

Universidad de Alcalá

Universidade de Coimbra

Sistemas de liberación controlada de fármacos

Propiedades termodinámicas y de transporte de sistemas que incluyen
ciclodextrinas y fármacos a dosis terapéuticas

Cecília Isabel Alves Ventura dos Santos

Directores

Professor Miguel Ángel Esteso Díaz
Departamento de Química – Física de la Universidad de Alcalá

Doutora Ana Cristina Faria Ribeiro,
Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra



Universidad
de Alcalá

Tesis Doctoral presentada a la Universidad de Alcalá y a la Universidad de Coimbra
para acceso al grado de Doctor

2012

*A mis padres,
por darme todo sin esperar nada a cambio,
por disfrutar y sufrir conmigo,
por enseñarme a vivir.*

Agradecimientos

Siempre he creído que, si se lucha por algo, tarde o temprano todo lo que nos rodea termina reajustándose para que lo consigamos. No tengo claro que esto ocurra siempre ni a todas las personas, sin embargo yo me considero una persona afortunada. Puede que sea el azar el que hace que las cosas cambien en el momento adecuado, hacia la dirección adecuada, o bien somos nosotros mismos los que, con nuestro esfuerzo, nos movemos y provocamos las situaciones. Probablemente sea la suma de las dos fuerzas motoras, unas veces tirará más el azar y otras, la voluntad. Este pensamiento me ha acompañado en el largo camino hasta aquí, al momento en que me doy cuenta de cuánto tengo que agradecer a tantas personas que, con su voluntad y empeño, han colaborado a este “reajuste”. Sin ellas, hubiese sido del todo imposible afrontar con éxito la elaboración de esta Tesis Doctoral, en la que tanta ilusión he puesto.

En primer lugar me gustaría agradecer a mi director, el Profesor Miguel Ángel Estesó, por haber creído en mí y haberme apoyado de manera totalmente incondicional desde el principio. Gracias por guiarme a lo largo de estos años de duro trabajo y cederme parte de ese tiempo que no le sobra, por la preocupación que siempre ha mostrado y por ayudarme cuando lo he necesitado.

De forma muy especial, quiero dejar constancia de mi agradecimiento a mi directora, la Doctora Ana Cristina Faria Ribeiro, por su enseñanza, apoyo permanente y por transmitirme confianza. Por si no fuera suficiente la deuda de gratitud que tengo contraída con ella, me ha distinguido al dirigir este trabajo y me honra, cada día, con su personal trato y afecto.

Al Profesor Víctor Manuel Matos Lobo quisiera agradecerle la oportunidad de trabajar en su línea de investigación, por su inestimable orientación, consejo y experiencia y por la gran confianza que ha depositado en mí a lo largo de estos años.

A la Doctora Carmen Teijeiro, que ha seguido de cerca el desarrollo de la presente Tesis, quisiera agradecerle su estrecha colaboración en muchas de las tareas realizadas, así como su completa disposición a resolver cualquier duda o problema que se haya podido plantear. A los demás profesores y colegas del Departamento de Química- Física de la Universidad de Alcalá, les agradezco toda la ayuda que me han prestado, así como los buenos momentos que he pasado en su compañía.

Al Doctor Artur Valente, por su asesoramiento en la investigación, por su simpatía y disponibilidad. Al Sr. Joaquim Natividad por su desinteresada ayuda y su apoyo para que este trabajo saliera adelante. A los profesores y colegas del Departamento de Química de la Universidad de Coimbra, por brindarme su colaboración y amistad.

A la Doctora Ornella Ortona y al Doctor Roberto Sartorio, así como a su equipo de trabajo del Departamento de Química de la Universidad *Federico II* de Nápoles, les agradezco la oportunidad que me brindaron al haberme acogido en su grupo de investigación, por su generosidad, por sus ideas y por su orientación.

A mis amigos, que siempre están, estuvieron y seguirán estando, a pesar de las distancias, que han sabido disculpar mis ausencias y siempre han tenido una palabra de ánimo. Me hacéis sentir una persona muy afortunada. Gracias Lili y Claudia, por haber confiado siempre en mi capacidad para finalizar este trabajo, animándome a seguir hasta el final. Gracias Marisa y Rui por la paciencia, ánimos y cariño. Gracias Joana, Andreia y Andrea por vuestra amistad. Gracias Mar por tornar más soportables las distancias, por aguantarme, escucharme y brindarme tu amistad.

Me gustaría reconocer, también sobre el papel escrito, el apoyo incondicional que he tenido por parte de mi familia: mis padres, mi hermano y mis abuelos. Por el apoyo que me brindaron, por la formación, por fomentar en mí el deseo de saber, de conocer lo novedoso y abrirme las puertas al mundo, ante mi curiosidad insaciable.

A Ricardo, por estar incondicionalmente a mi lado, porque en su compañía las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe. Le doy las gracias por todos los esfuerzos que ha hecho, por haberme hecho creer cada día que podía hacerlo, por toda su ayuda e infinita paciencia y, principalmente, por hacerme feliz.

A todas las personas que, aunque no sean conscientes de ello, han hecho posible la realización de este trabajo.

A todos, mi eterno agradecimiento.

Agradezco a la Fundación para la Ciencia y Tecnología (FCT), por el financiamiento necesario para la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral, a través del “Programa Operacional Potencial Humano” (POPH) do QREN y con el co-financiamiento del Fondo Social Europeo (FSE), al otorgarme una beca doctoral SFRH/ BD/ 45669/ 2008.



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Social Europeu

“Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es solamente un técnico. Es también un niño colocado ante los fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas. No debemos dejar creer que todo progreso científico se reduce a mecanismos, máquinas y engranajes, que, de todas maneras, tienen su belleza propia.

...Tampoco creo que peligre en nuestro mundo la desaparición del espíritu de aventura. Si veo alrededor mío algo de vital es precisamente este espíritu de aventura que parece indesarraigable y que, claro está, se halla emparentado con la curiosidad... Sin la curiosidad intelectual, ¿qué sería de nosotros?

Tal es la belleza y la nobleza de la ciencia: el deseo sin fin de hacer retroceder las fronteras del conocimiento, para localizar a los secretos de la materia y la vida sin ideas preconcebidas acerca de las posibles consecuencias. ”

Marie Curie para Eve Curie,

Ed. Da Capo Series in Science

Sinopsis

Desde un punto de vista farmacológico, la búsqueda del conocimiento acerca del mecanismo de interacción y de las diferentes propiedades de los sistemas de liberación controlada de fármacos, va en aumento debido a la gran importancia que tiene la formulación de las dosis de un fármaco, en relación con su eficacia terapéutica, posibilitando la optimización de los procesos existentes e incluso de nuevas aplicaciones.

El enfoque de este trabajo de Tesis Doctoral es físico-químico y pretende utilizar una perspectiva diferente, alternativa a las habituales, para obtener información molecular sobre la interacción de los solutos en la disolución acuosa. En ese sentido, se describen propiedades termodinámicas y de transporte de sistemas de liberación controlada de fármacos, en un modelo ciclodextrina + fármaco en disolución acuosa, con el fin de obtener información a nivel de las interacciones moleculares que ocurren en el sistema disuelto y que puedan ser de aplicación en la investigación farmacéutica. Asimismo, se analizan los efectos de diversas variables fisiológicas (temperatura, composición iónica en los fluidos biológicos, pH, etc.) sobre las citadas interacciones.

Para tal fin, se han utilizado sistemas que involucran dos ciclodextrinas diferentes: la β -ciclodextrina y su derivado hidrofílico, hidroxipropil- β -ciclodextrina, y dos fármacos con limitada solubilidad en agua: la cafeína y la teofilina, en virtud de sus aplicaciones farmacológicas como estimulantes del sistema nervioso central (SNC), así como por sus propiedades antiasmáticas.

