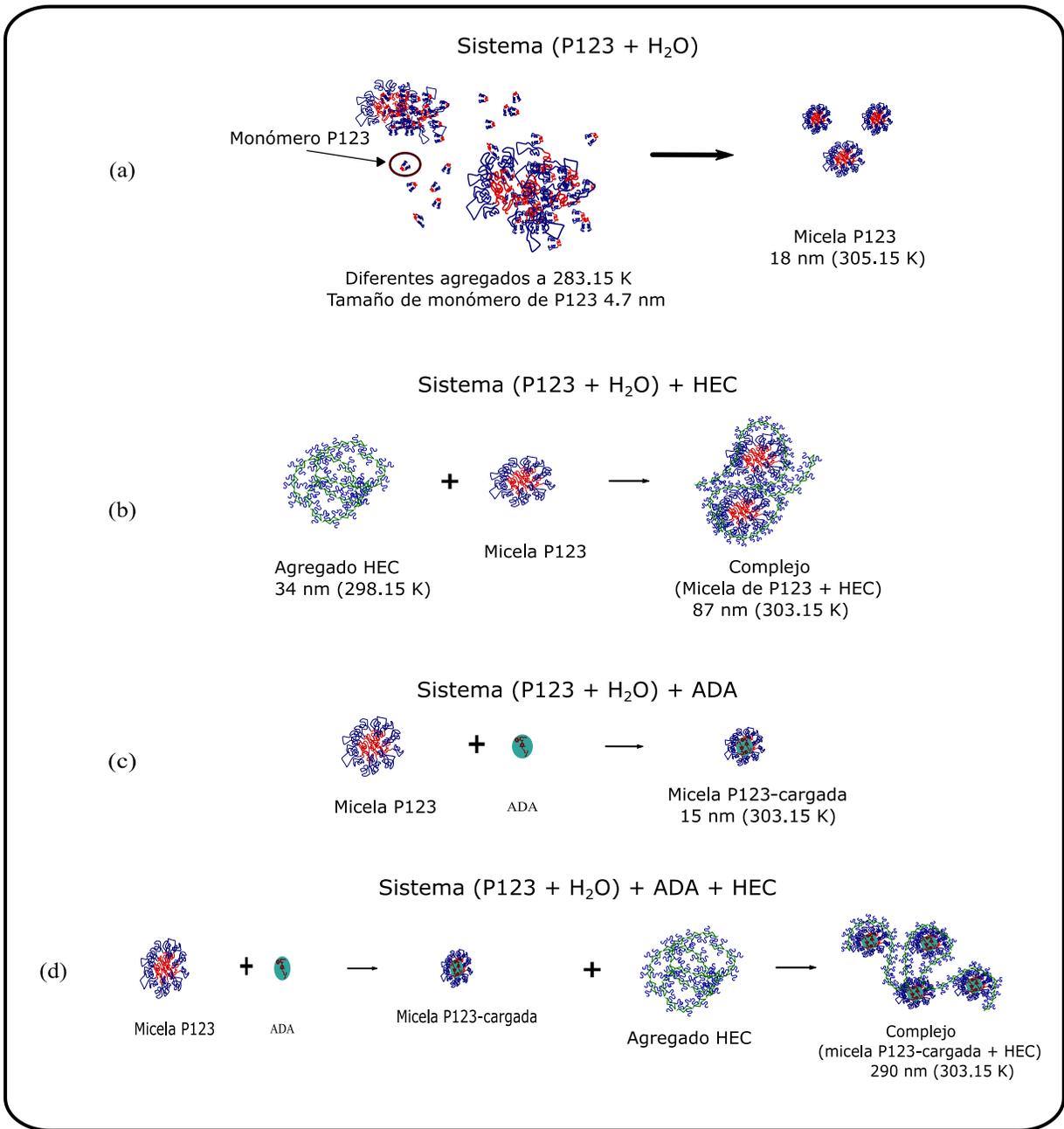


Figura. 2.21. Diagrama propuesto para los diferentes agregados formados por el P123, HEC y ADA, basados en el análisis de DLS. (a) Micela de P123; (b) Complejo (Micela de P123 + HEC); (c) Micela de P123-cargada; (d) Complejo (Micela de P123-cargada + HEC).

2.4. CONCLUSIONES

La solubilidad de amiodarona se mejora en las soluciones micelares de P123, por el contrario la solución de HEC no solubiliza al fármaco. Pero la mezcla de los polímeros mejora el % de encapsulación eficaz.

Las mediciones de la tensión superficial dinámica nos permitieron obtener valores de σ_{eq} para soluciones acuosas de P123, HEC y mezclas (P123+HEC). La adición de HEC aumenta los valores de σ_{eq} de las mezclas (P123 + H₂O) + HEC en comparación con el sistema de referencia a concentraciones por debajo de la fracción molar de 1×10^{-7} . Esto sugiere que los monómeros de P123 interaccionan con HEC para formar un complejo. Esta interacción promueve la aparición de CAC₁, C_s and CAC_c. Conforme la concentración de P123 aumenta la σ_{eq} alcanza el mismo valor para todos los sistemas (32.2 mN m⁻¹). La inclusión de ADA dentro de la solución micelar no cambia a σ_{eq} .

Los valores de ΔH_{ag} , la T_m y la CMT para el sistema (P123 + H₂O) son reducidos por la presencia de ADA. Esto se atribuye a la unión de ADA al centro hidrofóbico de P123, el cual facilita la agregación. La adición de HEC al sistema (P123+ H₂O) + ADA aumenta en al menos 40 kJmol⁻¹ el ΔH_{ag} .

Las mediciones de DLS revelan que las mezclas P123+HEC forman un complejo con una estequiometría sugerida de 2:1 entre las micelas de P123 y el agregado de HEC. La adición de ADA a las micelas de P123 reduce su tamaño en 16.5 %. Estas micelas de 15 nm se juntan por la presencia de HEC formando un complejo de 290 nm. El complejo (P123+ H₂O)+ADA+HEC provee de una segunda capa protectora al fármaco hidrofóbico, favoreciendo su estabilidad en la solución y el sistema puede ser probado para la liberación controlada de fármacos.

3. FORMACIÓN DE UN GEL SUPRAMOLECULAR (P123+HEC+ α -CD)

3.1. OBJETIVOS:

Objetivo general

Proponer una forma farmacéutica con el sistema P123+HEC capaz de sostener la liberación de un fármaco hidrofóbico.

Objetivos Particulares:

- Mejorar la solubilidad de griseofulvina, un fármaco hidrofóbico
- Elaborar un gel con el sistema P123+HEC
- Evaluar la liberación de griseofulvina de los geles y dispersiones.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Materiales

Se utilizaron los siguientes compuestos: a) un copolímero tribloque con una composición promedio PEO₂₀- PPO₇₀-PEO₂₀ comercialmente llamado P123 de la marca Aldrich y utilizado sin ninguna purificación adicional. La masa molar reportada por el proveedor es 5750 g mol⁻¹; b) la hidroxietil celulosa (HEC) conocido comercialmente como Natrosol de la marca Hercules; cuya masa molar fue determinada en este trabajo por el método de viscosidad intrínseca resultando en 335 000 g mol⁻¹; c) griseofulvina (GDR) de la marca Sigma-Aldrich sin ninguna purificación adicional, con una masa molar de 352.77 g mol⁻¹; d) α -CD de Wacker con un peso molecular de 972.84 g mol⁻¹. El agua utilizada fue destilada y desionizada con un sistema de osmosis reversa (milli Q, Millipore).

3.2.2. Solubilidad de griseofulvina en mezclas P123-HEC.

Se evaluó la solubilidad de griseofulvina en soluciones poliméricas de P123 y HEC así como sus mezclas a distintas concentraciones y composiciones según el caso. En microtubos con capacidad de 2 mL se agregó aproximadamente 5 mg de griseofulvina y 2 mL de solución, se agitaron por 24 horas a temperatura ambiente; todas las muestras se prepararon por triplicado. A continuación, se centrifugaron

20 min a 14000 rpm y 25 °C, se tomó 1 mL del sobrenadante y se prepararon diluciones con solución etanol/agua a las que se midió la absorbancia a 294 nm en un espectrofotómetro UV-visible Agilent 8453, Germany).

Tabla 3.1. Composición de los sistemas.

Etiqueta	P123 (% m/m)	HEC (% m/m)	α CD (% m/m)
(a)	14	2	0
(b)	14	2	2.5
(c)	14	2	5
(d)	14	2	7
(e)	14	2	10

3.2.3. Formación del hidrogel (P123+HEC+ α CD)

Se prepararon los sistemas descritos en la Tabla 3.1. A partir de soluciones previamente preparadas (soluciones madre) de P123 al 30 % y 40% en agua, de α -CD a 10 %, y de HEC al 4 %. Las mezclas se prepararon por pesada, después se homogeneizaron con ayuda de un vortex y se almacenaron a 4, 25 y 37 °C.

3.2.4. Estudios de liberación

Se prepararon diferentes soluciones y geles con griseofulvina a una concentración de 50 μ g/mL; se llevó a cabo un ensayo de liberación de fármaco a 37°C poniendo porciones aproximadas de 2 mL de las diferentes formulaciones en tubos de ensayos a los que se les añadió 5 mL de tampón fosfato a pH 7 y, a continuación, el conjunto se sometió a movimiento oscilante suave [63]. A tiempos determinados se tomó 1 mL del solución y se repuso con 1 mL de solución tampón fosfato. La cantidad liberada de griseofulvina fue medida por espectrofotometría a 294 nm.

3.3. RESULTADO Y DISCUSIÓN

3.3.1. Solubilidad de griseofulvina en mezclas P123-HEC

La griseofulvina es un fármaco hidrofóbico cuya solubilidad en agua es 25 µg/mL. Utilizando dispersiones de P123 y/o HEC se puede mejorar la solubilidad del fármaco. Ambos polímeros son capaces de solubilizar la GRS, siendo más notable el caso de P123, el cual al aumentar su concentración progresivamente, incrementa la solubilidad de GRS (Tabla 3.2). Cuando se mezclan los polímeros y se disuelve GRS; todas las mezclas tiene la capacidad de aumentar la solubilidad de GRS (Tabla 3.2). Fijando la cantidad de P123 y aumentando la cantidad de HEC se observa un ligero incremento en la capacidad de solubilización. La mezcla compuesta por P123 (12 % m/m)-HEC (0.75 % m/m) es la que presenta la mayor capacidad de solubilización (413 µg/mL), incrementando la solubilidad del fármaco en 19 % comparado con el valor del P123 solo. Los valores encontrados por esta mezcla de polímeros son menores a otros trabajos [64], pero la cantidad de griseofulvina solubilizada es mayor a la cantidad mínima inhibitoria (0.5-2 µg/mL) para dermatofitos [65].

Tabla 3.2. Capacidad de solubilización de soluciones poliméricas de P123 y/o HEC.

P123 (% m/m)	HEC (% m/m)	Solubilidad (µg/mL)
8	-	232 ± 39
12	-	345 ± 10
-	1	66 ± 4
6	0.25	290 ± 36
4	0.5	277 ± 27
2	0.75	252 ± 32
9	0.25	243 ± 13
6	0.5	335 ± 7
3	0.75	89 ± 4
8	0.25	161 ± 3
8	0.5	181 ± 2
8	0.75	210 ± 43
8	1	184 ± 11
12	0.25	365 ± 5
12	0.5	387 ± 7
12	0.75	413 ± 13
12	1	370 ± 61

3.3.2. Formación del hidrogel supramolecular (P123+HEC+ α -CD)

Comúnmente los tensoactivos y los fármacos anfífilos pueden interactuar con los polímeros de celulosa, causando una separación de fases asociativa [1, 66, 67]. Entre los éteres de celulosa, el HEC es el menos propenso a interactuar debido a la rigidez de su esqueleto. A pesar de que ambos polímeros tienen óxidos de etileno altamente hidrofílicos, la mezcla presenta separación de fases (Figura 3.1 (a)). En un estudio previo de una mezcla F127 con HEC (0.5 %) [68], no se presentó la separación de fases; probablemente porque la temperatura de estudio está por encima de la que se requiere para su gelificación.

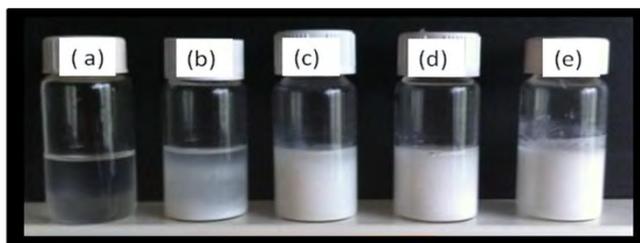


Figura 3.1. Apariencia de la mezcla P123 (14 % m/m) + HEC (2 % m/m) preparadas con diferentes cantidades de α CD: (a) 0, (b) 2.5, (c) 5, (d) 7, (e) 10 % m/m, después de 24 h de almacenamiento a temperatura ambiente.

Una manera de modificar la viscosidad de los copolímeros tribloque es con la adición de α CD. Una solución con estos dos componentes lleva a la formación de poli(pseudorotaxanos) una estructura supramolecular en la que las cadenas de óxido de etileno del copolímero entran en la cavidad de la ciclodextrina [69-73]; haciendo que la solución se vuelva turbia. También se han estudiado mezclas de derivados de celulosa con ciclodextrinas, mostrando un aumento en la viscosidad de la solución y/o promoviendo la formación de soluciones homogéneas[66, 74].

Se estudió el efecto de α CD en la mezcla P123+HEC a diferentes composiciones. Se evaluó la formación del gel por medio de la prueba de tubo invertido [71]. La adición de α CD a las soluciones hace que rápidamente cambie a color blanquiczo, lo que nos indica la rápida formación de poli(pseudo)rotaxanos [75]. Conforme la cantidad de α CD aumenta, la formación de gel aumenta (Figura 3.1). La mezcla con 2.5, 5 o 10 % m/m permanece en una sola fase a 4°C o a temperatura ambiente; mientras que a 37 °C se observa una rápida separación de fases, excepto para la mezcla con

10 % m/m de α CD. A las 48 h de almacenamiento no se observan cambios significativos; solo la mezcla con 5 % m/m de α CD presenta separación de fase a temperatura ambiente, pero a temperatura 4°C se mantiene en una sola fase. Este efecto también fue observado por Travelet et al [72]. Quienes explican que la interacción entre α CD a lo largo de los segmentos PEO del copolímero, así como la interacción entre poli(pseudo)rotaxanos se ve favorecida a bajas temperaturas. Por lo tanto a 4°C la interacción de α CD con ambos polímeros puede predominar sobre la interacción P123-HEC y se obtiene un gel de una sola fase. El gel preparado con 10 % m/m de α CD permanece en una sola fase hasta por un mes a temperatura ambiente. Los resultados se muestran en la Tabla 3.3 y un esquema de las diferentes interacciones entre los componentes se muestra en la Figura 3.2.

Tabla 3.3. Fases observada en las mezclas P123 (14 %) + HEC (2 %) con diferentes cantidades de α CD.

α CD (% m/m)	24h			48h			1 semana		
	4 °C	25 °C	37 °C	4 °C	25 °C	37 °C	4 °C	25 °C	37 °C
0	Sol	2 fases	2 fases	2 fases					
2.5	3 fases	2 fases	2 fases	3 fases	3 fases	2 fases	3 fases	3 fases	2 fases
5	Gel	2 fases	2 fases	gel	2 fases	2 fases	gel	2 fases	2 fases
7	gel	Sol	2 fases	gel	sol	2 fases	gel	2 fases	2 fases
10	gel	Sol	gel	gel	sol	gel	gel	sol	gel

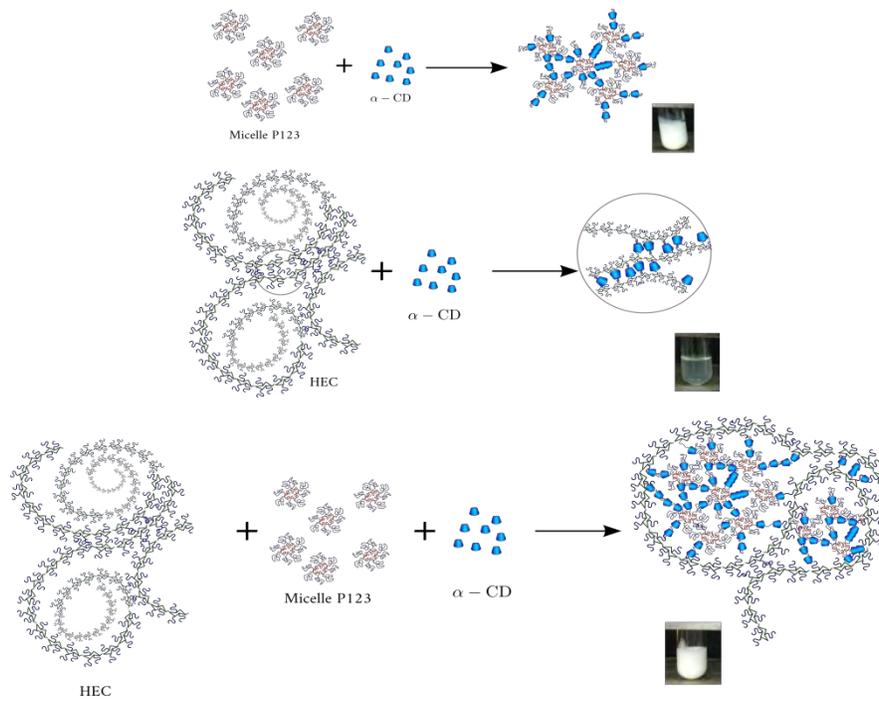


Figura 3.2. Representación esquemática de las diferentes interacciones entre α CD con P123 y HEC.

3.3.3. Liberación de griseofulvina

Se evaluó la liberación del fármaco de las dispersiones poliméricas y el gel formado, previamente cargado con (50 μ g/mL) en buffer fosfato a pH 7.4 a 37 °C. Los resultados se encuentran en la Figura 3.3. Las soluciones poliméricas de P123 y HEC no pueden sostener la liberación del fármaco; debido a la baja viscosidad de las soluciones que permiten la rápida difusión de la solución en el medio. De igual manera la mezcla de los polímeros P123+HEC no puede sostener la liberación como se muestra en la Figura 3.3. Pero al combinar cualquiera de las soluciones de P123 y HEC con α CD se logra retener la liberación. En el caso particular de la mezcla HEC+ α CD se observa una rápida liberación en las primeras horas y después logra sostener la liberación por nueve días. Para la mezcla P123+ α CD donde existe la formación de poli(pseudo)rotaxanos, las nuevas estructuras formadas dan una coloración blanca al gel (Figura 3.2). Estos geles logran una liberación a baja velocidad que se mantiene por más de un mes. Debido al nuevo acomodo que sufren las estructuras en la mezcla (Figura 3.2) el cual se refuerza a 37 °C, el fármaco encuentra dificultades para salir de la red.

En el sistema ternario P123+HEC+ α CD el gel formado sostiene la liberación de GRS, siendo la cantidad liberada mayor que para el gel P123+ α CD. El resultado que tiene el incorporar HEC se puede explicar en dos efectos: por un lado la presencia de HEC contribuye al desorden de la red cristalina de los poli(pseudo)rotaxanos, abriendo y facilitando un poco la salida del fármaco. Por el otro lado HEC contribuye al incremento del carácter hidrofílico del gel que facilita la entrada y salida del medio.

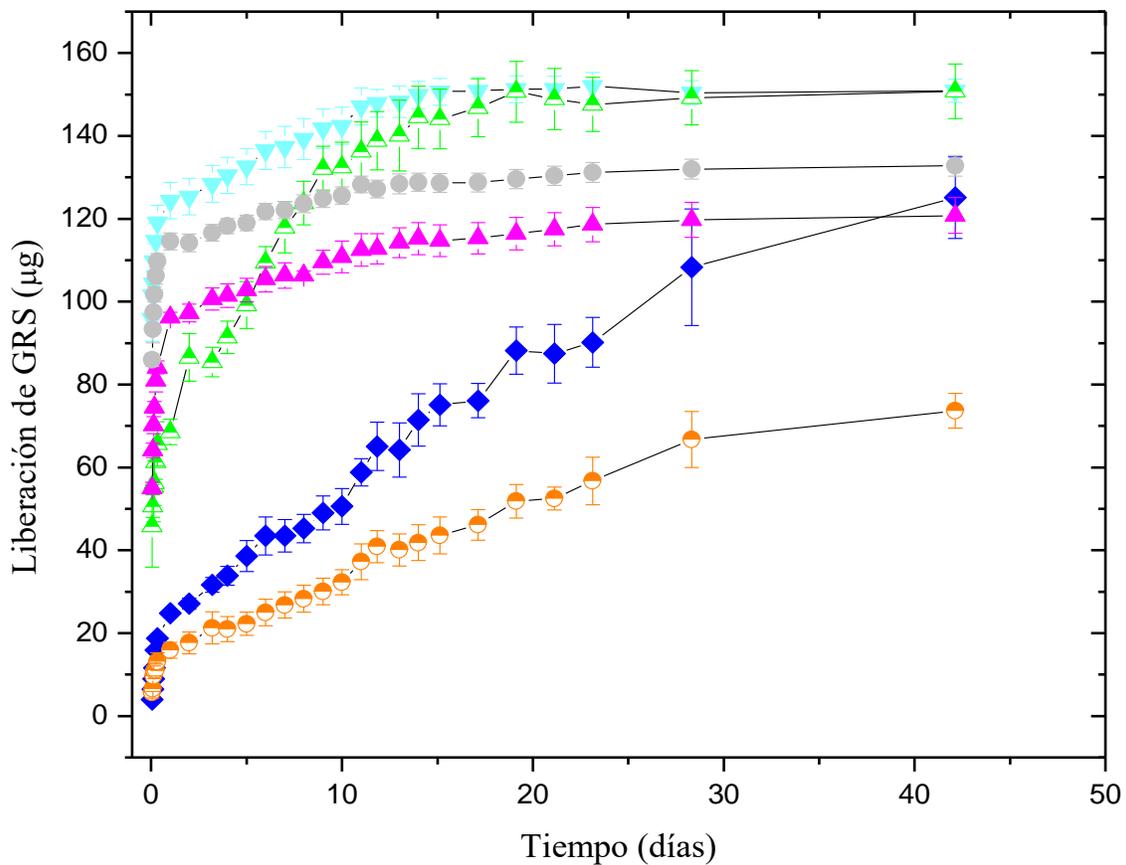


Figura 3.3. Liberación de griseofulvina a 37 °C de (●) P123 (14 %), (▲) HEC (2%), (▼) P123 (14 %) + HEC (2 %), (▲) HEC (2 %) + α CD (10 %), (○) P123 (14 %) + α CD (10 %), (◆) P123 (14 %) + HEC (2 %) + α CD (10 %).

