Recepción: julio 2014
Aceptación/publicación: agosto/septiembre 2014

REVISTA CUBANA DE Química

Síntesis y caracterización de materiales nanoestructurados obtenidos por el método sol-gel, cargados con drogas antiepilépticas

Synthesis and Characterization of Nanostructured Materials obtained by the Sol-Gel Method, loaded with Antiepileptic Drugs

Dra. Mayra González-Hurtado,[I, II] Dr. Jacques Rieumont-Briones,[III] Dra. Tessy López-Goerne,[IV, V] Laura M. Castro-González[III]

[I]Centro de Ingeniería e Investigaciones Químicas CIIQ, La Habana, Cuba; [II]Instituto de Ciencia y Tecnología de los Materiales IMRE, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba; [III]Facultad de Química, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba; [IV]Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, México, D.F.; [V]Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México, D.F.

mayra.hurtado@infomed.sld.cu, jacques@fq.uh.cu, tessy@xanum.uam.mx, lmcastr@fq.uh.cu

• Resumen

La epilepsia es el trastorno crónico del cerebro caracterizado por convulsiones o ataques repetidos. Dentro de los fármacos más utilizados para este tipo de padecimiento se encuentra la fenitoína y el ácido valproico. Sin embargo, estos fármacos presentan efectos secundarios al paciente cuando son administrados por vía oral o intravenosa, por lo que su tendencia actual es que los mismos sean suministrados al paciente a través de los sistemas de liberación controlada. El presente trabajo tiene como objetivo proponer un método eficaz para sintetizar materiales nanoestructurados cargados con fármacos utilizando como portador una matriz inerte que es obtenida por el método sol-gel con diferentes relaciones alcoxido:agua. Las matrices se caracterizaron por las técnicas de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, microscopia electrónica de barrido, isoterma de adsorción y difracción de rayos X. Se encontró que los materiales nanoestructurados pueden ser utilizados en implantes por su alta compatibilidad.

Palabras clave: materiales nano-estructurados, sol-gel, titanio, antiepilépticos.

• Abstract

Epilepsy is a chronic brain disorder characterized by repeated attacks or seizures. Some of the most important drugs used for this kind of disease are phenytoin and valproic acid, however these drugs have side effects to the patient when administered orally or intravenously.

Nowadays a current trend is to supply it to the patient through controlled release systems. This paper aims to propose an effective method to synthesize nanostructured materials loaded with drugs utilizing an inert carrier matrix obtained by the sol-gel method with different ratios of alkoxide:water. The matrices were characterize by infrared spectroscopy techniques and Fourier transform, scanning electron microscopy, adsorption isotherm and X-ray diffraction. It was found that the nanostructured materials can be used for implants because of their high compatibility.

Keywords: nano-structured materials, sol-gel, titanium, antiepileptic.

• Introducción

Diseñar tecnologías de liberación controlada es cada vez más importante y necesario en el área farmacéutica, ya que los fármacos de liberación controlada presentan ventajas respecto a otras formas farmacéuticas, entre ellas, la disminución de los efectos colaterales o secundarios y el tiempo de actividad prolongado en el organismo, así como la protección a los fármacos sensibles a ataques enzimáticos o degradación ácida debido al pH local /1/. La inclusión del principio activo en un sistema de liberación controlada mejora su eficacia terapéutica y puede llegar a aumentar su estabilidad y reducir los trastornos producidos al paciente /2/. En la actualidad el proceso de sol-gel /3/ ha emergido como una plataforma prometedora para la inmovilización, estabilización y el encapsulamiento de moléculas biológicas, tales como: enzimas, anticuerpos, microrganismos y una gran variedad de fármacos.