La utilización de dos tipos de ciclodextrinas con diferentes características fisicoquímicas, permite analizar la influencia de los grupos sustituyentes y el efecto de la solubilidad de la ciclodextrina en su interacción con el fármaco. La elección de los fármacos se basó en sus importantes aplicaciones farmacológicas y en su analogía química, a nivel estructural, con el fin de comprender la especificidad de las interacciones en estos sistemas. La introducción de las variables temperatura y composición iónica del medio, permitieron analizar su efecto sobre la estabilidad de estos sistemas, bajo condiciones que se acercan al entorno biológico.

El estudio de estos sistemas se realizó a través de la determinación de propiedades termodinámicas (densidad y volúmenes molares aparentes) y de transporte (viscosidad y coeficientes de difusión mutua) de disoluciones acuosas de fármacos y ciclodextrinas, efectuada en tres etapas. En una primera, se estudiaron las disoluciones acuosas binarias de los fármacos y de las ciclodextrinas, *per se*. En una segunda fase, se estudiaron las disoluciones acuosas ternarias de cada uno de ambos fármacos con las ciclodextrinas. Y en una tercera fase, se estudiaron las disoluciones acuosas cuaternarias de cada uno de ambos fármacos, una ciclodextrina y un electrólito (en rigor, de los iones obtenidos por disolución de éste). El rango de concentraciones de trabajo se mantuvo entre 0,0005 y 0,01 mol kg⁻¹, en un intento de hacerlo coincidir con las dosis terapéuticas. Las medidas se llevaron a cabo a dos temperaturas: la estándar de (298,15 ± 0,01) K y la fisiológica de (310,15 ± 0,01) K.

A través de la cuantificación de las variaciones de los volúmenes molares aparentes de las especies en disolución, de los cambios que tienen lugar en la viscosidad y del análisis cualitativo y cuantitativo de los coeficientes de difusión de las distintas especies en disolución, se propusieron modelos que permitieron estimar las constantes de asociación relativas al fenómeno de la formación de complejos entre las ciclodextrinas y los fármacos bajo estudio y se evaluó la influencia de la temperatura y de la composición iónica sobre la estabilidad de dicha asociación.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral sugieren que la combinación de estos fármacos con las ciclodextrinas utilizadas, puede constituir un interesante sistema de liberación controlada de fármacos, al tiempo que contribuir a un mayor conocimiento de los factores que conducen y/o limitan la interacción entre los fármacos y estos transportadores.

Resumo

Do ponto de vista farmacológico, a procura de um melhor conhecimento das diferentes propriedades e do mecanismo de interação entre os componentes dos sistemas de libertação controlada de fármacos tem vindo a aumentar, devido à grande importância da relação entre a dose de um fármaco e a sua eficácia terapêutica, permitindo não só a otimização dos processos existentes mas também o desenvolvimento de novas aplicações.

O enfoque deste trabalho é físico-químico e pretende dar uma perspetiva alternativa no sentido da obtenção de informação molecular sobre a interação de solutos em solução aquosa. Desta forma, são descritas as propriedades termodinâmicas e de transporte de sistemas de libertação controlada de fármaco, para um modelo ciclodextrina + fármaco em solução aquosa, com o intuito de obter informação ao nível das interações moleculares que podem ocorrer e que possam ter aplicação ao nível da investigação na área farmacêutica. São igualmente analisados os efeitos das variáveis fisiológicas (temperatura, composição iónica de fluidos biológicos, pH, etc.) sobre as interações supra mencionadas.

Para tal, recorreu-se a sistemas envolvendo dois tipos de moléculas de ciclodextrina: a β -ciclodextrina e o seu derivado hidrofílico hidroxipropil- β -ciclodextrina, e dois fármacos com solubilidade limitada: a cafeína e a teofilina, em virtude das suas aplicações farmacológicas como estimulantes do sistema nervoso central e antiasmáticos.

A utilização de dois tipos de ciclodextrinas com diferentes características físico-químicas permite inferir o efeito dos grupos substituintes e da solubilidade da ciclodextrina na interação com o fármaco. A escolha dos fármacos foi feita com base nas suas importantes aplicações farmacêuticas (farmacológicas) e na sua analogia química, a nível estrutural, de modo a compreender a especificidade das interações nesses sistemas. A introdução das variáveis temperatura e composição iónica do meio permitiram-nos analisar o seu efeito sobre a estabilidade destes sistemas em condições que se aproximam das do meio biológico.

O estudo destes sistemas realizou-se através da determinação das propriedades termodinâmicas, densidade e volumes molares aparentes, e de transporte, viscosidade e coeficientes de difusão mútua de soluções aquosas de fármacos e ciclodextrinas, em três fases. Na primeira fase foram estudadas as soluções aquosas dos fármacos e das ciclodextrinas *per se*, numa segunda fase foram estudadas soluções aquosas de fármacos com ciclodextrinas e numa terceira fase foram estudadas soluções aquosas de fármacos, ciclodextrinas e iões. O intervalo de concentrações do estudo manteve-se, maioritariamente, entre 0,0005 a 0,01 mol kg⁻¹, numa tentativa de coincidir com as doses terapêuticas. As medições foram realizadas a temperaturas de (298,15 ± 0,01) K e (310,15 ± 0,01) K.

Através da quantificação das variações dos volumes molares aparentes das espécies em solução, das alterações que ocorrem na viscosidade e da análise qualitativa e quantitativa dos coeficientes de difusão das diferentes espécies em solução, são propostos modelos que permitem estimar as constantes de associação respeitantes à complexação das ciclodextrinas e dos fármacos sob estudo, assim como avaliar a influência da temperatura e da composição iónica sobre a estabilidade da referida associação.

Os dados obtidos neste estudo sugerem que a combinação de fármacos com ciclodextrinas poderá constituir um sistema de libertação controlada de fármaco interessante e que permitirá contribuir para uma melhor compreensão dos fatores que impulsionam ou limitam a interação entre os fármacos e esses transportadores.

Abstract

From the pharmacological point of view, the search for improved knowledge about the interaction mechanism and the different properties of drug release systems is increasing due to the great importance of the drug dosage in relation to its therapeutic efficacy, allowing the optimization of the existing processes and even of new applications.

This doctoral work has a physicochemical focus and proposes the use of an alternative approach with the purpose of obtaining molecular information about the interactions among the solutes in the aqueous solution. In this sense, thermodynamic and transport properties are described for drug delivery systems, for a cyclodextrin + drug model in aqueous solution, in order to obtain information, in a molecular level, of interactions that can occur in the solved system, which may conceivably have application in pharmaceutical research. Furthermore, the effects of various physiological variables (temperature, ion composition of biological fluids, pH, etc.) on the interactions mentioned above are also analyzed.

For this purpose, systems involving two different cyclodextrins are used: the β -cyclodextrin and its hydrophilic derivative, hydroxypropyl- β -cyclodextrin, and two drugs with limited solubility in water: caffeine and theophylline, by the reason of their pharmacological applications as stimulants of the central nervous system (CNS), as well as their antiasthmatic properties.

The use of these two types of cyclodextrins with different physicochemical characteristics allows deriving information about the influence of the substitutive groups and the effect of the cyclodextrin solubility in its interaction with the drug. The choice of drugs was based on both their important applications in pharmaceutics and their chemical analogy, in a structural level, in order to understand the specificity of the interactions in these systems. The introduction of variables like temperature and ionic composition

allowed the analysis of its effect on the stability of these systems under conditions that approach the biological context.

The study of these systems was performed through the determination of both some thermodynamic properties (density and apparent molar volumes) and transport properties (viscosity and mutual diffusion coefficients) in drugs + cyclodextrins aqueous solutions, in three steps. In the first one, binary aqueous solutions of both drugs and cyclodextrins, *per se*, were studied. In a second stage, aqueous ternary solutions of each drug with the cyclodextrins were studied. And, in a third stage, quaternary aqueous solutions of each drug, together with one cyclodextrin and one electrolyte (rigorously, the ions from the splitting of it when dissolve) were studied. The working concentration range was from 0.0005 to 0.01 mol kg⁻¹, in an attempt to approach the therapeutic doses. The measurements were carried out at two temperatures: the standard (298.15 ± 0.01) K and the therapeutic (310.15 ± 0.01) K.