3.4. CONCLUSIONES

La ciclodextrina no es capaz de solubilizar a la griseofulvina. La combinación de P123 con HEC mejora la solubilidad en agua de la griseofulvina.

La incorporación α CD a la mezcla binaria permite la formación de un gel supramolecular estable. El entrecruzamiento de α CD a lo largo de HEC y con el segmento PEO de P123, favorece la interacción de la red del gel, evitando la separación de fases y aumentando su viscosidad.

Los geles supramoleculares P123+ α CD y P123+HEC+ α CD tienen mejores características de viscosidad que las que presentan las soluciones poliméricas de P123 y HEC individuales.

Estos geles son capaces de mantener la liberación de griseofulvina por al menos 30 días, por lo que son muy prometedores en aplicaciones tópicas o mucosas.

4. REFERENCIAS

- [1] J.C.T. Kwak, *Polymer-Surfactant Systems*, CRC Press, New York, 1998.
- [2] K.J. Holberg, B.; Kronberg, B.; Lindman, B., *Surfactant and Polymers in Aqueous Solution*, 2da. ed., England 2002.
- [3] P.L. Hansson, B., Surfactant-polymer interactions, *Curr Opin Colloid In*, 1 (1996) 604-613.
- [4] E.D. Goddard, Polymer/Surfactant Interaction: Interfacial Aspects, *J. Colloid Interface Sci.*, 256 (2002) 228-235.
- [5] S. Saito, in *Nonionic Surfactants:Physical Chemistry*, in: M.J. Schick (Ed.), Marcel Dekker, New York, 1987.
- [6] D.J.F. Taylor, R.K. Thomas, J. Penfold, Polymer/surfactant interactions at the air/water interface, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 132 (2007) 69-110.
- [7] M.N. Jones, Interaction of Sodium Dodecyl Sulfate with Polyethylene Oxide, *J. Colloid Interface Sci.*, 23 (1967) 36-&.
- [8] K.E. Lewis, C.P. Robinson, Interaction of Sodium Dodecyl Sulfate with Methyl Cellulose and Polyvinyl Alcohol, *J. Colloid Interface Sci.*, 32 (1970) 539-&.
- [9] H. Arai, M. Murata, K. Shinoda, Interaction between Polymer and Surfactant - Composition of Complex between Polyvinylpyrrolidone and Sodium Alkyl Sulfate as Revealed by Surface Tension, Dialysis, and Solubilization, *J. Colloid Interface Sci.*, 37 (1971) 223-&.
- [10] M.J. Schwuger, Mechanism of Interaction between Ionic Surfactants and Polyglycol Ethers in Water, *J. Colloid Interface Sci.*, 43 (1973) 491-498.
- [11] Y.Q. Zhang, T. Tanaka, M. Shibayama, Super-Absorbency and Phase-Transition of Gels in Physiological Salt-Solutions, *Nature*, 360 (1992) 142-144.
- [12] A.L. Kjoniksen, K.D. Knudsen, B. Nystrom, Phase separation and structural properties of semidilute aqueous mixtures of ethyl(hydroxyethyl)cellulose and an ionic surfactant, *Eur Polym. J.*, 41 (2005) 1954-1964.
- [13] E. Hoff, B. Nystrom, B. Lindman, Polymer-surfactant interactions in dilute mixtures of a nonionic cellulose derivative and an anionic surfactant, *Langmuir*, 17 (2001) 28-34.
- [14] B. Nystrom, B. Lindman, Dynamic and Viscoelastic Properties during the Thermal Gelation Process of a Nonionic Cellulose Ether Dissolved in Water-in the Presence of Ionic Surfactants, *Macromolecules*, 28 (1995) 967-974.
- [15] M.N. Jones, Dye Solubilization by a Polymer-Surfactant Complex, *J. Colloid Interface Sci.*, 26 (1968) 532-&.
- [16] P. Raffa, A.A. Broekhuis, F. Picchioni, Polymeric surfactants for enhanced oil recovery: A review, *J. Petrol. Sci. Eng.*, 145 (2016) 723-735.
- [17] G. Karlstroem, A. Carlsson, B. Lindman, Phase diagrams of nonionic polymer-water systems: experimental and theoretical studies of the effects of surfactants and other cosolutes, *J. Phys. Chem.*, 94 (1990) 5005-5015.
- [18] P. Alexandridis, T.A. Hatton, Poly(Ethylene Oxide)-Poly(Propylene Oxide)-Poly(Ethylene Oxide) Block-Copolymer Surfactants in Aqueous-Solutions and at Interfaces - Thermodynamics, Structure, Dynamics, and Modeling, *Colloid Surface A*, 96 (1995) 1-46.
- [19] K. Mortensen, Structural studies of aqueous solutions of PEO-PPO-PEO triblock copolymers, their micellar aggregates and mesophases; A small-angle neutron scattering study, *J Phys. Condens. Matter*, 8 (1996) A103-A124.

- [20] P. Alexandridis, J.F. Holzwarth, Differential scanning calorimetry investigation of the effect of salts on aqueous solution properties of an amphiphilic block copolymer (Ploxamer), *Langmuir*, 13 (1997) 6074-6082.
- [21] S. Couderc, Y. Li, D.M. Bloor, J.F. Holzwarth, E. Wyn-Jones, Interaction between the nonionic surfactant hexaethylene glycol mono-n-dodecyl ether (C12EO6) and the surface active nonionic ABA block copolymer pluronic F127 (EO97PO69EO97)-formation of mixed micelles studied using isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry, *Langmuir*, 17 (2001) 4818-4824.
- [22] C. Allen, D. Maysinger, A. Eisenberg, Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery, *Colloid Surf. B*, 16 (1999) 3-27.
- [23] H.W. Tsui, J.H. Wang, Y.H. Hsu, L.J. Chen, Study of heat of micellization and phase separation for Pluronic aqueous solutions by using a high sensitivity differential scanning calorimetry, *Colloid Polym. Sci.*, 288 (2010) 1687-1696.
- [24] A.B.E. Attia, Z.Y. Ong, J.L. Hedrick, P.P. Lee, P.L.R. Ee, P.T. Hammond, Y.Y. Yang, Mixed micelles self-assembled from block copolymers for drug delivery, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 16 (2011) 182-194.
- [25] A.L. Kjoniksen, B. Nystrom, B. Lindman, Dynamic viscoelasticity of gelling and nongelling aqueous mixtures of ethyl(hydroxyethyl)cellulose and an ionic surfactant, *Macromolecules*, 31 (1998) 1852-1858.
- [26] A. Dal Bo, B. Schweitzer, A.C. Felipe, D. Zanette, B. Lindman, Ethyl(hydroxyethyl)cellulose-sodium dodecanoate interaction investigated by surface tension and electrical conductivity techniques, *Colloid Surf. A*, 256 (2005) 171-180.
- [27] R. Lund, R.A. Lauten, B. Nystrom, B. Lindman, Linear and nonlinear viscoelasticity of semidilute aqueous mixtures of a nonionic cellulose derivative and ionic surfactants, *Langmuir*, 17 (2001) 8001-8009.
- [28] R. Tanaka, J. Meadows, P.A. Williams, G.O. Phillips, Interaction of Hydrophobically Modified (Hydroxyethyl)Cellulose with Various Added Surfactants, *Macromolecules*, 25 (1992) 1304-1310.
- [29] G.Q. Zhao, S.B. Chen, Clouding and phase behavior of nonionic surfactants in hydrophobically modified hydroxyethyl cellulose solutions, *Langmuir*, 22 (2006) 9129-9134.
- [30] K. Thuresson, B. Lindman, B. Nyström, Effect of Hydrophobic Modification of a Nonionic Cellulose Derivative on the Interaction with Surfactants. *Rheology*, *J. Phys. Chem. B*, 101 (1997) 6450-6459.
- [31] M. Novelo-Torres, J. Gracias-Fradrique, Concentración micelar crítica mediante la ecuación de adsorción de Gibbs, *Educación Química*, XVI (2005) 63-67.
- [32] A.F.H. Ward, L. Tordai, Time-Dependence of Boundary Tensions of Solutions I. The Role of Diffusion in Time-Effects, *J. Chem. Phys.*, 14 (1946) 453-461.
- [33] J.L. McNaught.n, C.T. Mortimer, *Calorimetría Diferencial de Barrido*, Perkin Elmer Co., Norwalk, CT., 1975, pp. 6-26.
- [34] D. Lof, A. Niemiec, K. Schillen, W. Loh, G. Olofsson, A calorimetry and light scattering study of the formation and shape transition of mixed micelles of EO20PO68EO20 triblock copolymer (P123) and nonionic surfactant (C12EO6), *J. Phys. Chem. B*, 111 (2007) 5911-5920.
- [35] P. Alexandridis, J.F. Holzwarth, T.A. Hatton, Micellization of Poly(Ethylene Oxide)-Poly(Propylene Oxide)-Poly(Ethylene Oxide) Triblock Copolymers in Aqueous-Solutions - Thermodynamics of Copolymer Association, *Macromolecules*, 27 (1994) 2414-2425.
- [36] P. Alexandridis, T. Nivaggioli, T.A. Hatton, Temperature Effects on Structural-Properties of Pluronic P104 and F108 Peo-Ppo-Peo Block-Copolymer Solutions, *Langmuir*, 11 (1995) 1468-1476.
- [37] G. Gaucher, P. Satturwar, M.C. Jones, A. Furtos, J.C. Leroux, Polymeric micelles for oral drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 76 (2010) 147-158.

- [38] A.V. Kabanov, E.V. Batrakova, V.Y. Alakhov, Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery, *J. Control Release*, 82 (2002) 189-212.
- [39] U. Kedar, P. Phutane, S. Shidhaye, V. Kadam, Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting, *Nanomedicine*, 6 (2010) 714-729.
- [40] N. Nishiyama, K. Kataoka, Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery, *Pharmacol. Ther.*, 112 (2006) 630-648.
- [41] N. Rapoport, Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery, *Prog. Polym. Sci.*, 32 (2007) 962-990.
- [42] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50 (2000) 27-46.
- [43] A. Sosnik, M.M. Raskin, Polymeric micelles in mucosal drug delivery: Challenges towards clinical translation, *Biotechnol. Adv.*, 33 (2015) 1380-1392.
- [44] A.S. Hoffman, Hydrogels for biomedical applications, *Adv Drug Deliver Rev*, 54 (2002) 3-12.
- [45] B. Jeong, S.W. Kim, Y.H. Bae, Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels, *Adv. Drug Deliver Rev.*, 54 (2002) 37-51.
- [46] X. Marcos, S. Perez-Casas, J. Llovo, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, Poloxamer-hydroxyethyl cellulose- α -cyclodextrin supramolecular gels for sustained release of griseofulvin, *Int. J. Pharm.*, 500 (2016) 11-19.
- [47] G. Wanka, H. Hoffmann, W. Ulbricht, The Aggregation Behavior of Poly-(Oxyethylene)-Poly-(Oxypropylene)-Poly-(Oxyethylene)-Block-Copolymers in Aqueous-Solution, *Colloid Polym. Sci.*, 268 (1990) 101-117.
- [48] M.A. Linares-Alba, M.B. Gomez-Guajardo, J.F. Fonzar, D.E. Brooks, G.A. Garcia-Sanchez, M.J. Bernad-Bernad, Preformulation Studies of a Liposomal Formulation Containing Sirolimus for the Treatment of Dry Eye Disease, *J. Ocular Pharmacol. Ther.*, 32 (2016) 11-22.
- [49] M.A. Martínez, Cinética de adsorción del líquido iónico HmimCl, Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México, 2013, pp. 23.
- [50] G.O. Hernández-Segura, Determinación experimental, modelaje e interpretación de las capacidades térmicas molares aparentes de disoluciones acuosas de -mon, -di, tri y oligosacáridos en el intervalo de temperatura 288.15-342.15 K., Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM, México, 2014, pp. 60.
- [51] C.J. Martínez-Galicia, Caracterización fisicoquímica de la nanoencapsulación de ibuprofeno en vesículas mixtas de liposomas de 1- α -dipalmitoil-fosfatidilcolina (dppc) y n-nonil-beta-d-glucopiranosido (ngp). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2016, pp. 23.
- [52] J. Djuve, R.J. Pugh, J. Sjoblom, Foaming and dynamic surface tension of aqueous polymer/surfactants solutions 1: ethyl(hydroxyethyl) cellulose and sodium dodecyl sulphate, *Colloid Surf. A*, 186 (2001) 189-202.
- [53] I. Nahrungbauer, Dynamic surface tension of aqueous polymer solutions .1. Ethyl(hydroxyethyl)cellulose (BERMOCOLL cst-103), *J. Colloid Interface Sci.*, 176 (1995) 318-328.
- [54] B. Naskar, S. Ghosh, S.P. Moulik, Interaction of normal and reverse pluronics (L44 and 10R5) and their mixtures with anionic surfactant sodium N-dodecanoylsarcosinate, *J. Colloid Interface Sci.*, 414 (2014) 82-89.
- [55] A. Goswami, P.A. Hassan, S.S. Bhagwat, Static and dynamic surface tension behaviour of a triblock copolymer and a non ionic surfactant mixture, *Colloid Surf. A*, 489 (2015) 190-196.
- [56] A.G. Dal-Bo, R. Laus, A.C. Felipe, D. Zanette, E. Minatti, Association of anionic surfactant mixed micelles with hydrophobically modified ethyl(hydroxyethyl)cellulose, *Colloid Surf. A*, 380 (2011) 100-106.

- [57] I. Pepic, J. Filipovic-Grcic, I. Jalsenjak, Interactions in a nonionic surfactant and chitosan mixtures, *Colloid Surf. A*, 327 (2008) 95-102.
- [58] L.A. Tellez, L.M. Blancas-Mejia, E. Carrillo-Nava, G. Mendoza-Hernandez, D.A. Cisneros, D.A. Fernandez-Velasco, Thermal Unfolding of Triosephosphate Isomerase from *Entamoeba histolytica*: Dimer Dissociation Leads to Extensive Unfolding, *Biochemistry*, 47 (2008) 11665-11673.
- [59] R.C. da Silva, G. Olofsson, K. Schillen, W. Loh, Influence of ionic surfactants on the aggregation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymers studied by differential scanning and isothermal titration calorimetry, *J. Phys. Chem. B*, 106 (2002) 1239-1246.
- [60] J. Jansson, K. Schillen, G. Olofsson, R.C. da Silva, W. Loh, The interaction between PEO-PPO-PEO triblock copolymers and ionic surfactants in aqueous solution studied using light scattering and calorimetry, *J. Phys. Chem. B*, 108 (2004) 82-92.
- [61] I. Patterson, B.Z. Chowdhry, S. Leharne, Evaluation of surfactant monomer concentrations in equilibrium with micelles and their temperature dependence for oxyethylene/oxypropylene/oxyethylene triblock copolymers using DSC, *Colloid Surf. A*, 111 (1996) 213-222.
- [62] J. Bhattacharjee, G. Verma, V.K. Aswal, V. Patravale, P.A. Hassan, Microstructure, drug binding and cytotoxicity of Pluronic P123–aerosol OT mixed micelles, *RSC Adv.*, 3 (2013) 23080-23089.
- [63] M.I. Rial-Hermida, N.M. Oliveira, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, J.F. Mano, Bioinspired superamphiphobic surfaces as a tool for polymer- and solvent-independent preparation of drug-loaded spherical particles, *Acta biomateria*, 10 (2014) 4314-4322.
- [64] C. Alvarez-Lorenzo, J. Gonzalez-Lopez, M. Fernandez-Tarrio, I. Sandez-Macho, A. Concheiro, Tetronic micellization, gelation and drug solubilization: Influence of pH and ionic strength, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 66 (2007) 244-252.
- [65] A.K. Gupta, J.V. Williams, M. Zaman, J. Singh, In vitro pharmacodynamic characteristics of griseofulvin against dermatophyte isolates of *Trichophyton tonsurans* from tinea capitis patients, *Med. Mycol.*, 47 (2009) 796-801.
- [66] V. Wintgens, S. Daoud-Mahammed, R. Gref, L. Bouteiller, C. Amiel, Aqueous polysaccharide associations mediated by beta-cyclodextrin polymers, *Biomacromolecules*, 9 (2008) 1434-1442.
- [67] R. Rodriguez, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, Interactions of ibuprofen with cationic polysaccharides in aqueous dispersions and hydrogels. Rheological and diffusional implications, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 20 (2003) 429-438.
- [68] A.L. Kjoniksen, M.T. Calejo, K.Z. Zhu, B. Nystrom, S.A. Sande, Stabilization of Pluronic Gels in the Presence of Different Polysaccharides, *J. Appl. Polym. Sci.*, 131 (2014) 40465.
- [69] A. Harada, J. Li, M. Kamachi, Preparation and Properties of Inclusion Complexes of Poly(Ethylene Glycol) with Alpha-Cyclodextrin, *Macromolecules*, 26 (1993) 5698-5703.
- [70] C. Pradal, K.S. Jack, L. Grondahl, J.J. Cooper-White, Gelation kinetics and viscoelastic properties of pluronic and alpha-cyclodextrin-based pseudopolyrotaxane hydrogels, *Biomacromolecules*, 14 (2013) 3780-3792.
- [71] S.M.N. Simoes, F. Veiga, J.J. Torres-Labandeira, A.C.F. Ribeiro, M.I. Sandez-Macho, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, Syringeable Pluronic-alpha-cyclodextrin supramolecular gels for sustained delivery of vancomycin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 80 (2012) 103-112.
- [72] C. Travelet, G. Schlatter, P. Hebraud, C. Brochon, A. Lapp, G. Hadziioannou, Formation and Self-Organization Kinetics of alpha-CD/PEO-Based Pseudo-Polyrotaxanes in Water. A Specific Behavior at 30 degrees C, *Langmuir*, 25 (2009) 8723-8734.
- [73] Y. Yang, C.P. Tsui, C.Y. Tang, S. Qiu, Q. Zhao, X. Cheng, Z. Sun, R.K.Y. Li, X. Xie Functionalization of carbon nanotubes with biodegradable supramolecular polypseudorotaxanes from grafted-poly(ϵ -caprolactone) and α -cyclodextrins *Eur. Polym. J.*, 46 (2010) 145-155.

- [74] N. Beheshti, K. Zhu, A.L. Kjoniksen, B. Nystrom, Effects of beta-cyclodextrin and beta-cyclodextrin polymer addition and temperature on the modulation of hydrophobic interactions in aqueous solutions of two hydrophobically modified biopolymers, *J Non-Cryst Solids*, 353 (2007) 3906-3914.
- [75] J. Shen, X. Xin, Y. Zhang, L. Song, L. Wang, W. Tang, Y. Ren, Manipulation the behavior of supramolecular hydrogels of alpha-cyclodextrin/star-like block copolymer/carbon-based nanomaterials, *Carbohydr. Polym.*, 117 (2015) 592-599.
- [76] M.A. Martínez, Interacciones entre proteínas y polisacáridos y su comportamiento superficial en medio acuoso., Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2010, pp. 26.
- [77] F.D. Sandoval, Tensión superficial dinámica de complejos de inclusión α -cilcodextrina + tensoactivo no iónico en medio acuoso. , Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México, 2011, pp. 27.