Las matrices obtenidas por este método son químicamente inertes, hidrofílicas y de fácil síntesis, además de que poseen alta resistencia mecánica, estabilidad térmica en amplios rangos de temperatura, y absorben de modo insignificante solventes orgánicos en comparación con otros polímeros orgánicos. Una ventaja adicional es que proporciona viabilidad a las moléculas encapsuladas, ya que estas matrices actúan como reservorios de agua, ayudando así a mantener la actividad biológica de las enzimas, anticuerpos y células, y en el caso de fármacos el nivel de hidratación necesario para la molécula. Por otro lado, estas matrices son resistentes al ataque microbiano y exhiben alta biocompatibilidad con el organismo, por lo que se prestan para su implante *in situ* en el tratamiento de distintas

enfermedades. Los materiales que alojan en su interior los fármacos han sido manipulados con la finalidad de lograr que sean liberados en el sitio específico de acción /4/.

Actualmente los tratamientos farmacológicos recomendados para la epilepsia son vía sistémica, y con frecuencia se presentan picos titulares, por lo que las crisis se pueden presentar aun con el tratamiento médico /5/. Un aspecto importante en la medicación es la periodicidad y constancia de las tomas de los fármacos por parte del paciente, lo cual implica que no debe haber olvidos y que la medicina debe estar siempre al alcance del paciente. Además, si se considera que la mayor parte de los tratamientos son sintomáticos, es decir que su interrupción suele provocar la reaparición de las crisis, su administración se prolonga durante años, en ocasiones toda la vida, esto exige una valoración especial de aspectos tales como la toxicidad, comodidad de administración y cumplimiento terapéutico.

El ácido valproico y la fenitoína son medicamentos de amplio espectro utilizados en la epilepsia, ya que protegen contra las crisis generalizadas y las crisis parciales complejas. Su mecanismo de acción es aumentar los niveles de GABA, y hasta la fecha se desconoce cuáles son los sitios blancos sobre los que actúa en el Sistema Nervioso Central /6/.

El presente trabajo estuvo encaminado en la obtención y caracterización físico-química de materiales nanoestructurados cargados con antiepilépticos (fenitoína y ácido valproico), para lo cual fue necesario optimizar los parámetros de síntesis durante el proceso de obtención de estos materiales. La ventaja de disponer de estos fármacos radica en que utilizados en forma nanoestructurada poseen un área superficial elevada, debido a sus dimensiones nanométricas, que favorecen el contacto con las membranas celular e intestinal, lo que optimiza la absorción de los mismos.

• Materiales y métodos

- Principios activos: fenitoína, $C_{15}H_{12}N_2O_2$, ácido valproico, $C_8H_{16}O_2$, ambos SIGMA (USA).
- Solvente: etanol (calidad reactivo), MERCK, Alemania.
- n-butóxido de titanio $Ti(OC_4H_9)_4$ (ALDRICH 97 %) USA.

Síntesis de los materiales nanoestructurados por el método sol-gel

Una mezcla de los principios activos fenitoína, ácido valproico (figura 1), etanol y agua fue colocada en un reactor a temperatura ambiente y con agitación constante; después de 30 min el n-butóxido de titanio fue añadido gota a gota sobre la solución. Finalmente, el alcohol fue eliminado y los materiales nanoestructurados obtenidos de titanio-fármaco fueron secados a 30 ^{o}C en una estufa de vacío. Las concentraciones experimentales en cada caso son expuestas en la tabla 1.

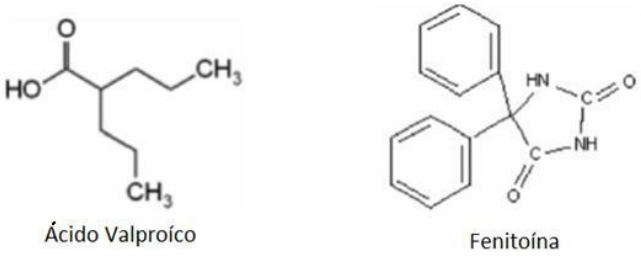


Fig. 1 Fórmula química del ácido valproico y la fenitoína

Tabla 1. Condiciones experimentales de la nanoencapsulación de fenitoína y ácido valproico. Método sol-gel