Through the quantification of the changes in the apparent molar volumes of the species in solution, the changes occurring in the viscosity and the qualitative and quantitative analysis of the diffusion coefficients of the different species present in solution, models were proposed in order both to estimate the association constants for the complexation process between the cyclodextrins and the drugs under study, and to evaluate the influence of the temperature and the ionic composition on the stability of that association.

Data from this doctoral work suggest that the combination of these drugs and the cyclodextrins used can be an interesting drug delivery system. Moreover, they would contribute to a better knowledge of the factors that lead and/or limit the interaction between the drugs and these carriers.

Lista de símbolos y abreviaturas

β -CD	β -ciclodextrina
HP- β -CD	2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina
<i>Caf</i>	cafeína
<i>Teof</i>	teofilina
<i>V</i>	volumen
<i>n</i>	número de moles
<i>M</i>	peso molecular
<i>x</i>	fracción molar
<i>T</i>	temperatura
<i>p</i>	presión
\bar{V}	volumen molar parcial
<i>c</i>	concentración molar
<i>m</i>	molalidad
ϕ_V	volumen molar aparente
ϕ_V^0	volumen molar aparente a concentración infinitesimal
$\Delta\phi_V^0$	volumen molar (parcial o aparente) de transferencia
$\phi_{V,f}$	volumen molar aparente de una especie libre
$\phi_{V,c}$	volumen molar aparente de una especie complejada
<i>K</i>	constante de equilibrio
ρ	densidad
η	viscosidad
<i>D</i>	coeficiente de difusión
D^0	coeficiente de difusión a concentración infinitesimal
<i>r</i>	radio hidrodinámico
k_B	constante de Boltzman

Índice

1. Introducción	1
1.1. Ciclodextrinas	4
1.1.1. Estructura y propiedades fisicoquímicas	4
1.1.2. Complejos de inclusión	6
1.1.3. Aplicaciones farmacológicas	7
1.2. Metilxantinas	8
1.2.1. Cafeína	8
1.2.1.1. Características fisicoquímicas	8
1.2.1.2. Características farmacológicas	9
1.2.1.2.1. Farmacodinámica y farmacocinética	9
1.2.1.2.2. Aplicaciones farmacológicas	10
1.2.2. Teofilina	10
1.2.2.1. Características fisicoquímicas	10
1.2.2.2. Características farmacológicas	10
1.2.2.2.1. Farmacodinámica y farmacocinética	10
1.2.2.2.2. Aplicaciones farmacológicas	11
1.2.3. Interés farmacológico del desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármaco entre metilxantinas y ciclodextrinas	11
Referencias bibliográficas.....	13
2. Densidad y volumen molar aparente	19
2.1. Volumen molar parcial y volumen molar aparente	20
2.2. Volúmenes molares aparentes en disoluciones multicomponente.....	23
2.2.1. Regla de Young.....	23
2.2.2. Volúmenes de transferencia.....	24
2.2.3. Cálculo de las constantes de asociación de solutos a partir de valores de los volúmenes molares parciales	25
Referencias bibliográficas.....	27

3. Viscosidad.....	29
3.1. Coeficientes de Jones-Dole en la interpretación de la viscosidad de disoluciones electrolíticas	30
3.2. Teoría hidrodinámica y viscosidad de disoluciones no electrolíticas.....	32
Referencias bibliográficas	34
4. Difusión isotérmica	37
4.1. Conceptos matemáticos.....	38
4.1.1. Aplicación en sistemas binarios	39
4.1.2. Aplicación en sistemas ternarios	41
4.1.3. Aplicación en sistemas cuaternarios	42
4.2. Información sobre las interacciones intermoleculares deducida a partir de los datos de difusión	43
4.2.1. Estimación de constantes de asociación para solutos en equilibrio químico.....	43
4.2.2. Estimación de constantes de asociación a partir de difusión de trazas de solutos	46
4.3. Método de Dispersión de Taylor	49
4.3.1. Conceptos generales	49
4.3.2. Teoría del método	50
4.3.3. Análisis de resultados e estimación de los parámetros	52
4.3.3.1. Sistemas binarios	52
4.3.3.2. Sistemas ternarios.....	55
4.3.3.3. Sistemas cuaternarios.....	56
Referencias bibliográficas	58
5. Aspectos experimentales	61
5.1. Productos.....	61
5.1.1. Xantinas	61
5.1.2. Ciclodextrinas	61
5.1.3. Electrolitos (Cloruro potásico).....	61
5.1.4. Agua	62
5.2. Aparatos.....	62

5.2.1. Densímetro.....	62
5.2.2. Viscosímetro.....	65
5.2.3. Equipo para las medidas de difusión.....	66
5.2.4. Termostatos.....	69
5.2.5. Balanzas.....	70
5.2.6. Laboratorio.....	70
5.3. Técnicas operatorias.....	71
5.3.1. Preparación de las disoluciones.....	71
5.3.2. Determinación de las densidades.....	72
5.3.3. Determinación de la viscosidad.....	73
5.3.4. Determinación de los coeficientes de difusión.....	74
5.3.4.1. Determinación de los coeficientes de difusión binarios.....	74
5.3.4.2. Determinación de los coeficientes de difusión ternarios.....	75
5.3.4.3. Determinación de los coeficientes de difusión cuaternarios.....	75
Referencias bibliográficas.....	77
6. Caracterización de propiedades fisicoquímicas de fármacos en disolución acuosa.....	79
6.1. Sistema cafeína + agua.....	81
6.1.1. Medidas de densidad.....	81
6.1.2. Volúmenes molares aparentes.....	82
6.1.3. Viscosidades.....	84
6.1.4. Coeficientes de difusión.....	88
6.1.4.1. Influencia de la concentración sobre el coeficiente de difusión.....	89
6.1.4.2. Influencia de la temperatura sobre el coeficiente de difusión.....	90
6.2. Sistema teofilina + agua.....	91
6.2.1. Medidas de densidad.....	91
6.2.2. Volúmenes molares aparentes.....	93
6.2.3. Viscosidades.....	94
6.2.4. Coeficientes de difusión.....	96
6.2.4.1. Influencia de la concentración sobre el coeficiente de difusión.....	97
6.2.4.2. Influencia de la temperatura sobre el coeficiente de difusión.....	99
6.3. Resumen.....	99
6.4. Sistema β -ciclodextrina + agua.....	100
6.4.1. Medidas de densidad.....	101

6.4.2. Volúmenes molares aparentes	102
6.4.3. Viscosidades	104
6.4.4. Coeficientes de difusión	107
6.4.4.1. Influencia de la concentración sobre el coeficiente de difusión	108
6.4.4.2. Influencia de la temperatura sobre el coeficiente de difusión	109
6.5. Sistema hidroxipropil- β -ciclodextrina + agua.....	110
6.5.1. Medidas de densidad.....	110
6.5.2. Volúmenes molares aparentes	111
6.5.3. Viscosidades	112
6.5.4. Coeficientes de difusión	115
6.5.4.1. Influencia de la concentración sobre el coeficiente de difusión	116
6.5.4.2. Influencia de la temperatura sobre el coeficiente de difusión	117
6.6. Resumen	117
Referencias bibliográficas	120
7. Influencia de las ciclodextrinas en las propiedades fisicoquímicas de las metilxantinas en disolución acuosa	125
7.1. Caracterización de las interacciones entre las ciclodextrinas y la cafeína en disolución acuosa	128
7.1.1. Volúmenes molares aparentes	129
7.1.2. Viscosidad.....	139
7.1.3. Difusión.....	146
7.1.3.1. Influencia de la presencia de β -ciclodextrina sobre la difusión de la cafeína	147
7.1.3.2. Influencia de la presencia de la hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre la difusión de la cafeína.....	149
7.1.3.3. Estimación de las constantes de asociación.....	150
7.1.4. Resumen	153
7.2. Caracterización de las interacciones entre las ciclodextrinas y la teofilina en disolución acuosa.....	154
7.2.1. Volúmenes molares aparentes	155
7.2.2. Viscosidad.....	162
7.2.3. Difusión.....	169