5. ANEXOS

5.1. Publicaciones

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.elsevier.com/locate/jcs)



Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcs



Interactions between a triblock copolymer and hydroxyethyl cellulose in aqueous solution and their use in the solubilization of Amiodarone

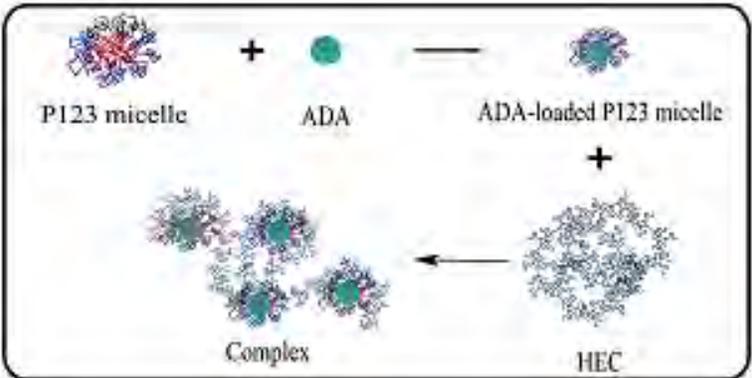
Xelhua Marcos, Ernesto Carrillo-Nava, Silvia Pérez-Casas*

Laboratorio de Biofarmacología, Departamento de Farmacología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., D.C. 045, México

HIGHLIGHTS

- Adding HEC to P123 solution promotes the appearance of CAC, C₁ and CAC₁.
- P123-drug interaction is strong and reduces the micellar size.
- DSC shows that drug-loaded P123 micelles interact more with HEC than the empty ones.
- HEC associates ADA-loaded P123 micelles, providing the drug with a double encapsulation shell.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 January 2016
Received in revised form 17 May 2016
Accepted 20 May 2016
Available online 24 May 2016

Keywords:
Phenylethanolamine
Triblock copolymer
Amiodarone solubilization
Critical micelle temperature
Critical aggregation concentration
Enthalpy of aggregation

ABSTRACT

A physicochemical characterization of the mixtures of triblock copolymer PEO₂₀-PPO₁₀-PEO₂₀ (P123) and hydroxyethyl cellulose (HEC) in aqueous solutions, with and without the hydrophobic drug amiodarone (ADA), was performed by pendant drop tensiometry, differential scanning calorimetry (DSC) and dynamic light scattering (DLS). The results allowed us to propose a detailed diagram for the formation of the different aggregates in water. The equilibrium surface tension values showed that adding HEC to P123 solutions promotes the aggregation of the P123 monomers on the HEC polymer until saturation. By adding ADA into the P123 micelles, the same equilibrium surface tension values were obtained as the ones found in the pure solution of P123. This suggests that the drug is mostly encapsulated. The DSC experiments showed that the critical micelle temperature and the enthalpy of aggregation of P123 were not modified by the presence of HEC, but the incorporation of ADA to the micelles showed a reduction of 40% in the enthalpy of aggregation, indicating a strong interaction between P123 and ADA. In contrast to the empty micelles, when HEC is added to the loaded micelles, the enthalpy of aggregation increases and the interaction of HEC-P123 becomes evident. The DLS results suggest that the hydrodynamic diameter of the ADA-loaded micelles is 17% smaller than the diameter of the empty P123 micelles. In the presence of HEC, the empty or loaded micelles form a larger complex. This suggests that HEC surrounds the micelles and provides the drug with a second protecting shell. This system could be a good candidate for the hydrophobic drug delivery.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mixtures of polymers and surfactants play an important role in several industrial applications, for instance in personal care and pharmaceutical products, detergents and foams [1–3]. Polymer–surfactant interactions have fundamental importance for understanding the behavior of their mixtures, in which the surfactant binds to polymer up to the saturation point forming different nanostructures that can be changed by their composition [4–7]. These structures change the original behavior of individual constituents, such as the rheological properties, appearance, and improve the stability of dispersions [8–10]. The possible formation of different nanostructures makes them prospective vehicles for the drug and gene delivery [11–15]. In this respect, a detailed knowledge on their formation, structure and properties is desirable. We have been working with different systems designed to nanoencapsulate hydrophobic drugs that include cyclodextrins and polymer–surfactant complexes [16–18]. We continue testing this kind of complexes in the same research line.

Hydroxyethyl cellulose (HEC) is a non-ionic amphiphilic cellulose derivative polymer, which shows a lower critical solution temperature [9]. HEC is characterized by a mixture of hydrophobic and hydrophilic structural units distributed along the polymer backbone. This arrangement leads to a complex structure with an irregular distribution of hydrophobic microdomains, and interactions between polymer chains [19]. This polymer has been widely studied in combination with ionic surfactants such as sodium dodecyl sulfate [8,20,21], sodium dodecanoate [22,23] and cetyltrimethylammonium bromide [24], as well as non-ionic surfactants such as polyethoxylates [25,26], tritons [27] and poloxamers [10,28]. In these mixtures, it has been suggested that the alkyl chains of the surfactant molecules interact with the hydrophobic domains of the polymer, increasing the intermolecular association through a “bridging-type” mechanism [25], with weak non-ionic polymer–surfactant interactions [29], forming mixed clusters that may include substituents from more than one polymer chain [9,19].

The triblock copolymers of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide), PEO–PPO–PEO, are examples of nonionic surfactants that form polymeric spherical micelles in water solution. They are also called pluronics or poloxamers. The polymeric micelles formed have a PPO hydrophobic core protected from the surrounding water by a water swollen PEO layer [30–34]. Their aggregation processes, at a specific concentration, start at a critical micellar temperature (CMT) and it is mainly entropy driven [35–38]. The ΔH for this process can be measured by differential scanning calorimetry (DSC). In this kind of experiments, when the temperature is raised, the hydrophobicity of the PPO and PEO groups increases, which is most likely due to the change of the segments conformation [34,38]. The main feature of these kinds of systems includes their capacity to solubilize hydrophobic compounds and their release in a controlled form. These characteristics have made poloxamer micelles very promising vehicles for drug delivery [13,39–41]. However, when the polymeric micelles are exposed to physiological media, they tend to disaggregate. Taking this phenomenon into consideration,

the triblock polymers have been mixed with other polymers to delay this effect [10,42].

A technique that has been used in the study of the surfactant–polymer mixtures is the surface tension, which is a useful tool that allows to study the air/solution interface and with which the patterns of behavior of the mixture have been established [43,44]. In this work, tensiometry, DSC and dynamic light scattering (DLS) were used to study the effect of adding HEC to the triblock copolymer PEO₂₀–PPO₇₀–PEO₂₀ (P123) in aqueous solutions. We selected these compounds because they are biodegradable, biocompatible and they have a low toxicity. The results indicate that HEC and P123 form aggregates that are concentration-dependent. These mixtures were tested to nanoencapsulate amiodarone (ADA), a hydrophobic [45] and antiarrhythmic drug found to be active against a neglected tropical disease [46].

2. Materials and methods

2.1. Materials

The triblock copolymer of average composition PEO₂₀–PPO₇₀–PEO₂₀ (P123) was purchased from Aldrich and used without further purification. The molar mass reported by the supplier is 5750 g mol⁻¹. The hydroxyethyl cellulose (HEC) (Natrosol 250 GR) was supplied by Hercules, Aqualon Division and its molar mass was determined in this work by using the intrinsic viscosity method, resulting in a value of 335000 g mol⁻¹. The amiodarone hydrochloride (pharmaceutical grade) was obtained from Parafarm and was used without further purification. The molar mass reported by the supplier is 681.77 g mol⁻¹. The aqueous solutions of these polymers were prepared using analytical grade water from a Millipore filtration system (Simplicity) and they were stirred at room temperature for 24 h before each experiment was carried out.

2.2. Amiodarone solubility studies and determination of entrapment efficiency (EE%)

Aqueous solutions of P123 (1, 2.5, 3, 5 and 10 wt.%), and one of HEC (1 wt.%) were used to evaluate the drug solubility. After a weighted amount of amiodarone (about 10 mg) was placed into different vials, aliquots (5 mL) of the aforementioned solutions were added. The systems were kept under stirring at room temperature for 48 h, in triplicate. The saturated solutions samples were filtered with a 0.20 μ m pore size PVDF membrane and placed into a quartz cuvette which was thermostated for 15 min before data acquisition. Control experiments were carried out by only using water. The concentration of the dissolved drug was determined with a UV–vis spectroscopy at 240 nm (UV spectrophotometer, Cary–Bio50 Varian/Agilent, Australia), after an adequate dilution.

The percentage entrapment efficiency (EE%) was determined according to Ref. [47] for the following systems: (P123x+W) with x = 1 and x = 3 wt.%; and (P123x+W)+HECy with x = 1, y = 0.5 wt.%; and x = 3, y = 0.62 wt.%. Briefly, solutions of P123 with ADA were prepared as mentioned above, followed by the addition of solid HEC. After 24 h stirring, complete dissolution was obtained for the mixtures, which were then centrifuged at 14 000g using Amicon Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters with 10 K molecular weight cut off (Millipore Co.) to remove the non-encapsulated drug. ADA concentration was determined from the filtered solution as above. The EE% was calculated as follows:

$$EE\% = \frac{C_{total} - C_{free}}{C_{total}} \times 100$$

Abbreviations: DSC, differential scanning calorimetry; DLS, dynamic light scattering; CAC, critical aggregation concentration; CAC_i, initial interaction concentration; C_s, saturation concentration; CAC_e, extended critical aggregation concentration; ΔH_{agg} , enthalpy of aggregation; T_m, melting temperature; CMT, critical micelle temperature; d_h, hydrodynamic diameter; P123, PEO₂₀–PPO₇₀–PEO₂₀; HEC, hydroxyethyl cellulose; ADA, amiodarone; W, water.

* Corresponding author.

E-mail address: silpeca@unam.mx (S. Pérez-Casas).

Table 1
Composition of the systems studied by dynamic surface tension.

System	P123 / wt.%	HEC / wt.%
(HECy+W) ^a	$x=0$	$y=1 \times 10^{-4}-2$
(P123x+W)	$x=3 \times 10^{-4}-0.5$	$y=0$
(P123x+W)+HECy	$x=5 \times 10^{-4}-0.061$	$y=0.001$
(P123x+W)+HECy	$x=5 \times 10^{-4}-0.03$	$y=0.005$
(P123x+W)+ADA ^b	$x=0.5$	$y=0$
(P123x+W)+ADA ^b +HECy	$x=0.5$	$y=0.005$

^a W=water.

^b Concentration of ADA is 0.16 wt.%.

2.3. Surface tension

The dynamic surface tension of the air/water interface was measured at least three times by using an automatic optical contact angle tensiometer OCA-20 (Dataphysics Instruments, Germany) at 298.15 K. A precision needle with the solution was placed inside a thermostated and transparent cell, for approximately 20 min to reach thermal equilibrium. The profile of the pendant drop at the needle tip was filmed for 5–8 h, backlight lighting was used to enhance the profile. Surface tension was calculated from the digitalized pendant drop profiles and analyzed using the Young-Laplace equation. Table 1 shows the compositions of the different systems studied by dynamic surface tension.

2.4. Intrinsic viscosity

The HEC mean molecular mass was determined by using the intrinsic viscosity and the Mark-Houwink equation, with the constants α (0.82 ± 0.07) and K (1.03×10^{-4}) [48]. To obtain the capillary viscosity, we used a Cannon-Ubbelohde 0 B capillary viscometer (State College, PA USA). All measurements were made at 298.15 K. The concentrations of the different aqueous solutions were from 0.0 to 0.5 wt.%. The molecular mass obtained was $335 \text{ 000 g mol}^{-1}$.

2.5. Differential scanning calorimetry (DSC)

The DSC scans were performed using a VP-DSC from Microcal (Northampton, MA, USA) from 283.15 to 353.15 K with a scan rate of 1 K min^{-1} and an excess pressure of 3 atm applied to the cells during scanning. Prior to the scans, all the solutions were degassed while stirring under vacuum. Water versus water scans were performed prior to systems scans of (P123+W), (P123+W)+HEC, (P123+W)+ADA and (P123+W)+ADA+HEC. The systems scans were measured at least three times in order to check for repeatability. The heat capacity profiles were analyzed after the subtraction of the water versus water scans. The pre- and post-transition baselines were established independently from the linear least squares fits to the data points of the pre- and post-transition regions. Then, a sigmoidal baseline under the transition peak was constructed taking into account the profile of the transition peak and the experimental pre- and post-transition baselines. The calorimetric profiles were analyzed using the software supplied in the equipment (Origin v 7.0) and the enthalpy of aggregation (ΔH_{agg}) was determined by the integration of the area between the peaks and the sigmoidal baseline.

2.6. Dynamic light scattering (DLS)

The hydrodynamic diameters (d_h) of the copolymer aggregates of the different systems were determined through dynamic light scattering using a Nanosizer ZS ZEN (3600) (Malvern Instruments, USA) at a scattering angle of 173° . The samples were filtered with a $0.20 \mu\text{m}$ pore size PVDF membrane and placed into a quartz

Table 2
ADA solubility and EE% in different systems.

System	Solubility / wt.%	EE%
(ADA+W)	0.04	–
(HEC+W)+ADA	0.00	–
(P123x+W)+ADA		
x / wt.%		
1	0.22	64
2.5	0.5	–
3	0.84	94
5	1.20	–
10	2.00	–
(P123x+W)+ADA+HECy		
x / wt.%	y / wt.%	
1	0.5	0.22
3	0.62	0.84
		98
		95

cuvette which was thermostated for 10 min before data acquisition. The measurements were carried out in triplicate at a temperature higher than the CMT for each system, except for the P123 monomers, in which the temperature was kept at 283.15 K. Data were analyzed with the software of the equipment and the d_h was calculated from the Stokes–Einstein equation assuming a spherical geometry.

3. Results and discussion

3.1. Amiodarone solubilization and entrapment efficiency

ADA is a hydrophobic drug with a water solubility of 0.04 wt.%, as determined by UV–vis in this work. Five solutions with an increase in P123 concentration showed a linear increase in ADA solubility (Table 2). On the contrary, a HEC solution (1 wt.%) could not solubilize ADA at all. However, when HEC is added to the (P123+W)+ADA system, a translucent solution is obtained ((P123+W)+ADA+HEC system) which does not alter the aforementioned ADA solubility. The presence of ADA inside the polymeric micelles was confirmed by determining the percentage entrapment efficiency (EE%) in some of these formulations (Table 2). We observed that EE% was not modified by HEC presence in the solution with 3 wt.% P123. In contrast, adding HEC to the 1 wt.% P123 solution increases in ~30% the EE%.

3.2. Surface tension

The behavior of the (P123x+W) and (HECy+W) systems and their mixtures (Table 1) were studied by pendant drop tensiometry at 298.15 K. Fig. 1 shows the equilibrium surface tension as a function of P123 or HEC molar fraction. The profile of pure (P123x+W) shows two breaks in the slope, the first one has been attributed to the transition of the monomers into unimicelles, while the second one has been ascribed to the transition of unimicelles into micelles (critical aggregation concentration, CAC) [30]. After these two breaks, the surface tension remains constant and independent of the concentration. In the case of (HECy+W) at 298.15 K, the surface tension is constant at $60.4 \pm 0.9 \text{ mN m}^{-1}$ in all the concentration range studied and this value is in agreement with that previously reported by Djuve et al. [49]. It is clear that the surface activity (referring to the abatement of the surface tension) for P123 is much bigger than that one for HEC.

The dynamic surface tensions for (P123x+W) at three different concentrations: lower than the CAC ($x=0.001 \text{ wt.}\%$), in the CAC ($x=0.0068 \text{ wt.}\%$) and higher than the CAC ($x=0.02 \text{ wt.}\%$) are shown in Fig. 2(a). Below the CAC, the surface tension diminishes slowly with time. For the concentration in the CAC, the fall in the surface tension is faster, attaining the equilibrium surface tension in 3000 s, where the equilibrium surface tension takes the value

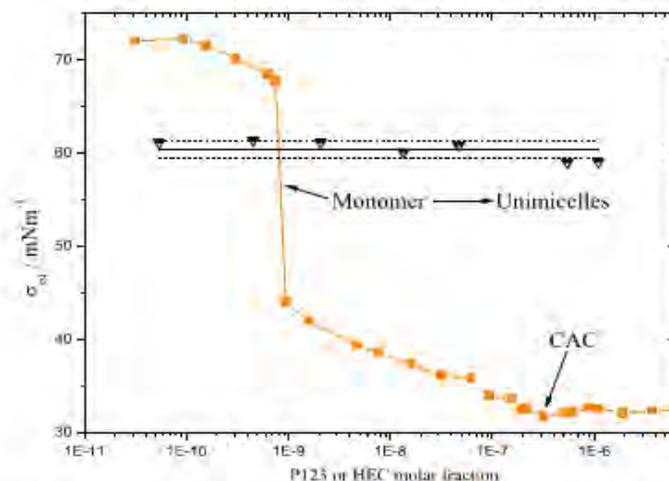


Fig. 1. Equilibrium surface tension (σ_{eq}) for the (P123+W) solution as function of P123 molar fraction (■), error bars are smaller than the symbols used (σ_{eq}) for the (HEC+W) solution as function of HEC molar fraction (▼) at 298.15 K.

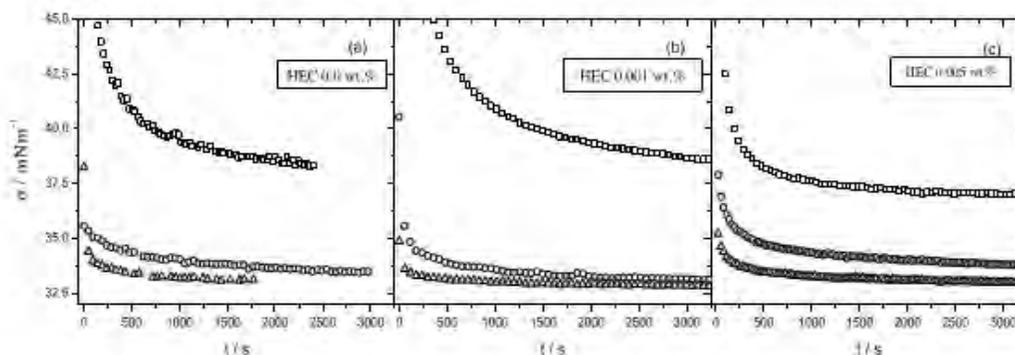


Fig. 2. Dynamic surface tension vs. time for the (P123x+W)+HECy systems, where x is the concentration of P123 lower than the CAC (□, x=0.001 wt%), in the CAC (○, x=0.0068 wt%) and higher than the CAC (Δ, x=0.02 wt%); and y is the HEC concentration and it takes the values of 0.00 wt.% in (a), 0.001 wt.% in (b) and 0.005 wt.% in (c) respectively.

of $32.3 \pm 0.3 \text{ mN m}^{-1}$. At concentrations above the CAC, a slightly decrease in surface tension was observed. Fig. 2(b) shows the (P123x+W)+HECy system with y equal to 0.001 wt.%. A slower decrease in the adsorption kinetics, compared to the system without HEC, was observed when P123 concentration was below its CAC. Also, the equilibrium surface tension took a value higher than P123 alone. This may suggest that the P123 monomers can interact with HEC and that the surface was less occupied with P123 monomers. Fig. 2(b) also shows a fast decrease in the surface tension when the P123 concentration is at the CAC and above the CAC. However, Fig. 2(c) shows that for the solutions of (P123x+W)+HECy with y equal to 0.005 wt.%, it takes longer to attain the equilibrium than with y equal to 0.001 wt.%. This effect suggests an increase in the interaction between HEC and the P123 monomers that form aggregates which decrease the surface activity of the mixture. This behavior has been previously reported for other polymer-surfactant systems [5,50], and it indicates that the surface activity of the polymer-surfactant complex depends on the interaction

between the components and the configuration changes occurring on adsorption. Therefore, an augment in the surface tension appears at lower P123 concentration, when HEC is present.

To obtain the accurate equilibrium surface values (σ_{eq}) from the dynamic surface tension data, we used the long time approximation of the Ward and Tordai equation:

$$\sigma(t) = \sigma_{eq} + \frac{RT\Gamma_{eq}}{C_0} \frac{\pi}{4Dt}$$

where σ_{eq} is the equilibrium surface tension (mN m^{-1}), Γ_{eq} is the equilibrium surface concentration (mol m^{-2}), D represents the diffusion coefficient ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), C_0 is the bulk copolymer concentration (mol m^{-3}), T is the temperature (K), t is the time (s) and R is the gas constant [51]. When $\sigma(t)$ was plotted vs. $t^{-1/2}$, a linear behavior was observed for all the systems over a long time scale and σ_{eq} was obtained from the linear fit [49,52]. Fig. 3 shows an example plot of $\sigma(t)$ vs. $t^{-1/2}$ for the (P123x+W)+HEC [0.005 wt.%) system

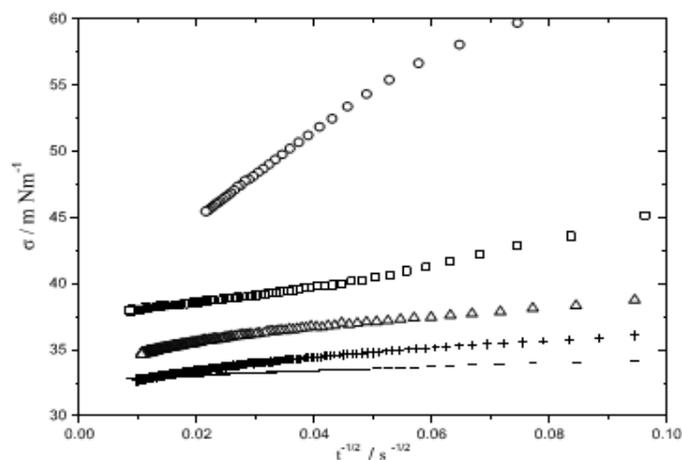


Fig. 3. Dynamic surface tension vs. $t^{-1/2}$ for (P123x+W)+HECy systems, where $y=0.005$ wt.% and x takes the values of 0.00075 wt.% (\circ), 0.002 wt.% (\square), 0.004 wt.% (Δ), 0.006 wt.% ($+$) and 0.015 wt.% ($-$).

at five different P123 concentrations. We observed that the slope is bigger at lower concentrations and that it decreases when the P123 concentration is increased.

With the σ_{eq} values it was possible to construct Fig. 4, which shows the dependence of σ_{eq} on the concentration for the (P123x+W) and (P123x+W)+HECy (with y equal to 0.001 and 0.005 wt.%) systems. The tensiometric profiles for the mixtures show three changes on the slope interpreted as CAC_1 , C_s and CAC_e . These changes are clearer in the representation of σ_{eq} vs P123 molar fraction as shown in Fig. 4. The CAC_1 shows the start of the interaction between the P123 monomers and HEC, causing a change in the equilibrium surface tension. Adding more P123 after the CAC_1 causes a second change in the slope, showing the saturation of the P123-HEC aggregate; this point is called the saturation concentration, C_s . Then, σ_{eq} decreases until it levels off at the same extended critical aggregation concentration called CAC_e (around 0.006 wt.%, P123 molar fraction = 1.88×10^{-7}), in which free micelles are formed. These results agree with those reported for mixtures of triblock copolymers and non-ionic surfactants [53], the interaction between HEC and SDS [23] and the interaction of triblock copolymer-chitosan [54].