Exp.	p.a (mg)	Ti(OBut) (mol)	H_2O (mol)	Etanol (mol)
TiO_2(OH)-Fenit-1 (1:4:16)	50	0,25	4	1
TiO_2(OH)-Fenit-2 (1:4:16)	100	0,25	4	1
TiO_2(OH)-Fenit-3 (1:4:16)	250	0,25	4	1
TiO_2(OH)-AV-1 (1:8:8)	100	0,25	2	2
TiO_2(OH)-AV-2 (1:8:8)	400	0,25	2	2
TiO_2(OH)-AV-3 (1:8:8)	800	0,25	2	2

La cantidad de reactivos empleados en todos los experimentos fue estequiométricamente ajustada para obtener 20 g de TiO_2OH.

Determinación del rendimiento de las partículas

Para determinar el rendimiento de encapsulación se pesó el contenido total de los materiales nanoestructurados obtenidos en cada experimento y, conociendo la masa exacta del principio activo y la masa de los materiales nanoestructurados que se empleó en la preparación de las mismas, se aplicó la siguiente ecuación:

$$R.E\ (\%m/m) = \frac{mt}{mp.a + m.referencia} * 100 \qquad (1)$$

donde:

R.E: es el rendimiento de encapsulación (%)

m.t: es la masa total de nanopartículas obtenidas (mg)

mp.a: es la masa del principio activo (mg)

m.referencia: es la masa de sol-gel obtenida sin principio activo (mg)

Determinación de la eficiencia de encapsulación

Se pesaron 100 mg de los materiales nanoestructurados obtenidos y se diluyó en 100 mL del medio intestinal (pH = 7,4). Las soluciones resultantes se leyeron espectrofotométricamente a la longitud de onda indicada para cada fármaco. Luego, se calculó la eficiencia de encapsulación (EE) a partir de la relación de la masa encapsulada experimental y teórica, según la siguiente ecuación:

$$EE\ (\%) = \frac{m\exp}{mteo} \cdot 100 \qquad (2)$$

donde:

E.E: es la eficiencia de encapsulación (%)

m exp: es la masa encapsulada experimentalmente (mg)

m teo: es la masa encapsulada teóricamente (mg)

Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Para analizar la morfología se empleó un microscopio electrónico de barrido (SEM). Las muestras fueron depositadas sobre una cinta de carbón de doble cara; se recubrieron con oro en un equipo Jeol JFC1100 Tokio, Japón, y se observaron en el microscopio electrónico de barrido.

Programa para determinar el diámetro de las partículas

Para la determinación del diámetro de las partículas se utilizó el programa de computación BOLERO, versión 2.0 1997, AQ Systems, J. A. Holgado y F. Galisteo. Este programa permite analizar, de forma automática, las partículas contenidas en una o varias imágenes (generalmente fotografías), además de determinar el diámetro promedio y estimar el error.

Espectrofotometría Ultra Violeta Visible (UV)

Con un equipo de espectrofotometría U.V (marca U.Vis modelo UNICAM V 530 Inglatera) se analizaron los materiales nanoestructurados y la fenitoína a una longitud de onda de 232 nm. Se trabajó a temperatura ambiente con 40 % de humedad relativa. La curva de calibración utilizada fue C = 2,323 4 = 0,011 2 y un coeficiente de correlación r^2 = 0,996 1.

Análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se empleó un cromatógrafo líquido marca KNAUER y modelo SMARTLIN 2600 Konik con detector DAD y un software para adquisición y procesamiento de datos CHROM-GATE 3.1. Para la separación e identificación se utilizó una columna de acero inoxidable Lichro-Cart® 250-4 y Lichropher®-100, RP-18 (5 µm) (Merck), la fase móvil utilizada fue acetonitrilo-agua, en modo isocrático a una velocidad de flujo de 1 mL/min, y el volumen de muestra de 10-20 µL; la resolución del equipo fue de 0,09 nm para diferenciar el espectro UV. El ácido valproico mostró un tiempo de retención de 15 min.

Espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Para este análisis todos los materiales nanoestructurados obtenidos fueron preparados en pastillas de bromuro de potasio (KBr). Se pesaron aproximadamente ~2 mg de muestras y (~98 mg) KBr. Esto se trituró en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino; se prepararon pastillas en una prensa de 8 t, para realizar los análisis. Los espectros FTIR se obtuvieron en la región de 500-4 000 cm^{-1}.

Isotermas de adsorción

La adsorción de nitrógeno se realizó a 77 K, posteriormente se realizó un secado previo a 110 °C durante 3 h y un tratamiento de desgasificación a 200 °C. Para el cálculo de las áreas específicas se utilizó el método BET, y el diámetro promedio de poro fue calculado por medio del método Barrett, Joyner y Halenda (BJH) /7/.

Difracción de rayos-X (DRX)

Los difractogramas de difracción de rayos-X de las muestras se obtuvieron a temperatura ambiente utilizando radiación CuKα en un difractómetro Bruker Advance D-8. Los patrones de difracción fueron medidos en el intervalo de 2 θ entre 10 a 60 (rango de medición), un paso de 0,02 y 5 s/puntos de tiempo de conteo. Los perfiles de los picos fueron modelados con la función pseudos–Voigt /8/.

• Resultados y discusión

En la figura 2 se muestran las imágenes de microscopía de barrido (SEM) para el ácido valproico y la fenitoína en la matriz de óxido de titanio hidroxilada. Se observa una morfología heterogénea, con cierta tendencia a la esfericidad y formación de aglomerados. El diámetro de las partículas promedio osciló entre 400 y 600 nm.