7.2.3.1. Influencia de la presencia de β -ciclodextrina en la difusión de la teofilina.....	169
7.2.3.2. Influencia de la presencia de la hidroxipropil- β -ciclodextrina en la difusión de la teofilina.....	171
7.2.3.3. Estimación de las constantes de asociación.....	173
7.2.4. Resumen.....	175
Referencias bibliográficas.....	177
8. Estabilidad de los complejos ciclodextrina - fármaco: Influencia de iones con relevancia en los procesos fisiológicos.....	181
8.1. Efecto del KCl sobre las propiedades de las disoluciones acuosas de cafeína y de teofilina.....	182
8.1.1. Efecto del cloruro potásico sobre las propiedades de la cafeína acuosa.....	186
8.1.2. Efecto del cloruro potásico sobre las propiedades de la teofilina acuosa.....	189
8.1.3. Resumen.....	192
8.2. Efecto del KCl sobre las propiedades de la β -ciclodextrina y hidroxipropil- β -ciclodextrina acuosas.....	193
8.2.1. Efecto del cloruro potásico sobre las propiedades de la β -ciclodextrina acuosa.....	193
8.2.2. Efecto del cloruro potásico sobre las propiedades de la hidroxipropil- β -ciclodextrina acuosa.....	196
8.2.3. Resumen.....	198
8.3. La presencia de iones en la formación de complejos ciclodextrina fármaco: ¿estabilización de estructuras ó competición por la inclusión?.....	198
8.3.1. Efecto del cloruro potásico sobre las disoluciones acuosas de ciclodextrina-cafeína.....	199
8.3.1.1. Difusión en el sistema cuaternario β -CD (1)+ KCl (2) + cafeína (3) + agua.....	199
8.3.1.1.1. Coeficientes de difusión principales $^{123}D_{11}$, $^{123}D_{22}$ y $^{123}D_{33}$	201
8.3.1.1.2. Difusión impulsada por gradientes de β -ciclodextrina.....	201
8.3.1.1.3. Difusión impulsada por gradientes de cloruro potásico ..	202
8.3.1.1.4. Difusión impulsada por gradientes de cafeína.....	202

8.3.1.2. Difusión en el sistema cuaternario HP- β -CD (1)+ KCl (2) + cafeína (3) + agua	203
8.3.1.2.1. Coeficientes de difusión principales $^{123}D_{11}$, $^{123}D_{22}$ y $^{123}D_{33}$	204
8.3.1.2.2. Difusión impulsada por gradientes de hidroxipropil- β -ciclodextrina	205
8.3.1.2.3. Difusión impulsada por gradientes de cloruro potásico ...	205
8.3.1.2.4. Difusión impulsada por gradientes de cafeína.....	206
8.3.2. Efecto del cloruro potásico sobre las disoluciones acuosas de ciclodextrina-teofilina.....	207
8.3.2.1. Difusión en el sistema cuaternario β -CD (1)+ KCl (2) + teofilina (3) + agua	207
8.3.2.1.1. Coeficientes de difusión principales $^{123}D_{11}$, $^{123}D_{22}$ y $^{123}D_{33}$	208
8.3.2.1.2. Difusión impulsada por gradientes de β -ciclodextrina.....	209
8.3.2.1.3. Difusión impulsada por gradientes de cloruro potásico.....	210
8.3.2.1.4. Difusión impulsada por gradientes de teofilina	210
8.3.2.2. Difusión en el sistema cuaternario HP- β -CD (1)+ KCl (2) + teofilina (3) + agua.....	211
8.3.2.2.1. Coeficientes de difusión principales $^{123}D_{11}$, $^{123}D_{22}$ y $^{123}D_{33}$	212
8.3.2.2.2. Difusión impulsada por gradientes de hidroxipropil- β -ciclodextrina	213
8.3.2.2.3. Difusión impulsada por gradientes de cloruro potásico.....	214
8.3.2.2.4. Difusión impulsada por gradientes de teofilina	214
8.3.3. Resumen.....	215
Referencias bibliográficas	216
9. Conclusiones	219
10. Síntese (<i>en portugués</i>)	227
Anexo I. Programas de adquisición y tratamiento de datos	313

Capítulo 1

Introducción

Desde los inicios de nuestra civilización, el hombre ha intentado mejorar su salud y eliminar el dolor mediante la ingestión o administración de sustancias de origen vegetal, animal ó mineral. El estudio científico y el uso adecuado de las sustancias de origen natural con fines terapéuticos es, sin duda, tan antiguo como la Astronomía, la Física o la Medicina. El vasto cúmulo de conocimientos sobre la explotación de los recursos naturales con fines medicinales, adquiridos empíricamente por el ser humano a lo largo de miles de años, ha favorecido el progreso de diversas áreas de las ciencias de la salud: la farmacéutica, la farmacología y la medicina, así como la industria cosmética y la de los alimentos. Su mayor impacto se ha producido en el campo de las ciencias farmacéuticas, al identificar y desarrollar nuevos y potentes agentes medicinales [1-3].

Pese al gran progreso de la industria farmacéutica, principalmente después de la revolución industrial, y no obstante el gran avance de las ciencias químicas y biológicas en las últimas décadas, no todos los nuevos compuestos bajo investigación llegan a pasar la primera fase de los ensayos clínicos. Prentis *et al.* [4] lo han atribuido esencialmente, hace más de 20 años, a sus escasas propiedades farmacocinéticas en los humanos, a falta de eficiencia clínica o a elevados efectos adversos. Actualmente estos siguen siendo, en la opinión de la mayoría de los autores, los efectos más importantes y se cree que están correlacionados [5]. No obstante, el factor económico tiene también bastante peso [6-7]. Todo ello obliga a que el proceso de investigación se dirija hacia la implementación de mejoras, al aumento de su eficiencia, pero también a que sean perfectamente conocidas las propiedades de los fármacos en el organismo. Por tal motivo, se inició la línea de pensamiento dirigida a la búsqueda de nuevos agentes que permitan circunvalar las barreras fisiológicas y, de ese modo, obtener la máxima eficacia del fármaco [8-9].

Los sistemas de liberación controlada de fármacos son un concepto que se viene desarrollando desde 1960. De acuerdo con la Real Farmacopea Española [10], las formas farmacéuticas de liberación modificada, también llamadas de liberación controlada, son aquéllas en las que la velocidad y el lugar de liberación de la sustancia o sustancias activas, es diferente del de la forma farmacéutica de liberación convencional, administrada por la misma vía. Se trata de utilizar un vehículo (transportador) dentro del cual va incorporado el fármaco, que es liberado de forma controlada en el lugar definido, con una determinada velocidad de liberación y en el momento conveniente. Estos sistemas han experimentado un gran perfeccionamiento desde los tiempos en los que se basaban en dispositivos de control macroscópico de liberación de fármacos (por ejemplo, los implantes subcutáneos), pasando por los sistemas micro-poliméricos, hasta alcanzar la esperanzadora era actual en la que se emplean diseños a nano-escala (transportadores tales como las ciclodextrinas) [11]. La utilización de materiales poliméricos, como soportes para regular y dosificar la liberación de fármacos en aplicaciones específicas, constituye también una perspectiva de gran interés [p.ej. 12-15].

El objetivo principal de la liberación controlada es simple: minimizar los problemas derivados de la administración de las formas farmacéuticas convencionales, en las cuales la liberación del principio activo ocurre de forma inmediata [10]. La eficacia terapéutica *in vivo* de un determinado principio activo está condicionada, en gran medida, por sus características fisicoquímicas y, en concreto, por su solubilidad en los fluidos biológicos y por su permeabilidad a través de las membranas. En realidad, la absorción del principio activo desde el tracto gastrointestinal (en los fármacos de administración oral) hacia el sistema circulatorio, por difusión pasiva, depende de su solubilidad en agua. Asimismo, el movimiento del fármaco a través de una membrana depende de que disponga de un cierto carácter apolar. Por tanto, el éxito de la terapia farmacológica aplicada depende de que exista un equilibrio adecuado entre su solubilidad en agua y en lípidos [16-17].