The differences between the tensiometric profiles of (P123+W) and (P123+W)+HECy with y equal 0.001 wt.% (Fig. 4) could be attributed to the adsorption of surfactants (P123 monomers) on polymers (HEC) as well as to the interface, as suggested by Goswami et al. [53]. Beyond CAC_1 , HEC are saturated with P123 monomers (C_s) and the reduction in the surface tension arises due to the adsorption at the interface of aggregate. The results in σ_{eq} are bigger compared to the reference system. Adding more P123 monomers causes the σ_{eq} to take values close to those of the reference system in the CAC_e .

The effect of HEC on the reference system is more noticeable in the [(P123+W)+HECy with y equal 0.005 wt.%) system when the P123 concentrations are below C_s . Fig. 4 shows the behavior of this system: it is observed that the value of CAC_1 moves to the right and an abrupt change in the slope is observed between 9.39×10^{-9} and 1.56×10^{-8} P123 molar fraction indicating that the composition of the surface is changing. Adding more P123 after C_s , makes the σ_{eq} take values similar to those of the (P123+W) system. Close to

the CAC_e concentration, the difference between the values of σ_{eq} among the systems is negligible.

Solutions with ADA were also prepared and their σ_{eq} were obtained. As a control, the value of σ_{eq} was the first to be determined of an aqueous solution of ADA at a concentration below its solubility limit ((ADA [0.01 wt.%]+W), $\sigma_{eq}=54$ mNm $^{-1}$). We prepared (P123 [0.5 wt.%]+W)+ADA [1.2 wt.%] and [(P123 [0.5 wt.%]+W)+ADA [1.2 wt.%]+HEC [0.005 wt.%]] systems at P123 concentrations higher than their CAC_e , and an ADA concentration four-fold above its solubility limit. The σ_{eq} obtained are represented in the inset of Fig. 4 and they indicate that the value is practically the same as the one obtained for (P123+W) system at that concentration. This gives further evidence that ADA is nanoencapsulated into the different aggregates formed by P123 and P123+HEC. Otherwise, if ADA molecules were not nanoencapsulated, the σ_{eq} would be different from the (P123+W) system.

3.3. Differential scanning calorimetry

The aim of the calorimetry experiments was to characterize the effect that HEC and ADA have on the energetics of the aggregation process of P123. We evaluated the critical micellar temperature, CMT (the copolymer solution temperature at which micelles start forming); the melting temperature, T_m (the temperature where half of the area associated with the formation of the aggregates is reached) and the formation enthalpy of the aggregates, ΔH_{agg} . The starting point was the DSC measurements of (P123+W) system with the polymer concentration varying between 0.34 and 3.45 wt.%, which is above its CAC (0.006 wt.%). In the second set of experiments, we studied the aggregation phenomenon in systems in which HEC was added at different concentrations to (P123+W) system at a single and fixed P123 concentration. The third set of experiments involves systems composed of P123 at a fixed composition in the presence of the hydrophobic drug ADA, and finally, a fourth set of experiments involves the complete system, i.e. the copolymer with ADA and HEC.

Typical calorimetric traces of (P123+W) at different concentrations show endothermic peaks that indicate the formation of copolymer aggregates, characterized by their T_m 's (Fig. 5(a)). The CMT for P123 was determined from the beginning of the heat tran-

X. Marcos et al. / Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 509 (2016) 86–94

831

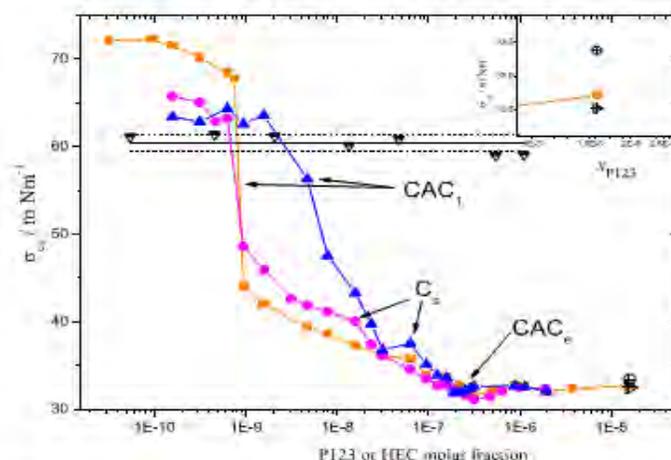


Fig. 4. σ_s data for the different systems: (P123x+W) (■), (P123x+W)+HEC (0.001 wt.%) (●), and (P123x+W)+HEC (0.605 wt.%) (▲). The inset shows the σ_s for (P123 [0.5 wt.%]+W)+ADA (1.2 wt.%) (●) and (P123 [0.5 wt.%]+W)+HEC (0.005 wt.%) (◆).

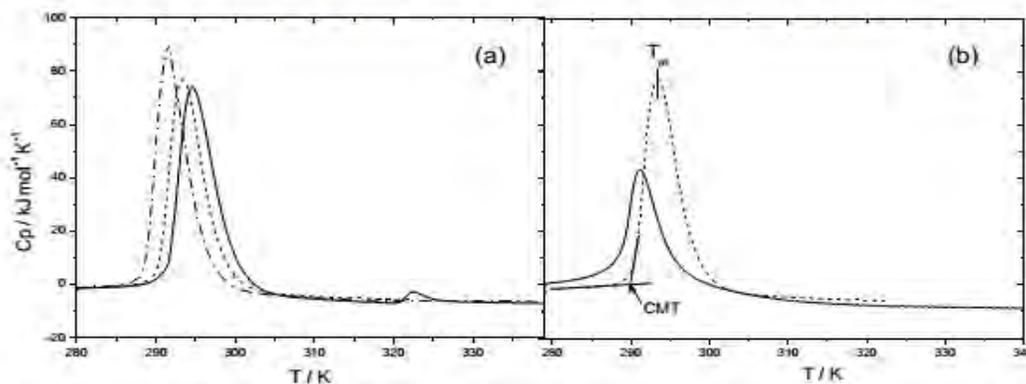


Fig. 5. (a) DSC traces of (P123x+W) where x takes values of 0.58 wt.% (—), 1.00 wt.% (⋯) and 6 wt.% (---). (b) DSC traces of (P123 [1 wt.%]+W) (—) and (P123 [1 wt.%]+W)+ADA (0.23 wt.%) (---). The concentration of P123 is 1.00 wt.% in both cases.

sition due to the aggregation [35]. The aggregation process recorded by the calorimetric trace is a cooperative process, although the curve is rather broad compared to other order/disorder transitions, e.g. protein folding [55]. These experimental observations are the result of the dependence shown by the aggregation equilibrium with the temperature and the chemical heterogeneity of the sample. From the calorimetric traces shown in Fig. 5(a), it can be seen that an increase in the concentration of the triblock copolymer shifts the whole calorimetric trace by moving it to the left. This indicates that a higher P123 concentration, promotes the formation of aggregates at lower temperatures. The ΔH_{agg} was calculated from the integration of the temperature dependence of the C_p and normalized with the concentration of the solutions of P123. The results of the DSC measurements on the aqueous solutions of (P123+W) are summarized in Table 3.

Table 3
Summary of data for the DSC thermograms of (P123+W) system.

P123 / W (%)	$\Delta H_{agg}^{norm} / \text{kJ mol}^{-1}$	T_c / K	CMT / K
(P123+W)			
0.34	-420	294.6	291.4
0.61	-421	293.9	290.3
0.98	-458	293.3	290.2
2.30	-429	292.4	289.1
3.06	-465	291.8	288.8
3.42	-427	291.6	288.7
3.45	-440	291.5	288.0

^a These errors are within ±5%.

^b The average value of ΔH_{agg} for the (P123+W) is $436.0 \pm 16.6 \text{ kJ mol}^{-1}$.

For the (P123+W) system, the variation of P123 concentration does not greatly affect the value of the normalized ΔH_{agg} , which average is $436.0 \pm 16.6 \text{ kJ mol}^{-1}$. This value is consistent with

Table 4
 Summary of data for the DSC thermograms of (P123+W)+ADA and (P123+W)+ADA+HEC systems.

P123 / wt.%	ΔH_{agg}^c / kJ mol^{-1}	T_m / K	CMT / K
(P123+W)+ADA			
1.00 ^a	259	291.2	288.4
3.00 ^b	290	289.2	286.3
(P123+W)+ADA+HEC			
1.00 ^a	312	290.1	287.0
3.00 ^b	327	289.0	285.4

^a ADA concentration is 0.22 wt.%.

^b ADA concentration is 0.84 wt.%.

^c Their errors are within $\pm 5\%$.

the mean value reported by Da Silva et al. for the same system ($442.0 \pm 32.3 \text{ kJ mol}^{-1}$) [37]. In contrast, the CMT and the T_m values decrease with an increase in the P123 concentration. This is in accordance with the endothermic enthalpy change observed by other authors [56–58]. The temperature shift in T_m due to the increase in the P123 concentration is 3.12 K (Table 3).

When the (HEC γ +W, $\gamma = 1.0 \text{ wt.}\%$) system was evaluated by DSC in the same temperature range as the previous system, it did not show any transition (data not shown). In addition, when different amounts of HEC were added, within its solubility limit ($-0.65 \text{ wt.}\%$, before an opalescent solution appears), to the (P123 α +W) system with $\alpha = 0.50 \text{ wt.}\%$, we found that the calorimetric traces did not change in comparison with those obtained for (P123+W) system (data not shown). Therefore, the ΔH_{agg} , T_m and CMT values are the same as those for the (P123+W) system and it can be concluded that the addition of such small quantities of HEC does not affect the aggregation process of P123. A completely different situation was observed when ADA was added to the (P123+W) system for which significant changes in the calorimetric traces (Fig. 5(b)) and in the thermodynamic parameters of aggregation were observed (Table 4). The addition of the hydrophobic drug, ADA, dramatically lowers the ΔH_{agg} to around 60% of the value obtained in the case of (P123+W). The results indicate that the incorporation of ADA affects the formation of the P123 aggregates and there is a decrease of the energy involved. The T_m values for the systems also reflect this fact, as they are lower in comparison to the (P123+W) system and the difference is increased as the concentration of the P123 increases.

When HEC was added to the (P123+W)+ADA system, the CMT and T_m showed slight differences compared to those obtained for the system without HEC (Table 4). However, the ΔH_{agg}

for the (P123+W)+ADA+HEC system is higher (an increase in 53 kJ mol^{-1}) compared to the (P123+W)+ADA system. Although the presence of HEC does not have any influence on the thermodynamic parameters of aggregation for P123, only the presence of the hydrophobic drug, ADA, affects these thermodynamics parameters and the interaction between P123 and HEC becomes evident.

3.4. Particle size

The hydrodynamic diameter (d_h) for the different systems was studied using DLS at two temperatures: before and after the transition observed in DSC experiments. To achieve an accurate interpretation from the data collected, the measurements were made at low aggregate concentrations to avoid multiple scattering. P123 concentration was 0.50 wt.%, which is above its CAC; the HEC concentration was 0.50 wt.% and ADA concentration was 1 wt.%. The results of the d_h found and a schematic representation of the formation of the aggregates in the different systems are shown on Table 5 and Fig. 6, respectively.

For the (P123+W) system, before the CMT, three populations were observed. The one with the smallest diameter was considered to be the monomer. When the size measurements were made after the transition (303.15 K), only one population was observed (Table 5) which was assigned to the P123 micelles (Fig. 6(a)). The size for the micelle is coincident with the one found by Bhattacharjee et al. [59]. For the (HEC+W) system, the measurements of the particle size were taken at 298.15 K, since there was no transition shown in the DSC experiments for this system. We observed two populations, the smallest and most abundant one was attributed to the HEC aggregate (34 nm).

When the (P123+W)+HEC system was measured at lower or higher temperatures than its CMT, two peaks were observed. The one that was not very abundant had almost the size of the micelle (25 nm) and it did not change with temperature. Meanwhile, the most abundant peak reduced its size from 132 to 87 nm when the temperature increased. Considering that the size of the HEC aggregate is 34 nm, it may be suggested that the most abundant peak is a complex formed by at least two P123 micelles surrounded by one HEC aggregate (Fig. 6(b)).

In the case of the (P123+W)+ADA system, one peak was observed below the CMT (192 nm). When the temperature was raised, a new peak appeared at 15 nm (the most abundant) assigned to the ADA-loaded P123 micelles (Fig. 6(c)). The peak at a low temperature may be a complex formed by some ADA-loaded P123

Table 5
 Summary of d_h found at temperatures lower (283.15 K) and higher (303.15 K) than CMT for the different systems.

System	T / K	d_h / nm	%	Structure
(P123+W)	283.15	197 \pm 42	59	P123 monomer P123 micelle
		69 \pm 19	30	
	303.15	4.7 \pm 0.4	10	
		18 \pm 2	100	
(HEC+W)	298.15	34 \pm 4	72	
		194 \pm 50	23	
(P123+W)+HEC	283.15	132 \pm 47	85	(P123 micelles+HEC) complex
		28 \pm 8	15	
	303.15	87 \pm 2	86	
		25 \pm 8	14	
(P123+W)+ADA	283.15	192 \pm 16	100	ADA-loaded P123 micelle
		15 \pm 1	75	
	303.15	150 \pm 38	25	
(P123+W)+ADA+HEC	283.15	284 \pm 115	40	(ADA-loaded P123 micelles+HEC) complex
		681 \pm 94	38	
		35 \pm 10	12	
	303.15	15.6 \pm 0.6	77	
		290 \pm 62	13	
		3 \pm 1	10	

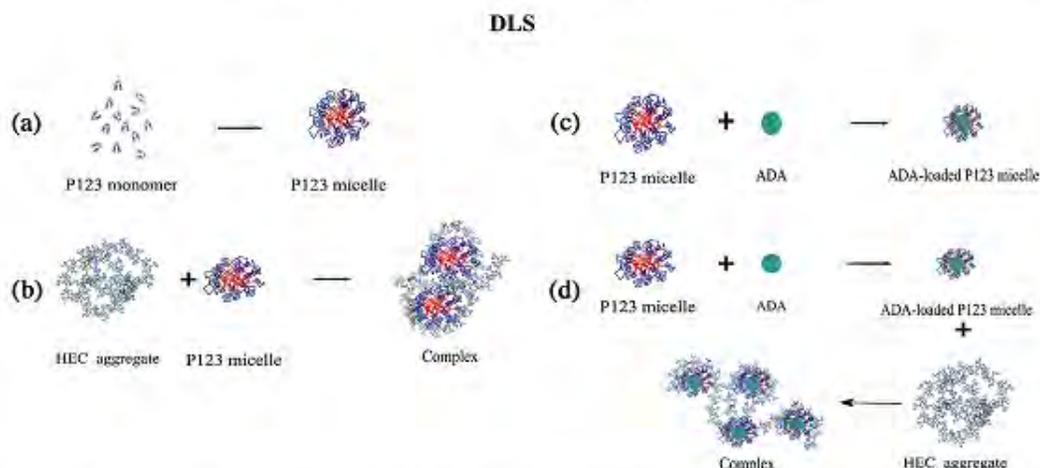


Fig. 6. Proposed diagram for the different aggregates formed by P123, HEC and ADA based on the results of DLS discussed in this work: (a) P123 micelle; (b) (P123 micelle and HEC) complex; (c) ADA-loaded P123 micelle; (d) (ADA-loaded P123 micelle + HEC) complex.

micelles. When the temperature increases, the complex may be desegregated in ADA-loaded P123 micelles. The effect of ADA in the (P123+W) system was the reduction of micelle size in 16.5%. This behavior may be attributed to an increase of the hydrophobic interactions between the PPO segment and ADA.

Finally, when HEC was added to (P123+W)+ADA system, three peaks were observed at both temperatures (Table 5). At 283.15 K, the peak around 284 nm was the most abundant. This peak was also observed at a higher temperature although it was less abundant. The other two peaks at 283.15 K changed their sizes when the temperature increased (Table 5). The peak around 284 nm was assigned to the (ADA-loaded P123 micelles + HEC) complex (Fig. 6(d)), suggesting that HEC surrounds the ADA-loaded P123 micelles, providing the drug with a second protecting shell.

4. Conclusions

The measurements of the dynamic surface tension allow us to obtain the σ_{eq} values for P123 and HEC aqueous solutions and for P123+HEC mixtures. Adding HEC increases the σ_{eq} values of (P123+W)+HEC mixtures compared to the (P123+W) alone at P123 concentrations below the molar fraction 1×10^{-7} . This suggests that the P123 monomers interact with HEC to form a complex. This interaction promotes the appearance of CAC₁, C_s and CAC₂. As the P123 concentration increases, the σ_{eq} reaches the same value for all the systems (32.2 mN m^{-1}). The inclusion of ADA into the micellar solution did not change the σ_{eq} .

The ΔH_{agg} , T_m and CMT values for the (P123+W) system were reduced by the presence of ADA. This is attributed to the ADA binding to the hydrophobic core of P123, which facilitates the aggregation. The addition of HEC to the (P123+W)+ADA system increases the ΔH_{agg} at least 40 kJ mol^{-1} .

The DLS measurements revealed that the P123+HEC mixtures form a complex with a suggested stereochemistry of 2:1 between the P123 micelles and the HEC aggregate. The addition of ADA to the P123 micelles reduced their sizes in 16.5%. These 15 nm micelles are then joined by HEC, forming a complex of about 290 nm. The (P123+W)+ADA+HEC complex provides a second protecting shell for the hydrophobic drug, favoring its stability in the solution and the system can be tested for controlled drug delivery.

Acknowledgements

Xelhua Marcos acknowledges CONACYT México, for a doctoral fellowship (204883), as well as the Programa en Ciencias Químicas (UNAM) for its support. We are grateful to Dra. Ma. Josefa Bernad for her lab support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.05.057>.

References

- [1] S. Sato, D.T. Anghel, Interactions of polymers, in: J.C.T. Kwak (Ed.), *Polymer-Surfactant Systems*, Surfactant Science Series, vol. 77, CRP Press, New York, 1998, pp. 357–408.
- [2] L. Chiappini, M. Gradzielski, Co-assembly in chitosan-surfactant mixtures: Thermodynamics, structures, interfacial properties and applications, *Adv. Colloid Interface Sci.* 230 (2015) 92–107.
- [3] R.C. Pasquini, D.A. Chiappetta, C. Bregni, Los copolímeros en bloques anfifílicos y sus aplicaciones farmacéuticas, *Acta Farma. Bonariense* 24 (2005) 610–616.
- [4] T. Sakai, P. Alexandridis, Size- and shape-controlled synthesis of colloidal gold through autoreduction of the auroic cation by poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymers in aqueous solutions at ambient conditions, *Nanotechnology* 16 (2005) S344–S353.
- [5] B. Naskar, S. Ghosh, S.P. Moulik, Interaction of normal and reverse pluronics (L44 and I0R5) and their mixtures with anionic surfactant sodium *N*-laurylsulfonate, *J. Colloid Interface Sci.* 414 (2014) 82–89.
- [6] P. Kosciorn, F. Asari, G. Pellizzer, D. Ortona, L. Pauluano, Complex formation between poly(vinylpyrrolidone) and sodium dodecyl sulfate studied through NMR, *Langmuir* 19 (2003) 9636–9644.
- [7] G.K.S. Prameela, B.V.N.P. Kumar, A. Pan, V.K. Aswal, J. Subramanian, A.B. Mandal, S.P. Moulik, Physicochemical perspectives (aggregation: structure and dynamics) of interaction between pluronic (L31) and surfactant (SDS), *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 30560–30568.
- [8] A.L. Kjøniksen, B. Nyström, B. Lindman, Dynamic viscoelasticity of gelling and non-gelling aqueous mixtures of ethyl(hydroxyethyl)cellulose and an ionic surfactant, *Macromolecules* 31 (1998) 1852–1858.
- [9] M.T. Calejo, A.L. Kjøniksen, A. Pinazo, L. Perez, A.M.S. Cardoso, M.C.P. de Lima, A.S. Jirado, S.A. Sande, B. Nyström, Thermoresponsive hydrogels with low toxicity from mixtures of ethyl(hydroxyethyl) cellulose and arginine-based surfactants, *Int. J. Pharmaceut.* 436 (2012) 454–462.
- [10] A.L. Kjøniksen, M.T. Calejo, K.Z. Zhu, B. Nyström, S.A. Sande, Stabilization of pluronic gels in the presence of different polysaccharides, *J. Appl. Polym. Sci.* 131 (2014) 40465.
- [11] M. Yokoyama, Block copolymers as drug carriers, *Crit. Rev. Ther. Drug D.* (1992) 233–248.