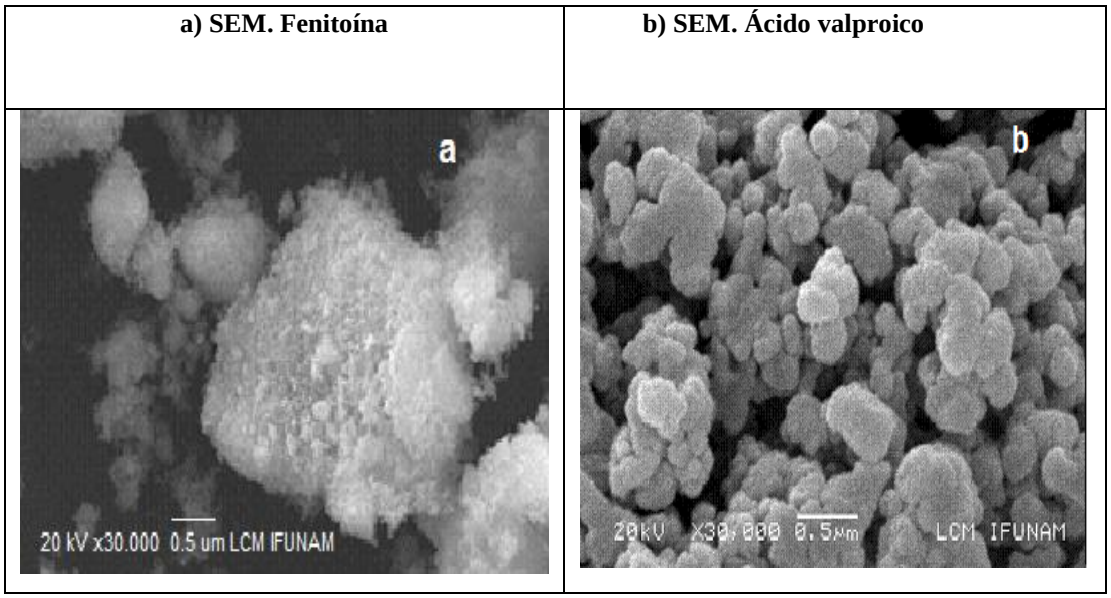


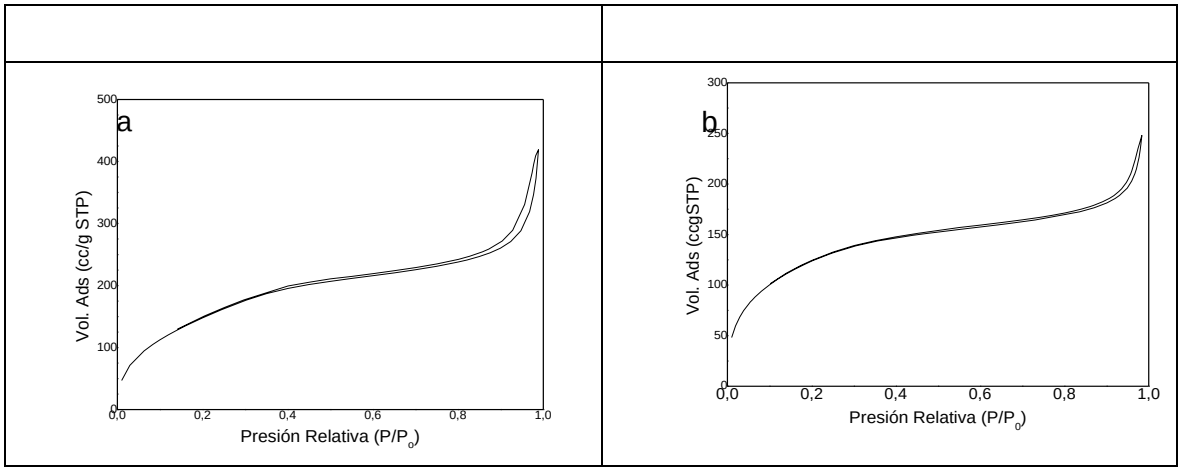
Fig. 2 Microscopía electrónica de barrido (SEM) de los materiales nanoestructurados con a) fenitoína, b) ácido valproico en la matriz TiO_2(OH)

Los valores de rendimiento de partícula se obtuvieron entre 92 y 96 % y una eficiencia de encapsulación entre 66 y 78 % (tabla 2), todo lo cual demostró que tanto los parámetros de síntesis como los del proceso fueron bien ajustados. Los resultados mostrados fueron para las muestras de TiO_2(OH)-Fent-(100mg) y de TiO_2(OH)-AV-(200mg), pues tuvieron mejor comportamiento.

Tabla 2. Eficiencia y rendimiento de la nanoencapsulación de los materiales nanoestructudos de ácido valproico y fenitoína

Exp.	R.E (%)	E.E (%)
TiO_2(OH)-Fent-2(100 mg)	92 ± 0,5	66 ± 0,3
TiO_2(OH)-AV-2 (200 mg)	96 ± 0,4	78 ± 0,2

Al analizar la isoterma de adsorción de N_2 (figura 3), se observa que esta se puede clasificar como del tipo IV /9/, característica de materiales mesoporosos, donde la curva de adsorción y de desorción se diferencian, dando lugar a una histéresis, clasificada por la IUPAC /10/ del tipo H_3, que se encuentra relacionada con sólidos que presentan agregados de partículas con poros.



a) Isoterma TiO_2(OH) con fenitoína b) Isoterma TiO_2(OH) con ácido valproico

Fig. 3 Isoterma de adsorción de nitrógeno del TiO_2(OH)

Los valores de área BET (tabla 3) y diámetro de poro fueron calculados según el método BJH /11/, que confirmó la mesoporosidad de los materiales nanoestructurados obtenidos e indicó un diámetro de poros de 3,8 nm y 4,1 nm para el óxido de titanio hidroxilado-ácido valproico y la fenitoína, respectivamente /12/.

Tabla 3. Caracterización de los materiales nanoestructurados obtenidos del ácido valproico y la fenitoína con la matriz de TiO_2(OH) por BET

Muestra	Área superficial (m^2/g)	Diámetro de poros (nm)
TiO_2(OH)-AV (200 mg)	414	3,8
TiO_2(OH)-Fenit (100 mg)	509	4,1

En el estudio de FT-IR (figura 4 a y b) se muestran los grupos funcionales característicos para cada fármaco y los materiales nanoestructurados obtenidos. En las tablas 4 y 5 se exponen las asignaciones principales de los grupos funcionales; se muestra que no hay corrimiento de las bandas fundamentales, por lo que la interacción matriz fármaco es nula o muy débil /13/.