Los sistemas anteriormente mencionados permiten conseguir que llegue la cantidad correcta del principio activo, al lugar preciso y en el momento adecuado. De esta manera se puede conseguir una disminución de los efectos adversos, un tiempo de actividad más prolongado, manteniendo constante la concentración del fármaco en el plasma, incluso en el caso de fármacos cuyo rango terapéutico es reducido, y ofrecer protección a aquellos fármacos que son sensibles a ataques enzimáticos o a degradación por pH (condiciones habituales en el tracto intestinal).

Existen diversos tipos de partículas poliméricas empleadas en la administración de medicamentos. En función de su tamaño, se pueden clasificar en micro- y nano-partículas. Las nano-partículas son sistemas poliméricos submicrónicos ($< 1 \mu\text{m}$). Las ciclodextrinas y sus agregados se incluyen en este grupo y su utilización en tecnología farmacéutica, para encapsular moléculas de fármacos de limitada hidrosolubilidad, a fin de aumentar su estabilidad y mejorar su biodisponibilidad, ha sido profusa desde la década de los 90 [18-24].

No obstante lo anteriormente descrito, conseguir un sistema de liberación controlada eficaz, no pasa solo por añadir un transportador genérico a la molécula de fármaco cuando se procede a su preparación farmacéutica, ya que la liberación viene condicionada por factores inherentes al vehículo y al principio activo. Para el diseño de sistemas de administración de fármacos de este tipo, hay que conocer y entender la relación existente entre la química de las ciclodextrinas, la estructura del complejo y la tasa de liberación del fármaco. Si la vía de administración es la oral, en el período posterior a la ingesta, las moléculas de fármaco se liberan lentamente desde el transportador. La disponibilidad del fármaco en el sitio de la absorción, es decir, la velocidad de liberación en el espacio extracelular, depende de las características del dispositivo y puede ser manipulada mediante la variación de las propiedades químicas o físicas del transportador. Sin embargo, una vez que el fármaco se libera en el espacio extracelular, las tasas de migración a través del tejido, la absorción hacia el sistema circulatorio y la eliminación del excedente por el organismo, dependen de las características del fármaco y de la fisiología del lugar de la absorción.

A continuación se detallan las propiedades de las ciclodextrinas. Éstas son moléculas con una gran potencialidad como transportadores de fármacos. Se describe someramente su química y, en particular, la de sus complejos de inclusión. Los fármacos sobre los cuales se basa este estudio se describen igualmente, tanto a nivel fisicoquímico como de su aplicabilidad médica y se hace indicación de cual es el interés práctico del estudio de sus interacciones con las ciclodextrinas.

1.1. Ciclodextrinas

1.1.1. Estructura y propiedades fisicoquímicas

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos, constituidos por un número variable de unidades de glucosa, que se obtienen de la acción de la enzima CGTasa (ciclodextrina- α -glucosiltransferasa) en el almidón [25]. Las ciclodextrinas naturales más comunes se componen de 6, 7 u 8 unidades de D-(+)-glucopiranosas, conectadas entre sí por enlaces del tipo α -(1,4) y se denominan α -, β - y γ -ciclodextrina, respectivamente [26-27]. Como resultado de la conformación de las moléculas de glucosa y de la ausencia de rotación de los enlaces glucosídicos, la estructura molecular de las ciclodextrinas es toroidal. Los grupos hidroxilo primarios en posición C6 están localizados en el lado más estrecho del toroide, mientras que los grupos hidroxilo secundarios (posiciones C2 y C3) se sitúan en el lado más ancho del mismo (Figura 1.1) [28].

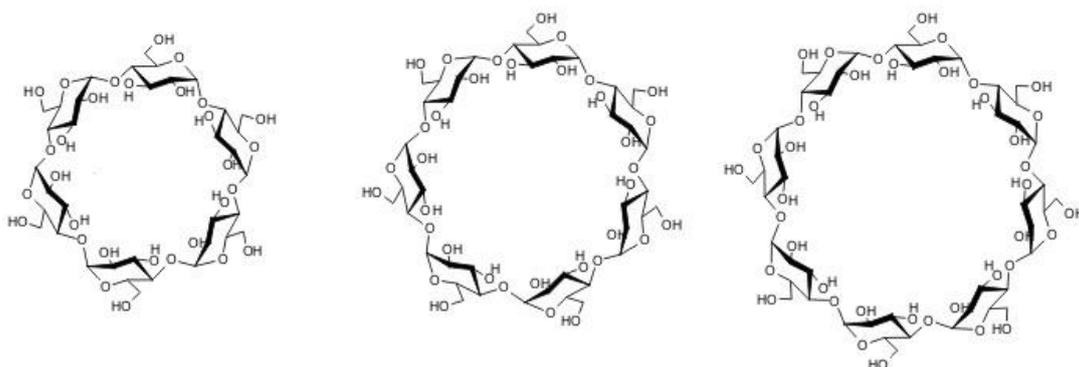


Figura 1.1. Estructura química de la α -, β - y γ -ciclodextrinas.

Duchêne *et. al.* [29,30] verificaron que, como consecuencia de que los grupos hidroxilo libres estén situados en el exterior de la superficie de los anillos, las ciclodextrinas son hidrófilas y solubles en agua y su solubilidad es el resultado de la capacidad de interacción de dichos grupos hidroxilo con el medio acuoso [29].

La cavidad central, delineada por dos anillos de grupos C-H y un anillo de oxígeno glucosídico [29], es de naturaleza apolar por lo que estos compuestos son capaces de albergar en su interior moléculas hidrófobas más pequeñas, para formar complejos del tipo “*host-guest*” [30], en los que la molécula huésped queda encapsulada por la ciclodextrina (anfitrión), sin que se establezcan enlaces covalentes entre las entidades. Efectivamente, esta es una de las

propiedades más interesantes de las ciclodextrinas y lo que motiva su gran aplicabilidad en diversas áreas de investigación y desarrollo.

Thompson [31] y otros autores han verificado que, de las 3 ciclodextrinas naturales, la β -ciclodextrina parece ser el agente complejante más útil en el área farmacológica, debido tanto a su elevada capacidad de complejación con un elevado número de fármacos, como al tamaño de su cavidad y a la facilidad para obtener grandes cantidades de este compuesto a costes reducidos. Su limitación viene dada por la baja solubilidad que presenta (1,85% m/V). Ésta es consecuencia de los enlaces, relativamente fuertes, que se establecen entre moléculas de ciclodextrina en el cristal, así como de la presencia de enlaces intermoleculares entre el OH situado en la posición 2 y el OH en posición 3, en todo el macrociclo, que reduce el número de hidroxilos disponibles para establecer puentes de hidrógeno con las moléculas de agua circundantes [32-33].

La introducción de sustituyentes a nivel de los grupos hidroxilo que forman los enlaces intermoleculares, convierte el sólido cristalino en una mezcla amorfa y produce un aumento de la solubilidad de la ciclodextrina. La introducción de grupos hidroxipropil, para obtener el 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, hace aumentar su solubilidad hasta en un 60% (m/V) [34]. La metabolización de ambas ciclodextrinas, la β -ciclodextrina y la 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, origina únicamente agua y dióxido de carbono, los mismos productos de degradación del almidón y, por tanto, ello permite su administración segura en formulaciones por vía oral [35]. En la tabla 1.1 se presentan las propiedades fisicoquímicas más importantes de la β -ciclodextrina y de la 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina.

Tabla 1.1: Propiedades fisicoquímicas de la β -ciclodextrina y de la 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina [36]

	β -ciclodextrina	2-hidroxipropil- β -ciclodextrina
Número de unidades de glucosa	7	7
Peso molecular (g / mol)	1135	1380
Diámetro de la cavidad interna (nm)	0,60- 0,65	0,62
Volumen de la cavidad (nm ³)	0,262	0,346
Solubilidad acuosa (g/ 100 mL a 25° C)	1,85	>60
Punto de fusión (° C)	255 – 265	305
Contenido en agua (%)	13	18

1.1.2. Complejos de inclusión

La capacidad mostrada por las ciclodextrinas, para formar complejos de inclusión en los que la molécula “huésped” está total o parcialmente rodeada por el entorno hidrofóbico de la cavidad de la ciclodextrina, es una de sus propiedades más interesantes. Si la polaridad del huésped y su tamaño son compatibles con la cavidad de la ciclodextrina, se forma un complejo cuyas propiedades físicas, químicas y biológicas difieren sensiblemente de las que originalmente presentaba la molécula ahora incluida (Figura 1.2). Esta asociación está regida por una constante de estabilidad que funciona como un indicador de la alteración de las propiedades fisicoquímicas de la molécula, una vez producida su asociación.