- [12] A.V. Kabanov, E.V. Batrakov, V.Y. Alalchov, Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery, *J. Control. Rel.* 82 (2002) 189–212.
- [13] G. Allen, D. Maysinger, A. Eisenberg, Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery, *Colloid Surf. B* 16 (1999) 3–27.
- [14] K.T. Oh, T.K. Bronich, A.V. Kabanov, Micellar formulations for drug delivery based on mixtures of hydrophobic and hydrophilic Pluronic(R) block copolymers, *J. Control. Rel.* 94 (2004) 411–422.
- [15] E.S. Lee, Y.T. Oh, Y.S. Youn, M. Nam, B. Park, J. Yun, J.H. Kim, H.T. Song, K.T. Oh, Binary mixing of micelles using Pluronics for a nano-sized drug delivery system, *Colloid Surf. B* 82 (2011) 190–195.
- [16] E. Alvarez-Lopez, S. Perez-Casas, Thermodynamics of the interaction between antihistamines with native and hydroxypropyl-cyclodextrin derivatives in aqueous solutions, *J. Chem. Thermodyn.* 67 (2013) 197–202.
- [17] X. Villegas-Paneda, S. Perez-Casas, E. Hernandez-Baltazar, A.E. Chavez-Castellanos, Study of interactions between octyl-beta-D-glucopyranoside and the hydroxyethyl-cellulose biopolymer in aqueous solution, *J. Chem. Thermodyn.* 79 (2014) 69–75.
- [18] X. Marcos, S. Perez-Casas, J. Llavo, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, Poloxamer-hydroxyethyl cellulose- α -cyclodextrin supramolecular gels for sustained release of griseofulvin, *Int. J. Pharm.* 500 (2016) 11–19.
- [19] A.L. Kjoniksen, K.D. Knudsen, B. Nystrom, Phase separation and structural properties of semidilute aqueous mixtures of ethyl(hydroxyethyl)cellulose and an ionic surfactant, *Eur. Polym. J.* 41 (2005) 1954–1964.
- [20] E. Hoff, B. Nystrom, B. Lindman, Polymer-surfactant interactions in dilute mixtures of a nonionic cellulose derivative and an anionic surfactant, *Langmuir* 17 (2001) 28–34.
- [21] B. Nystrom, B. Lindman, Dynamic and viscoelastic properties during the thermal gelation process of a nonionic cellulose ether dissolved in water in the presence of ionic surfactants, *Macromolecules* 28 (1995) 967–974.
- [22] A. Dal Bo, B. Schweitzer, A.C. Felipe, D. Zanette, B. Lindman, Ethyl(hydroxyethyl)cellulose-sodium dodecanoate interaction investigated by surface tension and electrical conductivity techniques, *Colloid Surf. A* 256 (2005) 171–180.
- [23] A.G. Dal-Bo, R. Laus, A.C. Felipe, D. Zanette, E. Minatti, Association of anionic surfactant mixed micelles with hydrophobically modified ethyl(hydroxyethyl)cellulose, *Colloid Surf. A* 380 (2011) 100–106.
- [24] R. Lund, R.A. Lauten, B. Nystrom, B. Lindman, Linear and nonlinear viscoelasticity of semidilute aqueous mixtures of a nonionic cellulose derivative and ionic surfactants, *Langmuir* 17 (2001) 8001–8009.
- [25] R. Tanaka, J. Meadows, P.A. Williams, G.O. Phillips, Interaction of hydrophobically modified (Hydroxyethyl)Cellulose with various added surfactants, *Macromolecules* 25 (1992) 1304–1310.
- [26] L.H. Torn, L.K. Koopal, A. de Keizer, J. Lyklema, Adsorption of nonionic surfactants on cellulose surfaces: adsorbed amounts and kinetics, *Langmuir* 21 (2005) 7768–7775.
- [27] G.Q. Zhao, S.B. Chen, Clouding and phase behavior of nonionic surfactants in hydrophobically modified hydroxyethyl cellulose solutions, *Langmuir* 22 (2006) 9129–9134.
- [28] A.L. Kjoniksen, M.T. Calejo, K.Z. Zhu, B. Nystrom, S.A. Sande, Stabilization of pluronic gels by hydrophobically modified hydroxyethylcellulose, *Int. J. Polym. Mater.* 64 (2015) 76–87.
- [29] K. Thuresson, B. Lindman, B. Nystrom, Effect of hydrophobic modification of a nonionic cellulose derivative on the interaction with surfactants, *rheology*, *J. Phys. Chem. B* 101 (1997) 6450–6459.
- [30] P. Alexandridis, T.A. Hatton, Poly(Ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block-copolymer surfactants in aqueous-solutions and at interfaces—thermodynamics, structure, dynamics, and modeling, *Colloid Surf. A* 96 (1995) 1–46.
- [31] K. Mortensen, Structural studies of aqueous solutions of PEO-PPO-PEO triblock copolymers, their micellar aggregates and mesophases: A small-angle neutron scattering study, *J. Phys. Condens. Matter* 8 (1996) A103–A124.
- [32] M. Almgren, W. Brown, S. Hvidt, Self-aggregation and phase-behavior of poly(ethylene oxide) poly(propylene oxide) poly(ethylene oxide) block-copolymers in aqueous-solution, *Colloid. Polym. Sci.* 273 (1995) 2–15.
- [33] Y. Kadam, U. Yerramilli, A. Bahadur, P. Bahadur, Micelles from PEO-PPO-PEO block copolymers as nanocontainers for solubilization of a poorly water soluble drug hydrochlorothiazide, *Colloid Surf. B* 83 (2011) 49–57.
- [34] P. Alexandridis, J.F. Holzwarth, T.A. Hatton, Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous-solutions—thermodynamics of copolymer association, *Macromolecules* 27 (1994) 2414–2425.
- [35] P. Alexandridis, J.F. Holzwarth, Differential scanning calorimetry investigation of the effect of salts on aqueous solution properties of an amphiphilic block copolymer (Poloxamer), *Langmuir* 13 (1997) 6074–6082.
- [36] P. Alexandridis, T. Nivaggioli, T.A. Hatton, Temperature effects on structural-properties of pluronic P104 and F108 peo-Ppo-Peo block-copolymer solutions, *Langmuir* 11 (1995) 1468–1476.
- [37] R.C. da Silva, G. Olofsson, K. Schillen, W. Loh, Influence of ionic surfactants on the aggregation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymers studied by differential scanning and isothermal titration calorimetry, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 1239–1246.
- [38] S. Couderc, Y. Li, D.M. Bloor, J.F. Holzwarth, E. Wyn-Jones, Interaction between the nonionic surfactant hexaethylene glycol mono-n-dodecyl ether (C12EO6) and the surface active nonionic ABA block copolymer pluronic F127 (EO97PO69EO97)—formation of mixed micelles studied using isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry, *Langmuir* 17 (2001) 4818–4824.
- [39] H.W. Tsui, J.H. Wang, Y.H. Hsu, L.J. Chen, Study of heat of micellization and phase separation for Pluronic aqueous solutions by using a high sensitivity differential scanning calorimetry, *Colloid. Polym. Sci.* 288 (2010) 1687–1696.
- [40] A.B.E. Attia, Z.Y. Ong, J.L. Hedrick, P.P. Lee, P.L.R. Ee, P.T. Hammond, Y.Y. Yang, Mixed micelles self-assembled from block copolymers for drug delivery, *Curr. Opin. Colloid Interface* 16 (2011) 182–194.
- [41] A. Sosnik, M.M. Raskin, Polymeric micelles in mucosal drug delivery: challenges towards clinical translation, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 1380–1392.
- [42] M.S. Akash, K. Rehman, Recent progress in biomedical applications of Pluronic (PF127): Pharmaceutical perspectives, *J. Control. Rel.* 209 (2015) 120–138.
- [43] J.R. Lu, T.J. Su, R.K. Thomas, J. Penfold, R.W. Richards, The determination of segment density profiles of polyethylene oxide layers adsorbed at the air-water interface, *Polymer* 37 (1996) 109–114.
- [44] J.B. Vieira, Z.X. Li, R.K. Thomas, Adsorption of triblock copolymers of ethylene oxide and propylene oxide at the air/water interface: the surface excess, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 5400–5407.
- [45] L. Benedini, P.V. Messina, R.H. Manzo, D.A. Allemanni, S.D. Palma, E.P. Schulz, M.A. Frechero, P.C. Schulz, Colloidal properties of amiodarone in water at low concentration, *J. Colloid Interface Sci.* 342 (2010) 407–414.
- [46] X. Serrano-Martin, Y. Garcia-Marchan, A. Fernandez, N. Rodriguez, H. Rojas, G. Visbal, G. Benaim, Amiodarone destabilizes intracellular Ca²⁺ homeostasis and biosynthesis of sterols in Leishmania mexicana, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (2009) 1403–1410.
- [47] M.A. Linares-Alba, M.B. Gomez-Guajardo, J.F. Fonzar, D.E. Brooks, G.A. Garcia-Sanchez, M.J. Bernad-Bernad, Preformulation studies of a liposomal formulation containing sirolimus for the treatment of dry eye disease, *J. Ocu. Pharmacol. Ther.* 32 (2016) 11–22.
- [48] N. Arfin, H.B. Bohidar, Concentration selective hydration and phase states of hydroxyethyl cellulose (HEC) in aqueous solutions, *Int. J. Biol. Macromol.* 50 (2012) 759–767.
- [49] J. Djuve, R.J. Pugh, J. Sjoblom, Foaming and dynamic surface tension of aqueous polymer/surfactants solutions 1: ethyl(hydroxyethyl) cellulose and sodium dodecyl sulphate, *Colloid Surf. A* 186 (2001) 189–202.
- [50] D.J.P. Taylor, R.K. Thomas, J. Penfold, Polymer/surfactant interactions at the air/water interface, *Adv. Colloid Interface Sci.* 132 (2007) 69–110.
- [51] P. Joos, Dynamic Surface Tension, 1st ed., VSP, Utrecht, The Netherlands, 1999.
- [52] I. Nahringerbauer, Dynamic surface tension of aqueous polymer solutions 1. Ethyl(hydroxyethyl)cellulose (BERMOCOLL cst-103), *J. Colloid Interf. Sci.* 176 (1995) 318–328.
- [53] A. Goswami, P.A. Hassan, S.S. Bhagwat, Static and dynamic surface tension behaviour of a triblock copolymer and a non ionic surfactant mixture, *Colloid Surf. A* 489 (2015) 190–196.
- [54] I. Pepic, J. Filipovic-Grcic, I. Jalsenjak, Interactions in a nonionic surfactant and chitosan mixtures, *Colloid Surf. A* 327 (2008) 95–102.
- [55] L.A. Tellez, L.M. Blancas-Mejia, E. Carrillo-Nava, G. Mendoza-Hernandez, D.A. Cisneros, D.A. Fernandez-Velasco, Thermal unfolding of triosephosphate isomerase from entamoeba histolytica: dimer dissociation leads to extensive unfolding, *Biochemistry* 47 (2008) 11665–11673.
- [56] J. Jansson, K. Schillen, G. Olofsson, R.C. da Silva, W. Loh, The interaction between PEO-PPO-PEO triblock copolymers and ionic surfactants in aqueous solution studied using light scattering and calorimetry, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 82–92.
- [57] D. Lof, A. Niemiec, K. Schillen, W. Loh, G. Olofsson, A calorimetry and light scattering study of the formation and shape transition of mixed micelles of EO20PO68EO20 triblock copolymer (P123) and nonionic surfactant (C12EO6), *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 5911–5920.
- [58] I. Patterson, B.Z. Chowdhry, S. Leharne, Evaluation of surfactant monomer concentrations in equilibrium with micelles and their temperature dependence for oxyethylene/oxypropylene/oxyethylene triblock copolymers using DSC, *Colloid Surf. A* 111 (1996) 213–222.
- [59] J. Bhattacharjee, G. Verma, V.K. Aswal, V. Patravale, P.A. Hassan, Microstructure, drug binding and cytotoxicity of Pluronic P123-aerosol OT mixed micelles, *RSC Adv.* 3 (2013) 23080–23089.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Poloxamer-hydroxyethyl cellulose- α -cyclodextrin supramolecular gels for sustained release of griseofulvin

Xelhua Marcos^a, Silvia Pérez-Casas^a, José Llovo^b, Angel Concheiro^c,
Carmen Alvarez-Lorenzo^{c,*}^a Laboratorio de Biofarmacología, Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México^b Servicio de Microbiología y Parasitología, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain^c Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2015

Received in revised form 7 January 2016

Accepted 8 January 2016

Available online 12 January 2016

Keywords:

Supramolecular gel
Hydroxyethyl cellulose
Pluronic
Antifungal activity
Dermatophytosis
Controlled release

ABSTRACT

Supramolecular gels of poloxamer-hydroxyethyl cellulose (HEC)- α -cyclodextrin (α CD) were developed aiming to obtain synergisms regarding solubilization and sustained release of griseofulvin for topical application. The effects of α CD concentration (0–10%w/w) on the phase behavior of aqueous dispersions of Pluronic® P123 (14%w/w) mixed with HEC (2%w/w) were evaluated at 4, 20 and 37 °C. The cooperative effects of the inclusion complex formation between poly(ethylene oxide) (PEO) blocks and HEC with α CD prevented phase separation and led to supramolecular networks that solubilize the antifungal drug. Rheological and bioadhesive properties of gels with and without griseofulvin could be easily tuned modulating the polymers proportions. Supramolecular gels underwent sol-gel transition at lower temperature than P123 solely dispersions and enabled drug sustained release for at least three weeks. All gels demonstrated good biocompatibility in the HET-CAM test. Furthermore, the drug-loaded gels showed activity against *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* and thus may be useful for the treatment of tinea capitis and other cutaneous fungal infections.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The development of advanced functional materials based on supramolecular self-assembled networks has become an important area of research in pharmaceutical and biological fields (Saboktakin and Tabatabaei, 2015; Shen et al., 2015; Simoes et al., 2015; Yang et al., 2010). Supramolecular gels may retain the typical biocompatibility, versatility of preparation and tunable features of gels while offer improved performance regarding stability in the physiological environment, control of drug and gene delivery, and extended time of permanence in the application site. Common polymer-polymer associations are due to hydrophobic, electrostatic and hydrogen bond interactions or stereocomplexation, and the obtained gels can be reinforced by means of covalent links among the chains (Hoare and Kohane, 2008; Sivashanmugam et al., 2015; Wang and Wang, 2013). Strong although still reversible supramolecular gels can be obtained combining cyclodextrins (CDs) and polymers bearing moieties or blocks that can be

threaded by CDs (Wintgens et al., 2008; Simoes et al., 2014a). In particular, α CD has been shown to thread along poly(ethylene oxide) (PEO) blocks with a stoichiometry of two ethylene oxide units per one α CD (Harada et al., 1993), forming poly(pseudo) rotaxanes. The threaded α CDs stack in the form of nanocylinders with a crystalline channel-type structure. This process is entropically unfavorable, but enthalpically driven due to hydrogen bond formation between CDs that arrange head-to-head and tail-to tail along the nanocylinders (Huang and Gibson, 2005; Simoes et al., 2014a; Zhou et al., 2013).

Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide), PEO-PPO-PEO (poloxamer) copolymers have been widely used as micelle nanocarriers able to host a variety of drugs and even gene material in the cores of the micelles, and also as in situ gelling systems taking benefit from the ability of the micelles to organize in 3D networks as temperature is increased (Gaucher et al., 2010; Kabanov et al., 2002; Kedar et al., 2010; Nishiyama and Kataoka, 2006; Rapoport, 2007; Sosnik and Rashin, 2015). However, the residence time of in situ gels in the application site is limited by the overall hydrophilic character of the poloxamer gels, which leads to a relatively rapid erosion, and mixtures with

* Corresponding author. Fax: +34 981547148.

E-mail address: carmen.alvarezlorenzo@usc.es (C. Alvarez-Lorenzo).

several other polymers have been explored to enhance gels stability (Kjonić et al., 2014). As a relevant advantage, adequate combinations of poloxamer and α CD allows the design of poly (pseudo) rotaxane based gels that at room temperature can be managed easily due to the stress-dependent viscoelasticity (Simões et al., 2012), avoiding the free flowing behavior of poloxamer dispersions which leads to loss of product when applied on skin or mucosa while the sol-gel transition does not occur. At 37°C, the structure of the poly(pseudo) rotaxane assemblies may be reinforced by the PPO-PPO hydrophobic interactions (Simões et al., 2012). Tuning α CD/block copolymer ratio enables obtaining viscoelastic gels that exhibit self-healing features (Pradal et al., 2013). This type of supramolecular gels has been demonstrated useful for preparing syringeable depots for bone regeneration (Del Rosario et al., 2015; Nguyen et al., 2015). Since no covalent links are involved in the supramolecular complex, significant changes in bioelimination and biodegradability of the original compounds are not expected (Simões et al., 2012). Overall, the supramolecular gels are more hydrophobic than poloxamer solely gels, and therefore the erosion of the depot and the drug release rate can be notably extended. Poly(pseudo) rotaxane supramolecular gels can be prepared with low content in poloxamer, but this leads to weaker gels at 37°C (Simões et al., 2014a). In spite of the above reported advantages, poloxamer- α CD poly(pseudo) rotaxane formulations still exhibit quite weak consistency even at rest. When a stress is applied the assemblies are broken (the system performs as shear thinning and thixotropic) and the recovery of high storage (G') and loss (G'') moduli takes time (Simões et al., 2012). Such a decrease in viscosity during administration may favor a rapid release of the drug during the time required for the supramolecular system to restructure. Therefore, there is a clear need of adding an structural agent that can reinforce the mechanical features of the supramolecular-based gels, particularly when the poly(pseudo) rotaxanes are disassembled.

The aim of this work was to design supramolecular gels that simultaneously comprise two polymers able to interact with α CD in order to improve the physical stability and thus to prolong the permanence of the gels on the application site, while still perform as syringeable depots (for systemic treatments) or easily extendable formulations (for topical application). To the best of our knowledge these ternary (plus water) gels have not been previously investigated. Hydroxyethyl cellulose (HEC) was chosen as the third component for the mixture with Pluronic® P123 and α CD. HEC, as well as other cellulose ethers, is widely used as thickening component of pharmaceutical formulations due to its proved biocompatibility and its convenient obtaining from renewable sources. However, HEC dispersion features are quite sensitive to the addition of a variety of excipients, including surfactants, electrolytes or cyclodextrins (Karlsen et al., 2002), and also to changes in temperature showing a lower critical solubility temperature (LCST). Therefore, its mixing with poloxamer is expected to be quite challenging. Cyclodextrins have been shown to attenuate hydrophobic interactions among chains of cellulose derivatives, as long as the CD cavity can accommodate the substituents of the polymer (Belreshiti et al., 2007; Karlsen et al., 2002; Wiegans et al., 2008). The ternary systems were characterized in detail, and then the antifungal drug griseofulvin was incorporated to evaluate the suitability of the developed platforms for the particular application of treatment of dermatophytosis. Griseofulvin is considered drug of choice for tinea capitis because its selective activity against dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, and *Epidermophyton*). This heterocyclic benzofuran drug is practically insoluble in water ($\log P$ 2.17; melting point 218–220°C), and its oral administration is associated with poor and highly variable bioavailability and collateral effects (Aggarwal

et al., 2013). Formulation of griseofulvin in supramolecular gels may enable the topical treatment of dermatophytosis, facilitating drug diffusion through epidermis by means of high drug concentration gradient (high apparent solubility) and components that promote skin bioadhesion and penetration.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Pluronic® P123 (P123) of average composition PEO₂₀-PPO₇₀-PEO₂₀ (5750 g/mol) was from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and used without further purification; HEC Natrosol type G-Pharm (335,000 g/mol) was from Aqualon, Hercules Inc. (Wilmington, DE, USA); α CD (972.84 g/mol) from Wacker (Burghausen, Germany), and griseofulvin (352.77 g/mol) from Sigma-Aldrich (Spain). Purified water was obtained using reverse osmosis (Milli Q, Millipore, Barcelona, Spain).

2.2. Preparation of dispersions and supramolecular gels

Concentrated aqueous dispersions of P123 (40% w/w) and HEC (6% w/w) were prepared in separate. A weighed amount of P123 was added to cold water (Schmölke, 1972) and kept under stirring for 24 h until a clear solution was obtained. In the case of HEC dispersion, a weighed amount of HEC was added to hot water (90°C) under stirring and then kept at 30°C for 24 h.

To prepare batch 1 dispersions (Table 1), weighed amounts of concentrated dispersions of P123 and HEC were mixed with water under stirring to obtain gels with constant concentration in P123 (14% w/w) and HEC (2% w/w). After mixing, a weighed mass of α CD powder (Table 1) was added under vigorous stirring until complete dissolution. All systems were further stirred for 24 h to ensure complete homogenization; samples of each system were then stored at 4, 20 and 37°C.

Batch 2 systems (Table 1) were prepared with and without griseofulvin. Dispersions and gels without griseofulvin were prepared as described above with the compositions shown in Table 1. To prepare the dispersions and gels containing griseofulvin, the drug was loaded first into P123 (40% w/w) or HEC (6% w/w) dispersions, which were then processed as explained above. The final concentration of griseofulvin in the gels was 50 μ g/mL. In the case of the α CD solution, a weighed mass of α CD was added first to water until complete dissolution, and then a weighed mass of griseofulvin was added.

Table 1
Composition of the polymer dispersions and supramolecular gels with and without griseofulvin.

Batch	P123 (% w/w)	HEC (% w/w)	α CD (% w/w)	Griseofulvin (μ g/mL)
1	14	2	0	0
	14	2	2.5	0
	14	2	5	0
	14	2	7	0
	14	2	10	0
2	14	0	0	0/50
	0	2	0	0/50
	0	0	10	0/50
	14	2	0	0/50
	14	0	10	0/50
	0	2	10	0/50
	14	2	10	0/50

2.3. Griseofulvin solubility studies

Aqueous dispersions of P123 (2–12% w/w), HEC (0.25–1% w/w) and their mixtures were used to evaluate drug solubility. The solutions were prepared as described above. A weighed amount of griseofulvin (about 5 mg) was placed into a microtube and aliquots (2 mL) of polymer dispersions were added. The systems were kept under stirring at room temperature for 48 h, in triplicate. Saturated solutions were then centrifuged (Eppendorf 5804R, Germany) for 20 min at 14,000 rpm. Control experiments were carried out using water. The concentration of drug dissolved was determined from absorbance at 294 nm (UV spectrophotometer, Agilent 8453, Germany), after adequate dilution with ethanol/water mixture (50:50 vol/vol).