Tabla 4. Asignaciones del FT-IR. TiO_2(OH)-fenitoína y principio activo (fenitoína)

Frecuencias (cm^{-1})	Asignaciones
3 500-3 000	C-NH, OH
3 054	NH
2 346	C = O
1 700-1 430	Vibraciones anillo aromático
1 000-400	Ti-O

Tabla 5. Asignaciones del FT-IR.TiO_2(OH)- ácido valproico y principio activo (ácido valproico)

Frecuencias (cm^{-1})	Asignaciones
3 500-3 000	= COOH, OH
2 878, 2 948, 2 960	CH_3-CH_2-CH
2 346	C-H
1 000-400	Ti-O

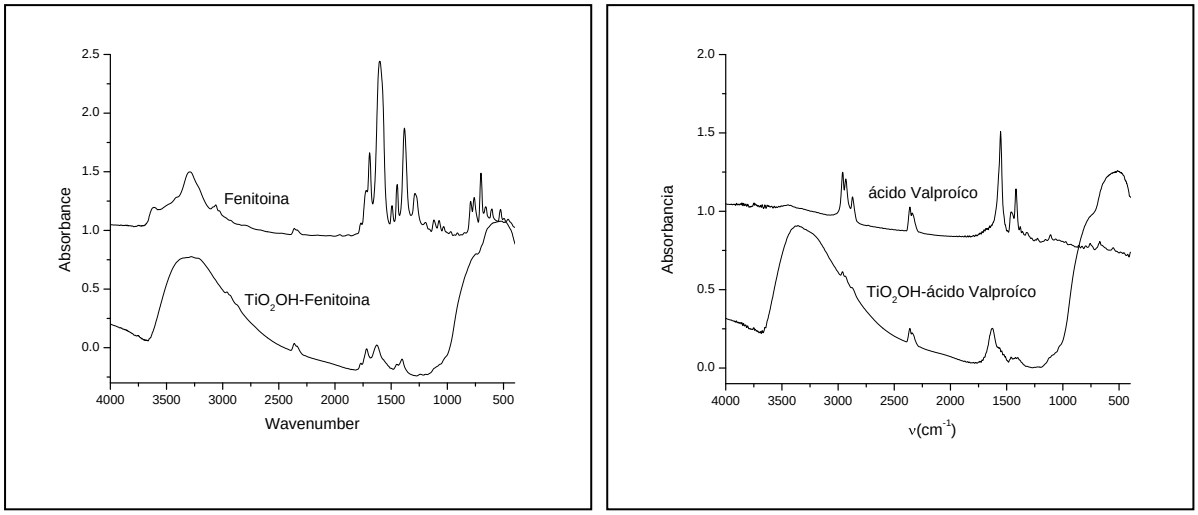


Fig. 4 Espectros FTIR de los materiales nanoestructurados y principios activos a) TiO_2(OH)-fenitoína (100 mg), b) TiO_2(OH)-ácido valproico (200 mg)

Los patrones de difracción (DRX) de los materiales nanoestructurados y los principios activos son mostrados en la figura 5 a y b, donde se puede apreciar que para ambos principios activos se muestra un difractograma característico de un material cristalino, con planos de difracción de mayores intensidades, respectivamente.