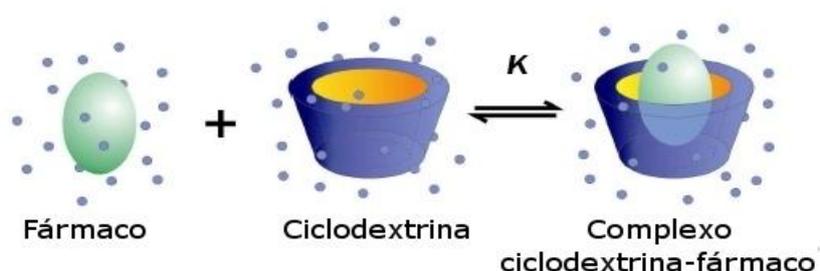


Figura 1.2. Formación de un complejo de inclusión 1:1 en disolución acuosa

Lui *et al.* [37] plantean que las fuerzas conducentes a la formación del complejo incluyen la liberación de moléculas de agua atrapadas en el interior de la cavidad (estas moléculas de agua poseen una alta entalpía, al no poder formar enlaces de hidrogeno con el entorno acuoso circundante), enlaces de Van der Waals (dipolo-dipolo y fuerzas de dispersión de London), interacciones hidrófobas, interacciones electrostáticas o liberación de energía como consecuencia de los ajustes conformacionales y estéricos de la macromolécula [31, 37]. Asimismo, no existe formación o ruptura de enlaces covalentes cuando se forman los complejos “*host-guest*” en la disolución acuosa y las moléculas huésped se encuentran en equilibrio dinámico con el resto de moléculas que están libres en la disolución.

Después de su administración, la liberación del fármaco a partir del complejo, puede ocurrir por diferentes mecanismos: por simple dilución [38]; por sustitución competitiva del fármaco por sales u otros materiales endógenos; por enlaces entre el fármaco y los tejidos (a consecuencia de la afinidad del fármaco por la membrana, éste pasaría al interior y la ciclodextrina se quedaría fuera); por efecto del pH, en el caso de fármacos ionizables, o por efecto de la temperatura [31] (menor estabilidad del complejo, a mayor temperatura).

1.1.3. Aplicaciones farmacológicas

Debido a la capacidad de las ciclodextrinas para formar complejos de inclusión con determinadas moléculas huésped, su utilización en el área farmacológica es bastante amplia, ya que permiten cambiar la solubilidad de los fármacos [31, 39-40], modelar la velocidad de disolución [41], aumentar la estabilidad [42] y proteger las mucosas de la irritación causada por ciertos medicamentos [43, 44].

No obstante lo descrito anteriormente, investigaciones más recientes han revelado que el efecto de solubilización del fármaco, generalmente asumido como consecuencia de su inclusión en la cavidad de la ciclodextrina, puede tener otro origen [35-36]. Loftsson *et al.* [45-46] sugieren que, en efecto, las ciclodextrinas pueden auto-asociarse para formar agregados de dos o más moléculas de ciclodextrina, o formar complejos ciclodextrina-fármaco y estos agregados pueden actuar incrementando la solubilidad por ellos mismos, estableciendo enlaces exteriores con las moléculas de fármaco o a través de estructuras micelares.

Aunque la forma más común de acometer el estudio de los complejos ciclodextrina-fármaco sea a través de medidas de solubilidad, en este trabajo de Tesis Doctoral se presenta una posibilidad alternativa: las determinaciones volumétricas y de parámetros de difusión, para evidenciar la existencia de estas interacciones, conjuntamente con estudios de viscosidad que permiten hacer una estimación del tamaño de las especies difundentes y, consiguientemente, extraer información sobre el tipo de complejo que se estaría formando.

1.2. Metilxantinas

Según Gilbert [47] las metilxantinas son, posiblemente, los agentes farmacológicos más utilizados [47-48]. Estos compuestos son metabolitos secundarios de las plantas y están presentes en numerosos productos y bebidas de origen vegetal, tales como el café, el té y el chocolate. Estructuralmente, las xantinas son derivados purinérgicos formados por los heterociclos pirimidina e imidazol condensados, dando lugar a las metilxantinas, cafeína, teofilina, y teobromina (Figura 3) [49]. Son psicoestimulantes, es decir, actúan sobre el sistema nervioso central (SNC) incrementando la actividad motora y el rendimiento intelectual y disminuyendo la fatiga y el sueño. La acción farmacológica de todas ellas es muy similar, debido a su analogía química, siendo la localización de sus grupos metilo lo que determina la especificidad, a nivel terapéutico, de cada uno de los compuestos.

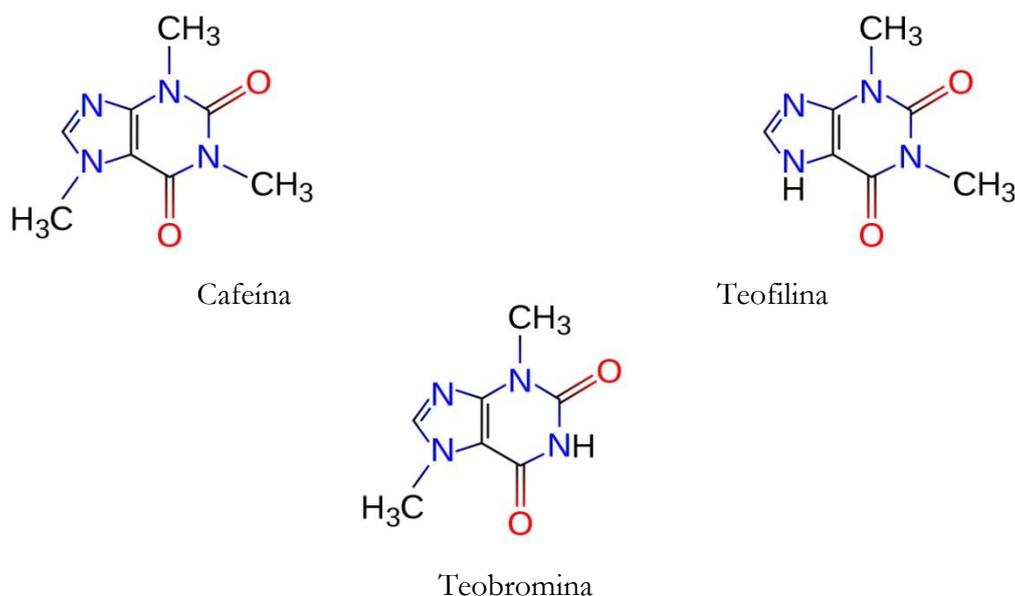


Figura 1.3. Estructura química de la cafeína, teofilina y teobromina

1.2.1. Cafeína

1.2.1.1. Características fisicoquímicas

La cafeína, 1,3,7-trimetilxantina, tiene la fórmula molecular $C_8H_{10}N_4O_2$ y un peso molecular de 194,19 g/mol. Se presenta en forma de polvo blanco, cristalino, inodoro y con sabor amargo. Su punto de fusión está comprendido entre 234 y 236,5 °C [50].

La cafeína es una base débil con un pK_a de 0,78 (mol kg^{-1}) [51] y una solubilidad en agua bastante moderada, 2,17 g/100 mL (25° C) [50]. Esta molécula posee un carácter suficientemente hidrófobo que le permite cruzar las membranas biológicas.