2.4. Gel appearance and bioadhesion

Phase separation and changes in turbidity of batch 1 systems were evaluated through visual inspection during storage. Gel formation was monitored applying the inverted-tube test. Bioadhesive capacity of batch 2 systems was determined by measuring the maximum detachment force and its bioadhesion work, employing a TA-TX Plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK) using tanned goat leather, which is a good model for natural skin (Blanco-Fuente et al., 1996; Campana-Seoane et al., 2014). For this study, a tanned leather disc was attached on the lower face of the probe, and a tanned leather rectangle adhered to a glass plate that was fixed to the lower support of the texture analyzer. A sample of polymer dispersion or gel (50 μ L) was deposited on the leather rectangle and the equipment was equilibrated and maintained at room temperature for 5 min. Then, a compression/extension test was carried out applying 0.5 N of force during 60 s to ensure contact, and the bioadhesion work was calculated as the area under the force-displacement curve. The experiment was repeated under the same conditions at least 5 times for each dispersion or gel.

2.5. Rheological characterization

The dependence of G' and G'' of batch 2 systems on temperature was evaluated at 1 rad/s and 0.1 Pa in the 15–60 °C range, using a Rheolyst AR-1000N rheometer (TA Instruments, New Castle, UK) fitted with a cone geometry (6 cm, 2°) and equipped with an AR2500 data analyzer and a Peltier temperature control.

2.6. Griseofulvin release

Aliquots (2 mL) of polymer dispersions and gels were placed into test tubes and kept at 37 °C for 1 h. Then phosphate buffer pH 7.4 (5 mL) was slowly added to the tubes in order to remain on the top surface of the gels. The tubes were kept at 37 °C under oscillatory movement (60 osc/min) for six weeks. Samples of release medium (1 mL) were taken at predetermined time intervals and replaced with the same volume of phosphate buffer preheated at 37 °C. Griseofulvin concentration was determined from absorbance measurements at 294 nm (UV spectrophotometer Agilent 8453, Germany). Four replicates of each system were evaluated.

2.7. In vitro biocompatibility tests

The Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) method was used as a first screening of biocompatibility (McKenzie et al., 2015). For this purpose, fertilized broiler chicken eggs (Coren, Santa Cruz de Artabaldo, Spain) were incubated (rotating them three times per day) during 8 days at 37 °C and 65% humidity in an huetec CCS050 climatic chamber (Tona, Barcelona,

Spain). After the incubation period, the air cell part of the eggshell was removed using a Dremel 300 (Breda, Netherlands) equipped with a rotary saw. Then, the inner membrane was wet with sterilized 0.9% NaCl, and the eggs incubated for 30 min more. When the time was over, the solution and the inner membrane were removed, and 100 μ L of polymer dispersion or gel was put on the chorioallantoic membrane. During five minutes, hemorrhage, lysis and coagulation were monitored. 0.9% NaCl and 0.1 N NaOH were used as negative and positive controls, respectively. Irritation scores (IS) were calculated, in triplicate, according to the following equation:

$$IS = \left[\left(\frac{301 - H_{time}}{300} \right) \times 5 \right] + \left[\left(\frac{301 - L_{time}}{300} \right) \times 7 \right] + \left[\left(\frac{301 - C_{time}}{300} \right) \times 9 \right] \quad (1)$$

where H_{time} , L_{time} and C_{time} represent the time (in seconds) at which hemorrhage, lysis and coagulation started. According to the IS value, the formulations can be classified as non-irritating (0–0.9), weakly irritating (1–4.9), moderately irritating (5–8.9) and severely irritating (9–21).

Pictures of the chorioallantoic membranes were taken and converted to grayscale with Photoshop® (Adobe Systems Software Ireland Ltd.). The grayscale photos were then loaded into ImageJ (National Institutes of Health, USA) to quantify the extent of any hemorrhage (McKenzie et al., 2015). The grayscale values of the pixels over a standardized length of membrane were analyzed, and the average gray pixel value was obtained from each image.

2.8. Antifungal studies

The antifungal efficacy of dispersions and gels with and without griseofulvin was evaluated on *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* (isolates from Culture Collection of Mycology Lab., Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela). First, dermatophytes were cultured on Sabouraud dextrose agar (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) plates at 30 °C for four days. Then, the inocula were prepared in sterile distilled water using dried dermatophytes cultures until suspensions of the fungi above 0.14 of optical density were obtained. After that, new plates with Mueller Hinton agar (Difco, Madrid, Spain) were swabbed with the inocula and seven wells (10 mm in diameter) were made in each plate, which were filled with 100 μ L of different dispersions or gels (those loaded with griseofulvin contained 50 μ g drug per mL). Finally, the plates were incubated at 30 °C for 4 days and the zone of inhibition was measured.

3. Results and discussion

3.1. Drug solubilization screening

As a first step, the ability of P123 and HEC dispersions, solely or after been mixed, to solubilize griseofulvin was evaluated (Table 2). Drug solubility in water was 25 \pm 6 μ g/mL, which is in good agreement with previously reported values (Alvarez-Lorenzo et al., 2007). Addition of P123 progressively increased drug solubility, as the P123 concentrations evaluated were well above the CMC reported for this block copolymer (0.0025%; Kozlov et al., 2000). Therefore, the drug can be hosted in the hydrophobic cores of the micelles. 12% P123 dispersion increased drug solubility up to 345 μ g/mL. Cellulose ethers have been previously shown to interact with hydrophobic drugs through the apolar regions of the cellulose chain (Rodríguez-Izquierdo et al., 2006). 1% HEC increased griseofulvin solubility up to 66 μ g/mL, which is more than 2-fold greater than drug solubility in water, but still quite low compared to poloxamer P123 micelles.

Table 2
Solubilization capacities of polymer dispersions and supramolecular gels. Mean values and standard deviations ($n=3$).

P123 (% w/w)	HEC (% w/w)	Solubility ($\mu\text{g/mL}$)
8	–	232 (39)
12	–	345 (10)
–	1	66 (4)
6	0.25	290 (36)
4	0.5	277 (27)
2	0.75	252 (32)
9	0.25	243 (13)
6	0.5	335 (7)
3	0.75	89 (4)
8	0.25	161 (3)
8	0.5	181 (2)
8	0.75	210 (43)
8	1	184 (11)
12	0.25	365 (5)
12	0.5	387 (7)
12	0.75	413 (13)
12	1	370 (61)

All P123:HEC mixtures had higher capacity of solubilization than the 1% HEC solely dispersion. For a fixed poloxamer concentration, an increase in the quantity of HEC led to minor increase in drug solubility. The 12% P123+0.75% HEC mixture showed the highest solubilization capacity (413 $\mu\text{g/mL}$), increasing drug solubility in 19% compared to the value recorded for poloxamer solely dispersions. In the case of αCD solely solutions, in spite of αCD has a hydrophobic cavity in which hydrophobic compounds can be harbored, its effect on drug solubility was negligible (22 $\mu\text{g/mL}$) which can be explained by the large volume of one griseofulvin molecule (1600 \AA^3) (QingQing et al., 2012) compared the αCD cavity (174 \AA^3) (Del Valle, 2004). Although the drug solubility values previously found in poloxamine T904 micellar dispersions were higher (2.12 mg/mL; Alvarez-Lorenzo et al., 2007) than those found in the present work, the quantity of griseofulvin solubilized by the developed gels was well above the minimum inhibitory concentration (0.5–2.0 $\mu\text{g/mL}$) for dermatophytes (Gupta et al., 2009).

3.2. Formation of supramolecular gels

Common surfactants and amphiphilic drugs have been shown able to cooperatively interact with cellulose polymers, causing

associative phase segregation in aqueous medium (Alvarez-Lorenzo and Concheiro, 2003; Rodríguez et al., 2003). Among cellulose ethers, HEC is the less prone to interact due to the rigidity of its backbone and to its relatively high hydrophilicity (Kästner et al., 1996). However, we observed that P123+HEC mixtures showed phase separation in spite of both polymers have hydrophilic ethylene oxide groups (Fig. 1a). It should be noted that in the mixtures that we prepared, P123 concentration was relatively low and did not form gels at room temperature. Therefore, phase separation was monitored easily. Differently, phase separation was not observed in a previous study carried out with 17.4% Pluronic F127 and 0.5% HEC (Kjoniksen et al., 2014), probably because the assays were carried out at temperature above that required for in situ gelling.

Addition of αCD s to P123 solutions led to poly(pseudo) rotaxane formation, which was responsible for the high turbidity of the systems (Harada et al., 1993; Pradal et al., 2013; Simoes et al., 2012; Travelet et al., 2009; Yang et al., 2010). Mixtures of cellulose derivatives and αCD have been barely evaluated. Most studies refer to βCD derivatives that may increase the viscosity and/or promote the formation of a homogeneous dispersion (Beheshti et al., 2007; Wirtgens et al., 2008). Oppositely, interaction of αCD with HEC is expected to be poor (Karlborg et al., 2006).

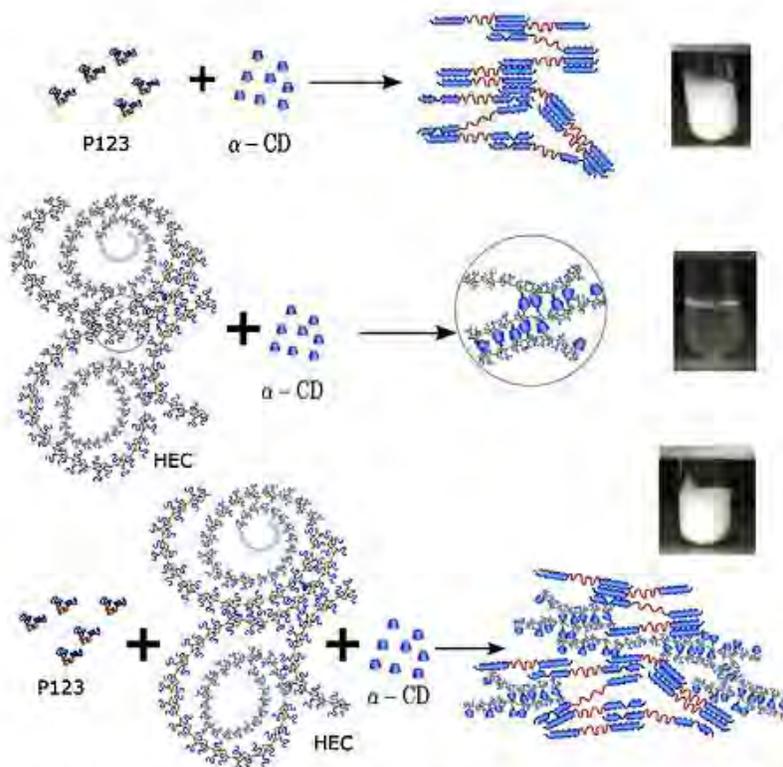
The effect of αCD on phase behavior of P123+HEC mixture was evaluated for the compositions indicated in Table 1. Gel formation was investigated using the inverted test tube experiment. As αCD was added to the P123:HEC mixtures, they quickly became cloudy, which means that poly(pseudo) rotaxanes were rapidly formed (Shen et al., 2015; Simoes et al., 2012). As the quantity of αCD increased, larger white gel phase was formed (Fig. 1). P123:HEC mixtures to which 2.5, 5 and 10% αCD was added remained as one phase after 24 h storage at 4 $^{\circ}\text{C}$ or at room temperature. Oppositely, when they were maintained at 37 $^{\circ}\text{C}$, a quick phase separation was observed; only the mixture with 10% αCD behaved as one phase gel. After 48 h of storage, no significant differences were observed in comparison with the 24 h storage. Only P123:HEC mixture containing 5% αCD stored at room temperature showed phase separation, but the same system kept at 4 $^{\circ}\text{C}$ was in one phase. This finding is explained by the fact that the threading of αCD along PEO blocks as well as the interactions between poly(pseudo) rotaxanes are favored at low temperature (Travelet et al., 2009). Therefore, at 4 $^{\circ}\text{C}$ interaction of αCD with both PEO and HEC should predominate over poloxamer-HEC interactions. The supramolecular system prepared with 10% αCD remained as one phase gel after one month storage at room temperature (Table 3). The different interaction between αCD and polymers is depicted in Scheme 1.



Fig. 1. Appearance of P123 (14%) + HEC (2%) mixtures prepared with different contents in αCD : (a) 0, (b) 2.5, (c) 5, (d) 7, (e) 10% w/w, after 24 h storage at room temperature.

Table 3
Phases observed in P123 (14%) + HEC (2%) mixtures prepared with different contents in α CD.

α CD (% w/w)	24 h			48 h			1 week		
	4 °C	25 °C	37 °C	4 °C	25 °C	37 °C	4 °C	25 °C	37 °C
0	sol	2 phases							
2.5	3 phases	2 phases	2 phases	3 phases	3 phases	2 phases	3 phases	3 phases	2 phases
5	gel	2 phases	2 phases	gel	2 phases	2 phases	gel	2 phases	2 phases
7	gel	sol	2 phases	gel	sol	2 phases	gel	2 phases	2 phases
10	gel	sol	gel	gel	sol	gel	gel	sol	gel



Scheme 1. Sketch of the supramolecular structures that can be formed when poloxamer Pluronic P123 (P123) and/or hydroxyethyl cellulose (HEC) are mixed in solution with α -cyclodextrin (α -CD).

3.3. Rheological behavior

Dispersions of P123 (14%) solely underwent sol-to-gel transition at 42 °C (Fig. 2a). The PPO and PEO blocks become less soluble in water and more micelles are formed when temperature is increased. This causes gelation due to close packing of the micelles into a cubic phase gel (Alexandridis et al., 1994; Alvarez-Lorenzo et al., 2007). Incorporation of the hydrophobic drug shifted the transition toward lower temperature (Fig. 2a) due to a reinforcement of the interactions. After the transition, the values of storage (G') and loss (G'') moduli were not altered by the presence of griseofulvin. Dispersions of P123 (14%) plus either α CD or HEC showed similar rheological profiles. Systems containing both P123 and α CD underwent sol-to-gel transition at 45 °C (Fig. 2d). The highest G' and G'' values (above 10^5 Pa) were recorded between 45 and 60 °C, which is ascribable to the reinforcement of the poly

(pseudo) rotaxane network by means of hydrophobic interactions among PPO blocks of neighbor copolymer chains. As previously observed for related systems, α CD can thread along PEO blocks of P123 forming poly(pseudo) rotaxanes that stack as nanocylinders with a crystalline channel type structure; the stacking entraps the poloxamer chains and makes the system to perform as reversible supramolecular gels (Harada et al., 1993; Simoes et al., 2014a). At room temperature, the PPO block is expected to act as simple physical link that connects the poly(pseudo) rotaxanes that are formed at both ends of each P123 chain. As temperature increases, the PPO block may dehydrate and hydrophobically interact with other PPO blocks of close P123 chains. Then, above the gelling temperature of P123, the supramolecular network may be dually cross-linked by means of the crystalline bonds among threaded α CDs and the hydrophobic interactions among PPO blocks. When griseofulvin was added, the reinforcement of the hydrophobic

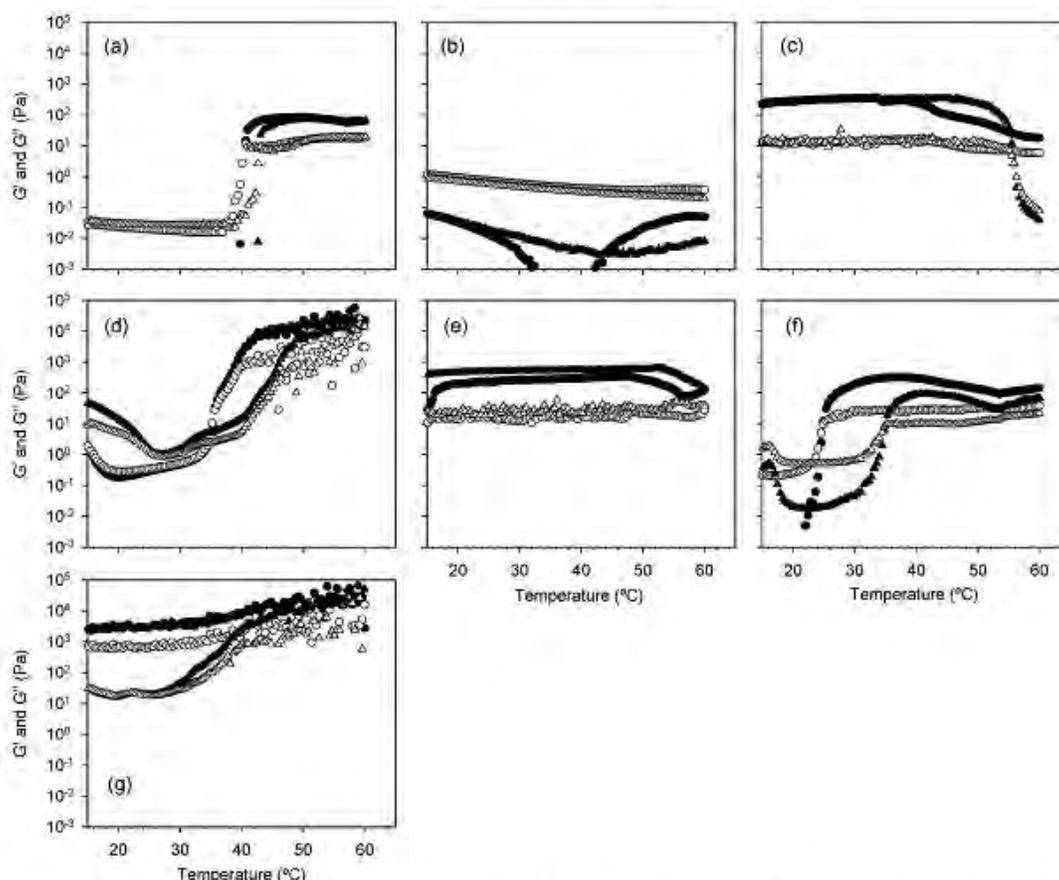


Fig. 2. Dependence of the storage (G' , solid symbols) and loss (G'' , open symbols) moduli for systems without griseofulvin (Δ) or containing 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of griseofulvin (\circ): (a) 14% P123 dispersion, (b) 2% HEC dispersion, (c) 10% αCD solution, (d) 14% P123 + 10% αCD gel, (e) 2% HEC + 10% αCD gel, (f) 14% P123 + 2% HEC, (g) 14% P123 + 2% HEC + 10% αCD .

contributions led to higher G' and G'' and the sol-to-gel transition occurred at 39 °C.

HEC (2%) solely dispersion showed a decrease in G' as temperature increased from 35 to 55 °C due to partial insolubilization (LCST) of the cellulose derivative (Fig. 2b). Incorporation of griseofulvin led to minor changes in the rheological profile. When the HEC dispersion was mixed with αCD , a synergic effect was observed, G' increased more than G'' and the LCST was shifted above 50 °C (Fig. 2e). These findings suggest that αCD interacts with HEC solubilizing hydrophobic regions of the cellulose ether and favoring the formation of viscoelastic, although still weak, gels. It is interesting to note that αCD (10%) solely aqueous solution also showed G' values greater than G'' values under the tested experimental conditions (Fig. 2c). This behavior can be related to the self-assembly features that exhibit natural cyclodextrins at relatively high concentrations (Puskás et al., 2013). The αCD (10%) solely system behaved as a free-flowing solution when poured from the beaker, but under the oscillatory rate of 1 rad/s the storage of energy in the contacts among the cyclic oligosaccharides is noticeable. Addition of griseofulvin to HEC (2%) + αCD (10%) gels led to a minor decrease in G' and G'' values and in the LCST due to the promotion of hydrophobic interactions (Fig. 2e).

P123 + HEC binary systems underwent a sol-to-gel transition at lower temperature (35 °C) than that recorded for P123 solely

dispersion, which is in agreement with the occurrence of hydrophobic interactions between the two polymers (Fig. 2f). The LCST of HEC was not observed and G' and G'' values were similar to those observed with P123 dispersion. When griseofulvin was added, the transition occurred at even lower temperature (25 °C) due to the reinforcement of the hydrophobic interactions, as observed for P123 + αCD gel.

Regarding the supramolecular systems, P123 + HEC + αCD mixtures performed as weak gels already at room temperature (Fig. 2g), which can be attributed to the thickening effect of HEC when mixed with αCD . At 37 °C, a further increase in both moduli occurred resembling the in situ gelling of P123. As for the binary systems addition of griseofulvin reinforced the network structure. These drug-loaded supramolecular gels were the ones that showed the highest G' and G'' both below and above the gelling temperature of P123. Regarding the effect of temperature, it is interesting to note that dispersions of P123 solely or mixed with HEC showed an abrupt increase in G' and G'' values at the sol-to-gel temperature, which suggests that the interactions between both polymers are minor. In the case of binary (P123 + αCD) and ternary (P123 + HEC + αCD) mixtures containing αCD the transition had lower slope, which may indicate that the PPO blocks are grouped in small domains because of steric hindrance caused by the stacking of αCD s forming part of the poly(pseudo) rotaxanes and/or the

entanglement of HEC- α CD chains. As a consequence, less cooperative interactions among PPD blocks can occur and the sol-to-gel transition requires a broader range of temperature. Similar behavior has been reported for interpenetrating networks of poly(*N*-isopropylacrylamide) and chitosan (Alvarez-Lorenzo et al., 2005).