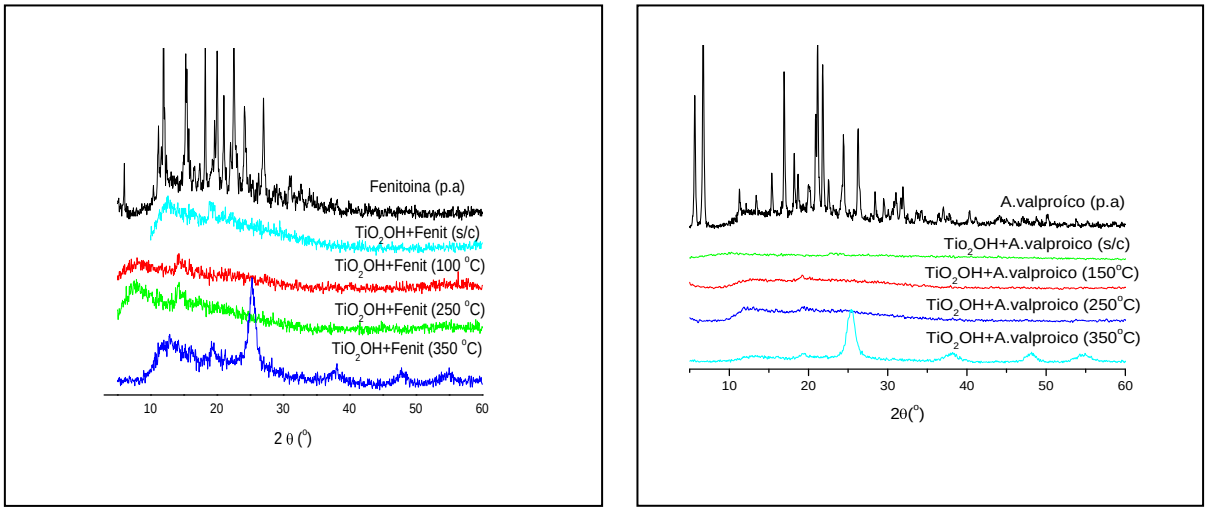


Fig. 5 Difracción de rayos X de los materiales nanoestructurados y principios activos a) TiO_2(OH)-Fenitoína (100 mg), b) TiO_2(OH)-ácido valproico (200 mg) a diferentes temperaturas

Por otro lado, se conoce que el dióxido de titanio se encuentra en la naturaleza en tres fases (formas) cristalinas: anatasa, rutilo y broquita. Al analizar estos difractogramas se aprecia que la fase predominante en estos materiales nanoestructurados de titanio es la anatasa /14/, con planos de difracción característicos 2 θ [25, 28 (^{o})]. Esta fase se hace más evidente a medida que se aumenta la temperatura (100-350 ^{o}C), lo que indica que no hay modificación atribuible sobre la matriz del óxido de titanio hidroxilado por el fármaco, al no observarse otros planos que no sean los característicos de esta matriz hidroxilada.

El problema para producir solo la fase anatasa se debe a que el rutilo es la fase termodinámicamente más estable y aunque la anatasa es cinéticamente estable, esta se puede convertir a la fase rutilo con la temperatura. Por consiguiente se desea encontrar rutas de síntesis de TiO_2 en su forma anatasa a bajas temperaturas, para evitar su conversión a rutilo, además de que la anatasa posee una gran estabilidad química, resistencia a la fotocorrosión, es inmune ante los agentes biológicos y posee elevada área superficial /16/.
Con este estudio se demuestra que este material nanoestructurado es ideal para implantes por su alta compatibilidad en el organismo, lo que permitiría la entrega del fármaco en el sitio específico donde se puedan producir diferentes lesiones, con lo cual se garantizaría su efectividad terapéutica.

• Conclusiones

1. Con el método sol-gel se logró obtener materiales nanoestructurados cargados con los fármacos de estudios (fenitoína y ácido valproico), así como la optimización de los parámetros de síntesis.
2. Se consiguió optimizar la dosis de fenitoína sódica y ácido valproico que deben encapsularse en la matriz nanoestructurada (100 y 200 mg), respectivamente.
3. La microscopía electrónica de barrido permitió comprobar el tamaño nanométrico de los materiales obtenidos.
4. Se comprobó por DRX que al aumentar la temperatura se evidencia la presencia de una de las fases del dióxido de titanio: la anatasa, la cual es más estable cinéticamente.
5. La mesoporosidad de estos materiales y la elevada área superficial características de esta matriz fueron comprobadas por el método de BET.