1.2.1.2. Características farmacológicas

1.2.1.2.1. Farmacodinámica y farmacocinética

Según los trabajos de Fredholm *et al.* [52] y Moratalla [53], es la capacidad de alcanzar la corriente sanguínea y llegar al córtex cerebral es lo que le permite a la cafeína actuar como estimulante del sistema nervioso central (SNC). Su acción farmacológica es debida al bloqueo de los receptores de adenosina (inhibidor del SNC) en el cerebro [52], produciendo un incremento en el rendimiento intelectual, aumentando la capacidad de concentración y de atención. Asimismo, incrementa la interacción social y produce sensación de bienestar, sin tener consecuencias depresivas una vez pasado el efecto. También puede desencadenar ansiedad. Los efectos que produce dependen de la dosis administrada. Al igual que otros estimulantes, reduce la sensación de fatiga y mejora la capacidad de desempeño de actividades motoras, además de aumentar el estado de vigilia, retrasando la iniciación del sueño. Incrementa la presión arterial y la frecuencia respiratoria y cardiaca, produciendo diuresis y estimulando la liberación de catecolaminas, en concreto la adrenalina. Asimismo, es antagonista de la acción de los depresores del SNC, tales como los barbitúricos y las benzodiazepinas [53]. El tratamiento repetido con cafeína puede llegar a producir tolerancia o sensibilización, dependiendo del modelo de administración, principalmente a nivel de los efectos cardiovasculares [54].

El metabolismo y la farmacocinética de la cafeína han sido reportados en muchos artículos científicos y libros, de donde destacamos el trabajo de Arnaud *et al.* [55-59] de acuerdo con el cual la cafeína se absorbe casi completamente en el tracto intestinal de forma rápida, aproximadamente a los 45 minutos de su ingestión. La vida media de la cafeína está entre 2,5 y 4,5 horas, de manera que la ingestión repetida en el curso del día aumenta gradualmente los niveles plasmáticos de cafeína, incrementando con ello los efectos que produce [58]. La cafeína se distribuye por todos los tejidos y fluidos corporales. Se metaboliza en el hígado formando paraxantina, teofilina y teobromina, metabolitos que, por su parte, pueden incrementar los efectos de la cafeína en el organismo [60]. Cada uno de estos metabolitos es posteriormente metabolizado y excretado en la orina.

1.2.1.2.2. Aplicaciones farmacológicas

Terapéuticamente, la cafeína se utiliza en combinación con la ergotamina para el tratamiento de la migraña y en combinación con medicamentos anti-inflamatorios no esteroides, en las formulaciones de analgésicos. La cafeína es utilizada, también, como principio activo para tratar diversas afecciones del dolor de cabeza, depresión respiratoria en los recién nacidos, hipotensión y obesidad [61].

1.2.2. Teofilina

1.2.2.1. Características fisicoquímicas

La teofilina, 1,3-dimetilxantina, tiene la fórmula molecular $C_7H_8N_4O_2$ y un peso molecular de 180,16 g/mol. Se presenta en forma de polvo blanco, cristalino, con sabor amargo. Su punto de fusión está comprendido entre 274 y 275 °C [51].

Es un ácido débil, con un pK_a de 0,94 (mol kg^{-1}) [62] y baja solubilidad en agua, entre 0,55-0,80 g/100 mL (25° C) [50] y, al igual que la cafeína, es soluble en lípidos. Así, por ejemplo, es una molécula lo suficientemente hidrófoba como para poder atravesar las membranas biológicas.

1.2.2.2. Características farmacológicas

1.2.2.2.1. Farmacodinámica y farmacocinética

La descripción de las acciones farmacológicas inherentes a teofilina se puede encontrar, por ejemplo, en trabajos de Moratalla [53] y Peck *et al.* [63]. Estos autores le atribuyen la capacidad de relajar la fibra muscular lisa, principalmente de los bronquios y de los vasos sanguíneos pulmonares; aliviar el broncoespasmo y poseer un efecto estimulante sobre la respiración. Le otorgan todavía capacidad de estimular el miocardio y el sistema nervioso central (SNC), disminuir la resistencia periférica, la presión venosa y tener efecto diurético. La acción broncodilatadora de la teofilina se debería esencialmente a la inhibición (no específica) de los receptores de la adenosina y de la fosfodiesterasa [64].

Arnaud *et al.* [55, 58], Hendeles *et al.* [65] y Ogilvie [66] han verificado que la teofilina se absorbe bien después de su administración oral, pero esta absorción puede variar de acuerdo

con la forma farmacéutica utilizada. Generalmente se alcanzan concentraciones plasmáticas máximas a las 2 horas. La dosis de teofilina requerida para alcanzar los niveles séricos terapéuticos, entre los 10 y 20 mg/mL, se ve fuertemente afectada por su metabolismo, por lo que ha de controlarse de forma particular en cada paciente. Su metabolismo y su excreción se asemejan al de la cafeína, dado que la teofilina es uno de sus metabolitos.

1.2.2.2. Aplicaciones farmacológicas

La teofilina se utiliza para el alivio sintomático, o la prevención, de crisis de asma bronquial y de enfermedades pulmonares obstructivas, tales como la bronquitis crónica y el enfisema pulmonar [67-68].

Es un fármaco que se ha prescrito profusamente dado su bajo coste. Pero sus efectos adversos, unidos a la baja eficacia y elevado nivel de toxicidad cuando está fuera de su rango terapéutico, así como a la aparición de fármacos alternativos, han restringido su utilización a nivel clínico [69-70]. De acuerdo con los trabajos de Barnes *et al.* [71, 72] este podrá ser todavía un fármaco con fuerte potencial y bajo coste, principalmente para aplicación en el tratamiento del asma.

1.2.3. Interés farmacológico del desarrollo del sistema metilxantinas-ciclodextrinas para la liberación controlada de estos fármacos.

Con base en las características farmacológicas ya comentadas, se comprende que estos fármacos, las metilxantinas, son buenos modelos para el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos, mediante la formación de complejos fármaco/ciclodextrina, pues

- a) Poseen una solubilidad limitada: ambas xantinas, cafeína y teofilina, son compuestos cuya solubilidad en agua es limitada y ello condiciona su distribución por medio de los fluidos corporales.
- b) Presentan elevados efectos adversos: por encima de sus rangos terapéuticos, ambas xantinas tienen efectos adversos, especialmente en el caso de la teofilina. La utilización de este compuesto está fuertemente condicionada por su pequeño rango terapéutico, que obliga a que la dosis deba estar muy controlada, lo que habitualmente se hace a través de un aumento progresivo de la misma, hasta alcanzar los valores correspondientes a las concentraciones eficaces.

La alternativa a la terapéutica convencional de estos fármacos es su inclusión en un sistema de liberación controlada, que permita una vigilancia más fácil de sus concentraciones plasmáticas.

Referencias bibliográficas

- [1] Gallardo V. C., Ceja J. P. M., Arroyo M. H., Aureoles G. A., Galván D. E., Landa J. F. R., “*Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas.*”, Rev Biomed; 15 (2004) 123- 136.
- [2] Kinghorn A. D., “*Human medicinal agents from plants*”, Balandrin, M. F. (ed.) ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington DC (1993).
- [3] Lee K.-H., “*Discovery and Development of Natural Product-Derived Chemotherapeutic Agents Based on a Medicinal Chemistry Approach*”, J. Nat. Prod., 73 (3) (2010) 500–516.
- [4] Prentis R. A., Lis Y., Walker S. R. Br., “*Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985)*”, J. Clin. Pharmacol., 25 (1988) 387–396.
- [5] Schuster D., Laggner C., Langer T., “*Why Drugs Fail - A Study on Side Effects in New Chemical Entities*”, Curr. Pharm. Design, 11 (27) (2005) 3545-3559.
- [6] DiMasi J. A., “*Risks in new drug development: Approval success rates for investigational drugs*”, Clin. Pharmacol. Ther., 69 (2001) 297–307.
- [7] DiMasi J. A., Hansenb R. W., Grabowskic H. G., “*The price of innovation: new estimates of drug development costs*”, J. Health Econ., 22 (2) (2003) 151–185.
- [8] Wu-Pong S., Rojanasakul Y., “*Biopharmaceutical Drug Design and Development*”, 2nd edition, Humana Press (2008).
- [9] Han C., Wang B., “*Drug Delivery: Principles and Applications*”, Wiley Interscience (2005) chp. 1, 1-15.
- [10] “*Monografías de formas farmacéuticas. Formas farmacéuticas*”, in: Real Farmacopea Española, 3.^a edición, Ministerio de Sanidad y Consumo; Madrid (2005), 645.
- [11] Hoffman A. S., “*The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems*”, J. Control. Release., 132 (3) (2008) 153-163.
- [12] Langer R., “*Polymeric delivery systems for controlled drug release*”, Chem. Eng. Commun., 6 (1980) 1-48.
- [13] Langer R., Peppas N., “*Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems*”, Biomaterials, 2 (1981) 195-210.
- [14] Graham N. B., “*Controlled drug delivery systems*”, Chem. Ind., 15 (1990) 482-486.