3.4. Griseofulvin release

Drug release tests from polymer dispersions and gels previously loaded with griseofulvin (50 μ g/mL) were carried out in phosphate buffer pH 7.4 at 37 °C. As expected from the poor ability of α CD to form inclusion complexes with griseofulvin, drug-loaded α CD solutions rapidly released the total amount of drug incorporated (Fig. 3). 14% P123 micellar dispersions also showed a poor control of drug release, which can be explained by fact that the temperature (37 °C) is below that required for the gel transition, as shown in the rheological tests. Therefore, the micelles rapidly dispersed in the release medium. The higher consistency (greater G' and G'' moduli) of HEC solely dispersions, compared to P123 micelles dispersion, explains the lower burst recorded although the release still occurred quite rapidly. Combination of P123 and HEC did not improve the control of drug release probably due to the phase separation.

Interestingly, combining HEC (2%) + α CD (10%), the burst was notably reduced and the gels released the drug at an almost constant rate for 9 days. Rheological experiments showed that α CD attenuates the phase separation that occurs when the HEC dispersion is heated around 37 °C, while enhances the viscoelastic moduli. As a consequence, the more homogeneous and viscous gels can regulate better the release of the drug.

Binary P123 (14%) + α CD (10%) poly(pseudo) rotaxane gels were the ones that released griseofulvin at the slowest rate. As confirmed by rheological tests, at 37 °C strong interactions occurred among the treaded α CDs and also among the hydrophobic PPD blocks, notably reinforcing the network structure. Griseofulvin entrapped either inside or outside P123 micelles in the supramolecular gels finds it difficult to diffuse out. The ternary P123 (14%) + HEC (2%) + α CD (10%) gels also provided sustained release, but at greater rate than the binary P123 + α CD gels. Incorporation of HEC into the supramolecular structure may have a two-fold effect: the arrangement of the P123 + α CD poly(pseudo) rotaxanes is disturbed and therefore less perfect crystalline nanocylinders are formed, with in turn may open the mesh of

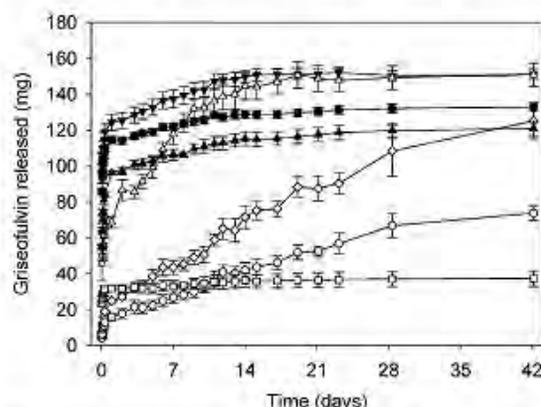


Fig. 3. Griseofulvin released at 37 °C from (●) P123 (14%), (▲) HEC (2%), (□) α CD (10%), (▼) P123 (14%) + HEC (2%), (△) HEC (2%) + α CD (10%), (○) P123 (14%) + α CD (10%), (◇) P123 (14%) + HEC (2%) + α CD (10%).

the network; and HEC may increase the hydrophilic character of the supramolecular gels, which facilitates the entrance of release medium in the gel.

3.5. Bioadhesion

Bioadhesion can facilitate the permanence of the formulation at the application site. Bioadhesive capacities of the dispersions and gels were characterized as the work required to separate two pieces of tanned leather that had been pressed together having the formulation in between (Table 4). Dispersions of P123 or α CD solely showed poor bioadhesion. Oppositely, HEC either alone or combined with α CD or P123 led to greater bioadhesion work. Bioadhesive feature of cellulose ethers have been previously reported and are attributed to their amphiphilic character and ability to interact through hydrogen bonding with mucin (Blanco-Fuente et al., 1996). Adding α CD to the P123 (14%) dispersion increased the bioadhesion work in 86-fold, up to 1.38 mJ, which may be related to the increase in viscosity (Fig. 2) as well as to the formation of more hydrogen bonds between the poly(pseudo) rotaxane with the leather. The ternary P123 (14%) + HEC (2%) + α CD (10%) gels also showed relevant bioadhesion features, but less intense than for the binary P123- α CD system. Incorporation of griseofulvin to binary or ternary systems containing α CD increased the bioadhesion work probably because the hydrophobic contributions. The bioadhesion work values recorded for P123 (14%) + α CD (10%) and P123 (14%) + HEC (2%) + α CD (10%) gels were greater than those previously reported for hydroxypropyl- β -cyclodextrin and carbopol mixtures (Rodríguez-Tenreiro et al., 2006) and for some mucoadhesive vaginal emulsions (Campana-Seoane et al., 2014).

3.6. HET-CAM test

The HET-CAM test enables a preliminary screening of biocompatibility of a formulation as measured by its ability to induce toxicity in the chorioallantoic membrane. None of the polymer dispersions or gels induced hemorrhage, lysis or coagulation, which led to an IS value of 0.0 (Fig. 4). The IS values obtained for the negative control (0.9% NaCl) and the positive control (0.1 N NaOH) were 0.0 and 19.5, respectively. A more detailed evaluation of pictures taken from the chorioallantoic membrane was carried out analyzing grayscale images and assigning to each pixel a gray value (0 = black, 255 = white) as previously reported (McKenzie et al., 2015) (Fig. 5). A lower number correlates to more hemorrhaging. The results proved that none of the samples tested induced hemorrhage, having gray values around those of the negative control (146 ± 7) and in agreement with the IS value. In the case of the positive control, the gray value was 51 ± 5 . High cytocompatibility has also been previously reported for poly(pseudo) rotaxanes of poly- α -cyclodextrin and PEO-based copolymer (Simoes et al., 2014b).

3.7. Antifungal studies

The developed formulations were tested against *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* cultures *in vitro*. The antifungal activity of griseofulvin-loaded dispersions and gels was measured from inhibition zone diameters; no inhibition zones were observed for formulations without griseofulvin. As expected from the poor solubilizing capability, none antifungal activity was observed for drug-loaded α CD (10%) dispersion. Oppositely, the P123 and HEC solely dispersions and the P123 + α CD and P123 + HEC + α CD supramolecular gels led to inhibition zone diameters of 1.8–3.2 cm for *T. mentagrophytes* and 2.0–3.0 cm to *T. rubrum* (Table 4). The HEC + α CD gel showed the best antifungal activity for

Table 4
Bioadhesion work of dispersions and gels with and without griseofulvin, and antifungal efficacy of griseofulvin-loaded systems against two common species of dermatophytes.

Formulation	Bioadhesion work [mJ]		Zone of inhibition (cm)	
	Blank	Drug loaded	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>
P123 (14%)	0.011 (0.005)	0	3.0	3.0
HEC (2%)	0.087 (0.013)	0.079 (0.037)	2.2	2.2
α CD (10%)	0.003 (0.001)	0.008 (0.006)	0	0
P123 (14%)+HEC (2%)	0.127 (0.028)	0.036 (0.017)	3.1	2.4
HEC (2%)+ α CD (10%)	0.081 (0.024)	0.196 (0.047)	3.2	3.5
P123 (14%)+ α CD (10%)	1.378 (0.413)	2.112 (0.579)	3.1	2.0
P123 (14%)+HEC (2%)+ α CD (10%)	0.582 (0.215)	0.780 (0.041)	3.0	1.8

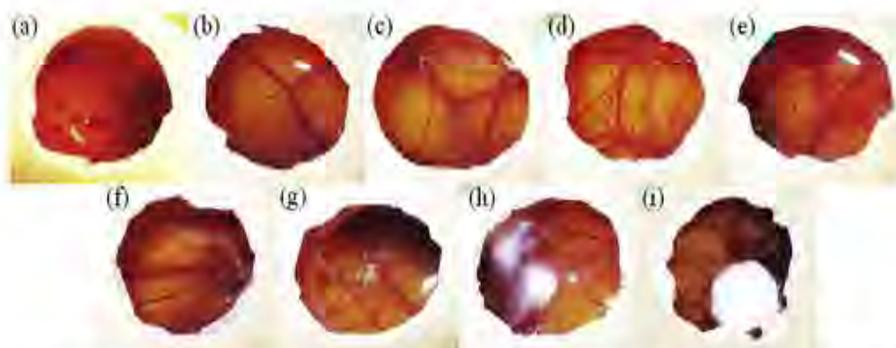


Fig. 4. HET-CAM test results of (a) positive and (b) negative controls, and of (c) P123 (14%), (d) HEC (2%), (e) α CD (10%), (f) P123 (14%)+HEC (2%), (g) HEC (2%)+ α CD (10%), (h) P123 (14%)+ α CD (10%), (i) P123 (14%)+HEC (2%)+ α CD (10%) systems.

both dermatophytes. The P123 (14%)+HEC (2%)+ α CD (10%) supramolecular gel caused a small inhibition zone diameter in against *T. rubrum* that grew with time, in good agreement with the griseofulvin sustained release. Overall, these findings indicate that the antifungal efficacy of griseofulvin is not lost by its incorporation in the formulations, and that the developed gels are effective against the most common dermatophytes in Western Europe and North and Central America.

4. Conclusion

Combinations of P123, HEC and α CD were evaluated to obtain binary and ternary supramolecular gels with improved features compared to in situ gelling P123 dispersions. The combination of P123 and HEC enhances griseofulvin apparent solubility in water, but leads to phase separation. Incorporation of α CD enables the formation of stable supramolecular gels by means of α CD threading along HEC and PEO blocks of P123 and subsequent interactions among the formed poly(pseudo) rotaxanes, which favor the physical cross-linking of the network, avoiding phase separation and increasing the viscoelastic moduli. Interestingly, compared to P123 + α CD gels, the presence of HEC in the ternary P123 + HEC + α CD supramolecular gels enhances the viscosity at room temperature and enables the tuning of bioadhesive properties and griseofulvin release at 37 °C. These features together with the satisfactory first screenings of biocompatibility and activity against *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* point out the ternary P123 + HEC + α CD supramolecular gels as a suitable platform for topical treatment of dermatophytosis. From a clinical point of view, these gels may widen the indications of use of griseofulvin, which are currently limited to the oral treatment of tinea capitis, avoiding systemic collateral effects. Interestingly, as the P123 + HEC + α CD gels can be delivered by means of a syringe, they could be also useful for depot formulations that can provide long-term sustained release of a variety of drugs.

Acknowledgements

Work supported by MINECO (SAF2014-52632-R) Spain and FEDER. Xelhua Marcos acknowledges CONACYT México, for a doctoral fellowship (204883) and a mobility grant for the stay at

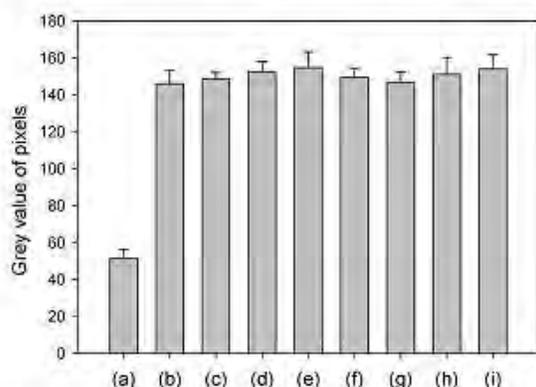


Fig. 5. Average gray value over distance of (a) positive and (b) negative controls, and of (c) P123 (14%), (d) HEC (2%), (e) α CD (10%), (f) P123 (14%)+HEC (2%), (g) HEC (2%)+ α CD (10%), (h) P123 (14%)+ α CD (10%), (i) P123 (14%)+HEC (2%)+ α CD (10%) systems.

the USC, as well as the Programa en Ciencias Químicas (UNAM) for its support. The authors thank L. Pereiro from USC for technical assistance, and Coren for providing fertilized hen eggs.

References

- Aggarwal, N., Goindi, S., Khurana, R., 2013. Formulation, characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. *Colloids Surf. B* 105, 158–166.
- Alexandridis, P., Holzwarth, J.F., Hatton, T.A., 1994. Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions—thermodynamics of copolymer association. *Macromolecules* 27, 2414–2425.
- Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., 2003. Effects of surfactants on gel behavior design implications for drug delivery systems. *Am. J. Drug Deliv.* 1, 77–101.
- Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Dubovik, A.S., Grinberg, N.V., Burova, T.V., Grinberg, V.Y., 2005. Temperature-sensitive chitosan-poly(*N*-isopropylacrylamide) interpenetrated networks with enhanced loading capacity and controlled release properties. *J. Control. Release* 102, 629–641.
- Alvarez-Lorenzo, C., Gonzalez-Lopez, J., Fernandez-Tarrio, M., Sanchez-Macho, I., Concheiro, A., 2007. Tetrionic micellization, gelation and drug solubilization: influence of pH and ionic strength. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66, 244–252.
- Beheshti, N., Zhu, K., Kjoniksen, A.L., Nystrom, B., 2007. Effects of beta-cyclodextrin and beta-cyclodextrin polymer addition and temperature on the modulation of hydrophobic interactions in aqueous solutions of two hydrophobically modified biopolymers. *J. Non-Crystal. Solids* 353, 3906–3914.
- Blanco-Fuente, H., Vila-Dorrio, B., Anguiano-Igea, S., Otero-Espinar, F.J., Blanco-Méndez, J., 1996. Tanned leather: a good model for determining hydrogels bioadhesion. *Int. J. Pharm.* 138, 103–112.
- Campana-Seoane, M., Peleteiro, A., Laguna, R., Otero-Espinar, F.J., 2014. Bioadhesive emulsions for control release of progesterone resistant to vaginal fluids clearance. *Int. J. Pharm.* 477, 495–505.
- Del Rosario, C., Rodriguez-Evora, M., Reyes, R., Simoes, S., Concheiro, A., Evora, C., Alvarez-Lorenzo, C., Delgado, A., 2015. Bone critical defect repair with poloxamine-cyclodextrin supramolecular gels. *Int. J. Pharm.* 495, 463–473.
- Del Valle, E.M.M., 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* 39, 1033–1046.
- Gaucher, G., Satturwar, P., Jones, M.C., Furtos, A., Leroux, J.C., 2010. Polymeric micelles for oral drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76, 147–158.
- Gupta, A.K., Williams, J.V., Zaman, M., Singh, J., 2009. In vitro pharmacodynamic characteristics of griseofulvin against dermatophyte isolates of *Trichophyton tonsurans* from tinea capitis patients. *Med. Mycol.* 47, 796–801.
- Harada, A., Li, J., Kamachi, M., 1993. Preparation and properties of inclusion complexes of poly(ethylene glycol) with alpha-cyclodextrin. *Macromolecules* 26, 5698–5703.
- Hoare, T.R., Kohane, D.S., 2008. Hydrogels in drug delivery: progress and challenges. *Polymer* 49, 1993–2007.
- Huang, F.H., Gibson, H.W., 2005. Polypseudorotaxanes and polyrotaxanes. *Prog. Polym. Sci.* 30, 982–1018.
- Kabanov, A.V., Batrakov, E.V., Alakhov, V.Y., 2002. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J. Control. Release* 82, 189–212.
- Karlberg, M., Piculell, L., Ragout, S., 2006. Gels of hydrophobically modified hydroxyethyl cellulose cross-linked by amylose. Competition with cyclodextrin. *Langmuir* 22, 2241–2248.
- Karlson, L., Thuresson, K., Lindman, B., 2002. A rheological investigation of the complex formation between hydrophobically modified ethyl(hydroxyethyl) cellulose and cyclodextrin. *Carbohydr. Polym.* 50, 219–226.
- Kästner, U., Hoffmann, H., Dönges, R., Ehrler, R., 1996. Interactions between modified hydroxyethyl cellulose (HEC) and surfactants. *Colloids Surf. A* 112, 209–225.
- Kedar, U., Phutane, P., Shidhaye, S., Kadam, V., 2010. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine* 5, 714–729.
- Kjoniksen, A.L., Calejo, M.T., Zhu, K.Z., Nystrom, B., Sande, S.A., 2014. Stabilization of pluronic gels in the presence of different polysaccharides. *J. Appl. Polym. Sci.* 131, 40465.
- Kozlov, M.Y., Melik-Nubarov, N.S., Batrakov, E.V., Kabanov, A.V., 2000. Relationship between Pluronic block copolymer structure, critical micellization concentration and partitioning coefficients of low molecular mass solutes. *Macromolecules* 33, 3305–3313.
- McKenzie, B., Kay, G., Matthews, K.H., Knott, R.M., Cairns, D., 2015. The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a cysteamine-containing gel: quantification using Photoshop® and ImageJ. *Int. J. Pharm.* 490, 1–8.
- Nguyen, Q.V., Huynh, D.P., Park, J.H., Lee, D.S., 2015. Injectable polymeric hydrogels for the delivery of therapeutic agents: a review. *Eur. Polym. J.* 72, 602–619.
- Nishiyama, N., Kataoka, K., 2006. Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacol. Ther.* 112, 630–648.
- Pradal, C., Jack, K.S., Grondahl, L., Cooper-White, J.J., 2013. Gelation kinetics and viscoelastic properties of pluronic and alpha-cyclodextrin-based pseudopolyrotaxane hydrogels. *Biomacromolecules* 14, 3780–3792.
- Puskas, I., Schrott, M., Malanga, M., Szenté, L., 2013. Characterization and control of the aggregation behavior of cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 75, 269–276.
- QingQing, P., Ping, G., Jiong, D., Qiang, C., Hui, L., 2012. Comparative crystal structure determination of griseofulvin: powder X-ray diffraction versus single-crystal X-ray diffraction. *Chin. Sci. Bull.* 57, 3867–3871.
- Rappoport, N., 2007. Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. *Prog. Polym. Sci.* 32, 962–990.
- Rodríguez, R., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., 2003. Interactions of ibuprofen with cationic polysaccharides in aqueous dispersions and hydrogels. Rheological and diffusional implications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 20, 429–438.
- Rodríguez-Tenreiro, C., Alvarez-Lorenzo, C., Rodríguez-Pérez, A., Concheiro, A., Torres-Labandeira, J.J., 2006. New cyclodextrin hydrogels cross-linked with diglycidylethers with a high drug loading and controlled release ability. *Pharm. Res.* 23, 121–130.
- Saboktakin, M.R., Tabatabaei, R.M., 2015. Supramolecular hydrogels as drug delivery systems. *Int. J. Biol. Macromol.* 75, 426–436.
- Schmolka, L.R., 1972. Artificial skin. I. Preparation and properties of Pluronic F-127 gels for treatment of burns. *J. Biomed. Mater. Res.* 6, 571–582.
- Shen, J., Xin, X., Zhang, Y., Song, L., Wang, L., Tang, W., Ren, Y., 2015. Manipulation the behavior of supramolecular hydrogels of alpha-cyclodextrin/star-like block copolymer/carbon-based nanomaterials. *Carbohydr. Polym.* 117, 592–599.
- Simoes, S.M.N., Veiga, F., Torres-Labandeira, J.J., Ribeiro, A.C.F., Sanchez-Macho, M.L., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., 2012. Syringeable Pluronic-alpha-cyclodextrin supramolecular gels for sustained delivery of vancomycin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80, 103–112.
- Simoes, S.M.N., Veiga, F., Torres-Labandeira, J.J., Ribeiro, A.C.F., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., 2014a. Syringeable self-assembled cyclodextrin gels for drug delivery. *Curr. Top. Med. Chem.* 14, 494–509.
- Simoes, S.M.N., Veiga, F., Ribeiro, A.C.F., Figueiras, A.R., Tabaoda, P., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., 2014b. Supramolecular gels of poly-alpha-cyclodextrin and PEO-based copolymers for controlled drug release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87, 579–588.
- Simoes, S.M.N., Rey-Rico, A., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., 2015. Supramolecular cyclodextrin-based drug nanocarriers. *Chem. Commun.* 51, 6275–6289.
- Sivashanmugam, A., Arun Kumar, R., Vishnu Priya, M., Nair, V.S., Jayakumar, R., 2015. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *Eur. Polym. J.* 72, 543–565.
- Sosnik, A., Raskin, M.M., 2015. Polymeric micelles in mucosal drug delivery: challenges towards clinical translation. *Biotechnol. Adv.* 33, 1380–1392.
- Travelet, C., Schlatter, G., Hebraud, P., Brochon, C., Lapp, A., Hadziioannou, G., 2009. Formation and self-organization kinetics of alpha-CD/PEO-based pseudopolyrotaxanes in water. a specific behavior at 30 degrees C. *Langmuir* 25, 8723–8734.
- Wang, Y.M., Wang, P.G., 2013. Polysaccharide-based systems in drug and gene delivery. *Preface. Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 1121–1122.
- Wintgens, V., Daoud-Mahammed, S., Gref, R., Bouteiller, L., Amiel, C., 2008. Aqueous polysaccharide associations mediated by beta-cyclodextrin polymers. *Biomacromolecules* 9, 1434–1442.
- Yang, Y., Tsui, C.P., Tang, C.Y., Qiu, S., Zhao, Q., Cheng, X., Sun, Z., Li, R.K.Y., Xie, X., 2010. Functionalization of carbon nanotubes with biodegradable supramolecular polypseudorotaxanes from grafted-poly(ϵ -caprolactone) and α -cyclodextrins. *Eur. Polym. J.* 46, 145–155.
- Zhou, Y.X., Fan, X.D., Xue, D., Xing, J.W., Kong, J., 2013. Thermosensitive supramolecular hydrogels from atom transfer radical polymerization of polypseudorotaxanes self-assembled by triblock copolymer and alpha-cyclodextrins. *React. Funct. Polym.* 73, 508–517.