• Bibliografía

1- PARK, K. "Nanotechnology: What it Can do for Drug Delivery". *Journal Controlled Releases*. 2007, vol. 120, núm. 1-2, p. 1-3.

2- AGUZZI, C.; CEREZO, P.; VISERAS, C.; CARAMELLA, C. "Use of Clays as Drug Delivery Systems: Possibilities and Limitations". *Applied Clay Science*. 2007, vol. 36, núm. 1, p. 22-36.

3- JEFFREY, B. C.; SCHERER, G. W. *Sol-Gel Science, The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. 1a ed. San Diego, UK: Academic Press, INC, 1990. 462 p. ISBN: 13 978-0-12-134970-7.

4- WILKINSON, J. M. "Nanotechnology application in medicine". *Med. Device Technol*. 2003, vol. 14, núm. 2, p. 29-31.

5- BEN MENACHEM, E. "Proof of Efficacy Trials: Seizure Types". *Epilepsy Research.* 2001, vol. 45, núm. 1-3, p. 31-34.

6- THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. *Farmacopea de los Estados Unidos de América* [CD-ROM]. USP 35-NF 30. Baltimore: 2012. Vol. 1. ISSN: 1930-2924.

7- BARRETT, E. P.; JOYNER, L. G.; HALENDA, P. P. "The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances I". *Computations from Nitrogen Isotherms*. *J. Amer. Chem. Soc*. 1951, vol. 73, núm. 1, p. 373.

8- THOMPSON, P.; COX, D. E.; HASTING, J. B. "Rietveld refinement of Debye–Scherrer Synchrotron X-Ray Data from Al_2O_3". *J. Appl. Crystallogr*. 1987, vol. 20, p. 79.

9- BRUNNAUER, S.; EMMET, P.; TELLER, E. "Adsorption of Gases in Multimolecular Layers". *J. Amer. Chem. Soc.*, 1938, vol. 60, núm. 2, p. 309.

10- LEOFANTI, G.; PADOVAN, M.; TOZZOLA, G.; VENTURELLI, B. "Surface Area and Pore Texture of Catalysts". *Catalysis Today*. 1998, vol. 41, núm. 28, p. 207-219.

11- GOMES, V.; FERNANDA, M. B.; GOMES, S. "Principias metodos de caracterizacao de porosidade de resinas a base de divinilbenzeno". *Quim. Nova*. 2001, vol. 24, núm. 6, p. 808-818.

12- POULIOS, I.; MICROPOULOU, E.; PANOU, R.; KOSTOPOULOU, E. "Kinetic Study of the Photocatalytic Recovery of Pt from Aqueous Solution by TiO2, in a Closed-Loop Reactor". *Appl. Catal. B: Environ*. 2003, 4, p. 1345.

13- GONZÁLEZ, M.; RIEUMONT, J.; FIGUERAS, F.; QUINTANA, P. "Drug–Matrix Interactions in Nanostructured Materials Containing Fluoxetine Using Sol-Gel Titanium Oxide as a Matrix". *J. Mater. Res.* 2011, vol. 26, núm. 22, p. 2871-2876.

14- PERRIN, E. X.; NGUYEN, V.; VERNET, J. L. "FT-IR Spectroscopy of Acid-Modified Titanium Alkoxides: Investigations on the Nature of Carboxylate Coordination and Degree of Complexation". *J. Sol-Gel Tech.* 2003, vol. 28, núm. 2, p. 205-215.

15- ELENA, I. M. "Silica and Silica–Titania Sol–Gel Materials: Synthesis and Analytical Application". *Talanta.* 2012, vol. 102, p. 114-122.

16- HIGUCHI, T. "Theoretical Analysis of Rate of Release of Solid Drugs Dispersed in Solid Matrices". *J. Pharm. Sci.* 1963, vol. 52, núm. 12, p. 1145-1149.