5.2 Fundamentos de las Técnicas Experimentales

5.2.1. Fundamento de Viscosidad Intrínseca:

La viscosidad intrínseca representa la capacidad de un polímero para incrementar la viscosidad de la disolución. Se sabe que la viscosidad es proporcional al tiempo del flujo multiplicado por la densidad de la disolución; y a concentraciones diluidas, la densidad de la disolución se considera igual que la del disolvente [76].

Determinando el tiempo empleado por la disolución en recorrer el capilar de un viscosímetro y comparándolo con el disolvente puro, podemos definir una viscosidad relativa en función del tiempo (7.1); que a su vez permite la determinación de la viscosidad específica e intrínseca (7.2 y 7.3)

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} \quad (5.1)$$

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \eta_{rel} - 1 \quad (5.2)$$

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{c} \right) \quad (7.3)$$

Donde η_0 es la viscosidad del disolvente, η es a viscosidad de la disolución y c es la concentración en g/dL. La Figura 5.1 muestra los resultados de η_r vs C obtenidos en este trabajo; se observa una tendencia que se ajusta a un polinomio de segundo grado en la cual, si la intersección con el eje de las ordenadas es 1, la constante del término lineal es la viscosidad intrínseca:

$$\eta_{rel} = 1 + Ac + Bc^2 \quad \dots\dots\dots (5.4)$$

$$[\eta] = \left(\frac{\eta_{rel} - 1}{c} \right)_{c \rightarrow 0} = A$$

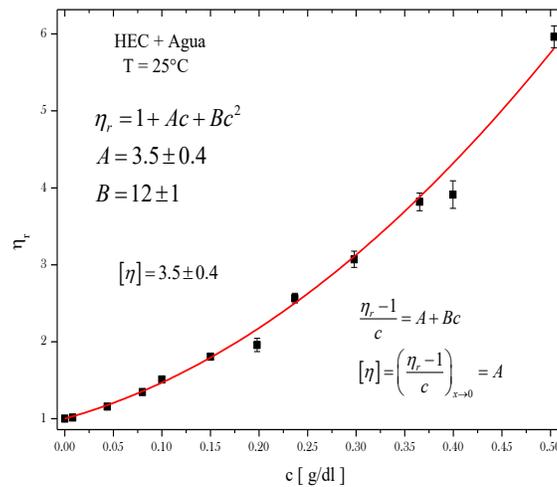


Figura 5.1. Datos de viscosidad reducida vs concentración para HEC a 298.15 K.

La viscosidad intrínseca puede relacionarse con la masa molar por medio de la ecuación de Mark-Houwink lo que brinda la posibilidad de calcular la masa molar promedio del polímero:

$$[\eta] = KM^\alpha \tag{5.5}$$

$$M = \left(\frac{[\eta]}{K} \right)^{\frac{1}{\alpha}} = \left(\frac{3.5}{1.03 \times 10^{-4}} \right)^{\frac{1}{0.82}} = 335653 \text{ gmol}^{-1}$$

Donde M es la masa molar, K y α son constantes experimentales que dependen del disolvente empleado y de la temperatura. En este caso el disolvente es agua y los valores de $\alpha = 0.82 \pm 0.07$ y $K = 1.03 \times 10^{-4}$.

5.2.2. Fundamento del Método de Gota Pendiente

Esta técnica se basa en suspender una gota del líquido muestra en la punta de un capilar por un tiempo determinado. Con la cámara acoplada al equipo se toma una fotografía del perfil de la gota desde el tiempo igual a cero ($t=0$), donde la superficie no está ocupada por moléculas de tensoactivo hasta un tiempo t ($t=t$), donde las moléculas de tensoactivo ocupan la superficie. El perfil de la gota está determinado por dos fuerzas de gravedad que jala la gota hacia abajo, y la segunda fuerza que es la tensión superficial que intenta darle una forma esférica a la gota para disminuir su superficie. El cambio en la curvatura de la gota es una medida del equilibrio entre las fuerzas, el cual es descrito por la ecuación de Young-Laplace para casos no esféricos en un campo gravitatorio [49, 77].

La ecuación de Young-Laplace establece la relación entre curvaturas, tensión superficial y la diferencia de presiones en fases fluidas, resultado de la competencia entre los trabajos volumétrico y superficial. La forma de una superficie depende de la diferencia de presiones entre las fases que la conforman

$$\Delta P = \frac{2\sigma}{r} \quad (5.6)$$

Donde ΔP es la diferencia de presiones, σ es la tensión superficial y r es el radio de la curvatura de las gotas. De acuerdo a la ecuación, la diferencia de presiones se incrementa conforme el radio disminuye. Para las superficies no esféricas, se consideran los radios de curvatura R_1 y R_2 (Dibujo de gota con radios)

$$\Delta P = \sigma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (5.7)$$

Así el software del equipo analiza de forma digital el perfil de la gota con la ecuación de Young-Laplace obteniéndose los valores de tensión superficial dinámica.

5.2.3. Fundamento de Calorimetría Diferencial de Barrido

La técnica se fundamenta en el hecho de que al incrementar la temperatura de un material, el sistema tiende a elevar sus estados de energía. Este cambio puede ocurrir de manera dramática si el sistema sufre un cambio cooperativo en su estructura. Algunos ejemplos biológicos son las transiciones termotrópicas: cambio de gel a cristal líquido de lípidos, el desplegamiento térmico de las proteínas y la fusión inducida por la temperatura en el caso del ADN. La característica común de estas transiciones es que son cambios altamente cooperativos en el estado estructural del sistema a través de un estrecho intervalo de temperatura.

Si asumimos que el sistema de estudio puede existir en cualquiera estado A o B, en un intervalo finito de temperatura, la concentración de equilibrio de las dos formas puede ser escrita en términos de una constante de equilibrio:

$$K = \frac{[B]}{[A]} \quad (5.8)$$

Así, si la fracción ocupacional del estado B (con mayor entalpía) es denotada como f , entonces

$$K = \frac{f}{(1-f)}, \text{ despejando } f$$

$$f = \frac{K}{(1+K)} \quad (5.9)$$

Por otra parte. El cambio en la energía estándar de Gibbs para la reacción está dada por:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ = -RT \ln K \quad (5.10)$$

Donde ΔH° y ΔS° son los cambio de entalpía y entropía estándar de la reacción, respectivamente. Cuando ΔG° es cercano a cero, el sistema puede existir como una mezcla de dos estados. La temperatura a la cual los dos estados son igual de probables se le llama temperatura de fusión (T_m , melting temperatura). En la T_m la diferencia en la energía de Gibbs para los dos estados es cero

$$T_m = \frac{\Delta H^\circ}{\Delta S^\circ} \quad (5.11)$$

Mientras que la entalpía de los sistemas como función de la temperatura puede ser calculada como

$$\Delta H = \frac{\Delta H^\circ K}{1+K} \quad (5.12)$$

El resultado se muestra en una curva, la cuál es la entalpía como función de la temperatura para el sistema. La derivada de esta curva es igual a la capacidad térmica de exceso C_p dada por

$$C_p = \frac{d(\Delta H)}{dT} = \frac{K(1+K)^2 \Delta H^{\circ 2}}{RT^2} \quad (5.13)$$

Esta función se muestra en la figura 1B, la cual es obtenida directamente por la calorimetría diferencial de barrido. La curva de la capacidad térmica proporciona información muy útil como:

- (i) La entalpía de la transición del estado A al B, que puede calcularse como el área bajo la curva del gráfico (ΔH°).
- (ii) La temperatura de fusión (T_m) es aproximadamente la temperatura a la cual C_p es máxima y ΔG° es cero.
- (iii) El cambio de entropía para la transición puede ser calculado a partir de T_m , ya que es igual a $\frac{\Delta H^\circ}{\Delta S^\circ}$.

Tanto el ancho como el alto de la curva de transición se relacionan con la pureza de los compuestos y la cooperatividad natural de la transición. En el caso de desplagamiento de proteínas, la validez de los dos estados asumidos; pueden ser rigurosamente establecidos por la comparación del cambio de entalpía total con el ancho y alto de la curva de C_p . Por otra parte, la presencia de impurezas induciría un ensanchamiento de la curva de C_p .

7.2.4. Fundamentos de Dispersión Dinámica de Luz

La dispersión dinámica de luz utiliza la teoría de dispersión de Rayleigh (para partículas pequeñas y esféricas), la teoría de Mie (partículas esféricas de tamaño superior a la longitud de onda) y la teoría de Stokes-Einstein (la cual no considera la estructura molecular sino las fluctuaciones del índice de refracción). Permitiendo obtener información dinámica de las partículas coloidales que se mueven al azar como el coeficiente de difusión y el radio hidrodinámico.

Cuando una partícula recibe una radiación, cierta cantidad es dispersada (fenómeno de dispersión), debido a la interacción radiación-materia (Figura 5.2) Al iluminar una partícula con un láser, la luz se dispersará en todas las direcciones; y al colocar una pantalla cerca a la partícula, la pantalla puede ser iluminada por la luz dispersada, mostrando patrones de manchas (áreas brillantes y oscuras).

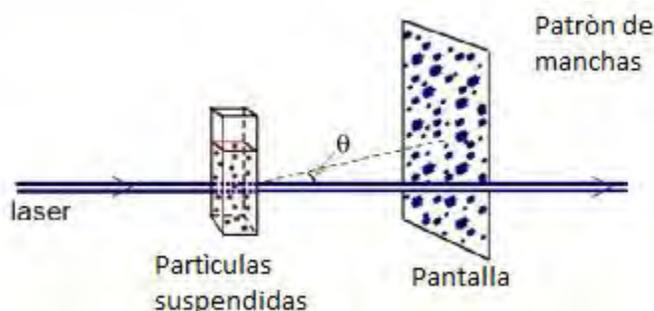


Figura. 5.2. Patrón de manchas obtenidas por el fenómeno de dispersión de luz.

A medida que las partículas se mueven alrededor, la luz dispersada hará que las áreas brillantes y oscuras crezcan y disminuyan en intensidad, permitiendo la medición de las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada (resultado del movimiento Browniano). Las partículas pequeñas causan fluctuaciones de intensidad más rápidamente que las grandes, así se forma un espectro.

El espectro de frecuencias contenido en las fluctuaciones de intensidad provenientes del movimiento Browniano de las partículas, se mide mediante un auto-correlacionador digital. Un correlacionador es básicamente un comparador de señales. Este es diseñado para medir el grado de similitud entre dos señales, o de una señal consigo misma a intervalos de tiempo variables. La velocidad del movimiento Browniano es definida por una propiedad conocida como coeficiente de difusión translacional (D).

Por lo que la dispersión dinámica de luz, mide las fluctuaciones (resultado del movimiento Browniano) mediante la intensidad de dispersión con respecto al tiempo. Donde la velocidad del movimiento es definida por una propiedad conocida como coeficiente de difusión translacional (D).

Conocido el coeficiente de difusión, es posible conocer el tamaño de las partículas en la disolución mediante la ecuación de Stokes-Einstein (suponiendo a dilución infinita y la ausencia de interacciones entre las partículas esféricas).

$$d_h = \frac{kT}{3\eta\pi D} \quad (5.14)$$

Donde d_h es el diámetro hidrodinámico; D es el coeficiente de difusión translacional; k es la constante de Boltzman; T es la temperatura absoluta y η es la viscosidad. Una vez obtenido el diámetro hidrodinámico se obtiene los parámetros de distribución en función de la intensidad, el volumen y número.

5.3. Datos Experimentales

5.3.1. Datos de la curva de calibración de amiodarona en agua.

Tabla A1. Datos de absorbancia para la realización de la curva de calibración.

Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Desviación	Promedio
5,08	0,090	0,042	0,114	0,159	0,049	0,101
10,16	0,217	0,155	0,286	0,320	0,073	0,244
15,24	0,358	0,395	0,440	0,515	0,067	0,427
20,32	0,544	0,591	0,628	0,660	0,050	0,606
25,41	0,682	0,711	0,755	0,859	0,077	0,752
30,49	0,890	0,805	0,910	1,041	0,097	0,912

5.3.2. Datos de tensión superficial dinámica de la Figuras 2.5 y 2.6.

Tabla A2. Datos dinámicos de tensión superficial para dos experimentos de la solución de (P123 [0.003 % m/m]+ H₂O).

(P123 (0,003%) + H ₂ O)							
Experimento 1				Experimento 2			
t	t ⁻¹	(t ^{1/2}) ⁻¹	σ _{eq}	t	t ⁻¹	(t ^{1/2}) ⁻¹	σ _{eq}
(s)	(s ⁻¹)	(s ^{-1/2})	(mNm ⁻¹)	(S)	(s ⁻¹)	(s ^{-1/2})	(mNm ⁻¹)
0	--	--	59,33	47,912	0,02087	0,14447	48,05
47,912	0,02087	0,14447	44,06	95,824	0,01044	0,10216	42,91
95,824	0,01044	0,10216	41,32	143,737	0,00696	0,08341	40,76
143,737	0,00696	0,08341	39,7	191,649	0,00522	0,07223	39,46
191,649	0,00522	0,07223	38,65	239,562	0,00417	0,06461	38,41
239,562	0,00417	0,06461	37,97	286,476	0,00349	0,05908	37,95
287,475	0,00348	0,05898	37,39	334,389	0,00299	0,05469	37,27
335,387	0,00298	0,0546	37,02	383,299	0,00261	0,05108	36,91
383,3	0,00261	0,05108	36,66	431,212	0,00232	0,04816	36,58
431,212	0,00232	0,04816	36,39	479,124	0,00209	0,04569	36,34
479,125	0,00209	0,04569	36,24	527,037	0,0019	0,04356	36,19
527,037	0,0019	0,04356	36,02	573,951	0,00174	0,04174	35,94
573,951	0,00174	0,04174	35,91	621,879	0,00161	0,0401	35,76
621,864	0,00161	0,0401	35,79	669,792	0,00149	0,03864	35,65
669,776	0,00149	0,03864	35,64	717,704	0,00139	0,03733	35,51
717,689	0,00139	0,03733	35,5	765,617	0,00131	0,03614	35,47
765,601	0,00131	0,03614	35,41	813,529	0,00123	0,03506	35,32
814,512	0,00123	0,03504	35,33	861,441	0,00116	0,03407	35,28
862,425	0,00116	0,03405	35,2	909,354	0,0011	0,03316	35,14
910,337	0,0011	0,03314	35,16	957,266	0,00104	0,03232	35,1
958,25	0,00104	0,0323	35,06	1005,179	9,95E-04	0,03154	35,01
1006,162	9,94E-04	0,03153	35,02	1053,091	9,50E-04	0,03082	35
1054,075	9,49E-04	0,0308	34,97	1101,004	9,08E-04	0,03014	34,91
1100,989	9,08E-04	0,03014	34,91	1148,916	8,70E-04	0,0295	34,87
1148,901	8,70E-04	0,0295	34,82	1196,829	8,36E-04	0,02891	--
1196,814	8,36E-04	0,02891	34,76	1244,741	8,03E-04	0,02834	34,72
1244,726	8,03E-04	0,02834	34,75	1292,654	7,74E-04	0,02781	34,69
1292,639	7,74E-04	0,02781	34,7	1340,566	7,46E-04	0,02731	34,66

Experimento 1				Experimento 2			
t (S)	t ⁻¹ (s ⁻¹)	(t ^{1/2}) ⁻¹ (s ^{-1/2})	σ _{eq} (mNm ⁻¹)	t (S)	t ⁻¹ (s ⁻¹)	(t ^{1/2}) ⁻¹ (s ^{-1/2})	σ _{eq} (mNm ⁻¹)
1436,376	6,96E-04	0,02639	34,59	1484,303	6,74E-04	0,02596	34,55
1484,289	6,74E-04	0,02596	34,49	1532,216	6,53E-04	0,02555	34,5
1533,2	6,52E-04	0,02554	34,51	1628,041	6,14E-04	0,02478	34,43
1580,114	6,33E-04	0,02516	34,4	1723,866	5,80E-04	0,02409	34,35
1628,027	6,14E-04	0,02478	34,38	1771,778	5,64E-04	0,02376	34,34
1675,939	5,97E-04	0,02443	34,35	1819,691	5,50E-04	0,02344	34,3
1723,852	5,80E-04	0,02409	34,32	1867,603	5,35E-04	0,02314	34,27
1771,764	5,64E-04	0,02376	34,27	1915,516	5,22E-04	0,02285	34,26
1819,677	5,50E-04	0,02344	34,3	1963,428	5,09E-04	0,02257	34,24
1867,589	5,35E-04	0,02314	34,28	2011,341	4,97E-04	0,0223	34,19
1915,502	5,22E-04	0,02285	34,19	2059,253	4,86E-04	0,02204	34,19
1964,412	5,09E-04	0,02256	34,21	2107,166	4,75E-04	0,02178	34,18
2012,325	4,97E-04	0,02229	34,15	2155,078	4,64E-04	0,02154	34,22
2060,237	4,85E-04	0,02203	34,12	2202,991	4,54E-04	0,02131	34,1
				2250,903	4,44E-04	0,02108	34,06
				2298,815	4,35E-04	0,02086	34,06
				2346,728	4,26E-04	0,02064	34,04

5.3.3. Datos de tensión al equilibrio obtenidos con la ecuación de Ward y Tordai para tiempos largos, Figuras 2.7 y 2.10.

Tabla A3. Datos de tensión superficial al equilibrio para los sistemas (P123 + H₂O) y (HEC + H₂O).

(P123 _x + H ₂ O)		(HEC + H ₂ O)	
<i>x</i> _{P123}	σ _{eq} (mNm ⁻¹)	<i>x</i> _{HEC}	σ _{eq} (mNm ⁻¹)
3,13E-11	72,13 ± 0,02	5,37E-11	61,15 ± 1,42
9,39E-11	72,28 ± 0,33	4,52E-10	61,41 ± 0,95
1,57E-10	71,57 ± 0,19	2,07E-09	61,2 ± 1,67
3,13E-10	70,15 ± 0,09	1,34E-08	60,15 ± 0,95
6,26E-10	68,47 ± 1,01	4,68E-08	60,89 ± 0,50
7,50E-10	67,74 ± 0,09	5,43E-07	59,03 ± 0,59
9,39E-10	44,02 ± 0,03	1,10E-06	59,12 ± 0,85

(P123 _x + H ₂ O)	
x_{P123}	$\sigma_{eq}/(mNm^{-1})$
1,57E-09	42,00 ± 0,28
4,70E-09	39,4 ± 0,26
7,83E-09	38,59 ± 0,65
1,57E-08	37,38 ± 0,29
3,13E-08	36,13 ± 0,42
6,26E-08	35,81 ± 0,2
9,39E-08	33,95 ± 0,29
1,57E-07	33,62 ± 0,32
1,91E-07	32,32 ± 0,32
2,13E-07	32,62 ± 1,01
3,13E-07	31,69 ± 0,5
5,01E-07	32,12 ± 0,29
6,26E-07	32,16 ± 0,32
8,77E-07	32,71 ± 0,65
1,13E-06	32,58 ± 0,45
1,93E-06	32,08 ± 0,29
3,73E-06	32,32 ± 0,42
1,57E-05	32,71 ± 0,2

Tabla A4. Datos de tensión superficial al equilibrio para los sistemas (P123 + H₂O) + HEC [0.001 % m/m] y (P123 + H₂O) + HEC [0.005 % m/m].

(P123 _x + H ₂ O) + HEC [0.001 %]			(P123 + H ₂ O) + HEC [0.005 %]		
x_{P123}	s_{eq} (mNm ⁻¹)		x_{P123}	s_{eq} (mNm ⁻¹)	
1,57E-10	65,78 ±	1	1,57E-10	63,45 ±	0,68
3,13E-10	65,08 ±	1,2	3,13E-10	62,84 ±	0,56
4,70E-10	62,89 ±	0,79	6,26E-10	64,37 ±	0,84
6,26E-10	63,24 ±	0,98	9,39E-10	62,63 ±	0,57
9,39E-10	48,61 ±	0,76	1,57E-09	63,6 ±	0
1,57E-09	45,98 ±	0,35	4,70E-09	56,35 ±	0,68
3,13E-09	42,66 ±	0,37	7,83E-09	47,57 ±	0,39
4,70E-09	41,9 ±	0,43	1,57E-08	43,31 ±	0,6
7,83E-09	41,13 ±	0,02	2,35E-08	39,75 ±	0,05

(P123 _x + H ₂ O) + HEC [0.001 %]			(P123 + H ₂ O) + HEC [0.005 %]		
x_{P123}	σ_{eq} (mNm ⁻¹)		x_{P123}	σ_{eq} (mNm ⁻¹)	
1,57E-08	40,08 ±	0,28	3,13E-08	36,8 ±	0,42
2,35E-08	37,45 ±	0,66	6,26E-08	37,548 ±	0,3
3,13E-08	36,14 ±	0,77	9,39E-08	35,174 ±	0,43
6,26E-08	34,58 ±	0,33	1,25E-07	33,9 ±	0,25
9,39E-08	33,56 ±	0,53	1,57E-07	33,602 ±	0,43
1,25E-07	32,76 ±	0,58	1,88E-07	31,88 ±	0,25
1,57E-07	32,74 ±	0,61	2,19E-07	31,93 ±	0,49
1,88E-07	32,05 ±	0,4	2,50E-07	32,13 ±	0,51
1,91E-07	32,14 ±	0,68	2,82E-07	32,4 ±	0,44
2,19E-07	32,01 ±	0,54	3,13E-07	32,6 ±	0,18
2,50E-07	31,62 ±	0,45	8,77E-07	32,71 ±	0,14
3,13E-07	31,11 ±	0,64	1,13E-06	32,58 ±	0,15
4,70E-07	31,48 ±	0,27	1,93E-06	32,08 ±	0,77
6,26E-07	32,08 ±	0,47			
9,39E-07	32,48 ±	0,34			
1,91E-06	32,38 ±	0,58			