- [15] Langer R., Cima L., Tamada J., Wintermantel E., "Future directions in biomaterials", *Biomaterials*, 11 (1990) 738-745.
- [16] Thomas G, "Medicinal Chemistry: An introduction", 2nd Edition, Wiley Interscience, (2007) 44-46.
- [17] Zhou H, "Water insoluble drug formulation", CRC Press (2008) chp. 5, 91-100.
- [18] Uekama K., Hirayama F., Irie T., "Cyclodextrin Drug Carrier Systems", *Chem. Rev.*, 98 (1998) 2045-2076.
- [19] Saltão R., Veiga F., "Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos", *Rev. Bras. Cien. Farm.*, 37 (1) (2001) 1-17.
- [20] Singh M., Sharma R., Banerjee U. C., "Biotechnological applications of cyclodextrins", *Biotechnol. Adv.*, 20 (2002) 341-359.
- [21] Davis M. E., Brewster M. E., "Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future", *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3 (2004) 1023-1035.
- [22] Loftsson T., Duchêne D., "Cyclodextrins and their pharmaceutical applications", *Int. J. Pharm.*, 329 (2007) 1-11.
- [23] Vyas A., Saraf S., "Cyclodextrin based novel drug delivery systems", *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 62 (2008) 23-42.
- [24] Li J., Loh X. J., "Cyclodextrin-based supramolecular architectures: Syntheses, structures, and applications for drug and gene delivery", *Adv. Drug Deliver Rev.*, 60 (2008) 1000-1017.
- [25] Szejtli J., "Cyclodextrins", in: Szejtli J., ed. *Cyclodextrin Technology*. London: Kluwer Academic Publishers, (1988) 1-78.
- [26] Szejtli J., "Comprehensive Supramolecular Chemistry"; Pergamon: Oxford (1996) Vol. 3.
- [27] Bender M. L.; Momiyama M., "Cyclodextrin Chemistry", Springer: Berlin (1978).
- [28] Jones S. P., Grant D. J. W., Hadgraft J., Parr D., "Cyclodextrins in the pharmaceutical sciences Part 1. Preparation, structure, and properties of cyclodextrins and cyclodextrin inclusion compounds", *Acta Pharm. Tech.*, 30 (3) (1984) 213-223.
- [29] Duchene D., Wouessidjewe D., "The current state of β -cyclodextrin in pharmaceuticals", *Acta Pharm. Tech.*, 36 (1990) 1-6.
- [30] Duchene D, Vaution C., Glomot F., "Cyclodextrins, their value in pharmaceutical technology", *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 12 (1986) 2193-2215.

-
- [31] Thompson D. O., “*Cyclodextrin enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals*”, *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 14 (1997) 1-104.
- [32] Loftsson T., Brewster, M. E., “*Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization*”, *J. Pharm. Sci.* 85, (1996) 1017–1025.
- [33] Coleman A. W., Nicolis I., Keller N., Dalbiez, J. P., “*Aggregation of cyclodextrins: an explanation of the abnormal solubility of β -cyclodextrin*”, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 13 (1992) 139–143.
- [34] Loftsson T., Brewster M. E., “*Cyclodextrins as pharmaceutical excipients*”, *Pharm. Tech. Eur.*, 9 (5) (1997) 26-34.
- [35] Szejtli J., “*Cyclodextrins properties and applications*”, *Drug. Invest.*, 2 (4) (1990) 11-21.
- [36] Dodziuk H., “*Cyclodextrins and their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications*”, Weinheim: Wiley-VCH Verlag, (2006) chp. 1.
- [37] Liu L., Guo Q. X., “*The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins*”, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 42 (2002) 1–14.
- [38] Stella V. J., Rajewski R. A., “*Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery*”, *Pharm. Res.*, 14 (1997) 556–567.
- [39] Backensfeld T., Müller B., Kolter K., “*Interaction of NSA with cyclodextrins and hydroxipropyl cyclodextrin derivatives*”, *Int. J. Pharm.*, 74 (1991) 85-93.
- [40] Toros De Ilarduya M., Martín C., Goñi M., Martínez-Ohárriz M., “*Solubilization and interaction of sulindac with β -cyclodextrin in solid state and in aqueous solution*”, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 24 (3) (1998) 301-306.
- [41] Becket G., Schep L., Tan M. “*Improvement of the in vitro dissolution of praziquantel by complexation with α , β , and γ -cyclodextrins*”, *Int. J. Pharm.*, 179 (1999) 65-71.
- [42] Loftsson T., Ólafsdóttir B., Frioriksdóttir H., Jónsdóttir S., “*Cyclodextrin complexation of NSAIDs: physicochemical characteristics*”, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 1 (1993) 95-101.
- [43] Rainsford K. N., “*Novel physicochemical approaches for reducing gastric mucosal injury by drug complexation with cyclodextrins*”, *Drug Invest.*, 2 (4) (1990) 3-10.
- [44] Otero-Espinar F., Anguiano-Igea S., Blancomendéz J., Vila-Jato J., “*Reduction in the ulcerogenicity of naproxen by complexation with β - cyclodextrin*”, *Int. J. Pharm.*, 70 (1991) 35-41.
-

- [45] Loftsson T., Másson M., Brewester M. E., “*Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes*”, *J. Pharm. Sci.*, 93 (5) (2004) 1091-1099.
- [46] Loftsson T., Másson M., Brewester M. E., “*Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs*”; *J. Pharm. Sci.*, 91 11 (2002) 2307-2316.
- [47] Gilbert R. M., “*Caffeine Consumption*”, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 158 (1984) 185-213.
- [48] Barone J. J., Roberts H. R., “*Caffeine consumption*”, *Food Chem. Toxicol.*, 34 (1996) 119–129.
- [49] Ashihara H., Crozier A., “*Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants*”, *Adv. Bot. Res.*, 30 (1999) 117 205.
- [50] *The Merck Index*, 14th Edition; (2006).
- [51] Spiro M., Grandoso D. M., “*Protonation constant of caffeine in aqueous solution*”, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.I*, 85 (1989) 4529-426.
- [52] Fredholm B. B., Battig K., Holmen J., Nehlig A., Zvartau E. E., “*Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use.*”, *Pharmacol. Rev.*, 51 (1999) 83-133.
- [53] Moratalla R., “*Neurobiología de las metilxantinas*”, *Trastornos Adictivos*, 10(3) (2008) 201-207.
- [54] Rogers P. J., Richardson N. J., DERNONCOURT C., “*Caffeine use: is there a net benefit for mood and psychomotor performance?*”, *Neuropsychobiology*, 31 (1995) 195-199.
- [55] Arnaud M. J., Welsch C. “*Theophylline and caffeine metabolism in man*” in: Woodcock B. G., Staib A. H., Rietbrock N. (eds) “*Methods in clinical pharmacology, 3: theophylline and other methylxanthines*”, Vieweg, Brunswick (1982) 135-148.
- [56] Arnaud M. J., “*Products of metabolism of caffeine*”, in: Dews P. B. (ed) “*Caffeine*” Springer, Berlin (1984) 3-38.
- [57] Arnaud M. J., “*The pharmacology of caffeine*”, *Prog. Drug Res.*, 31 (1987) 273-313.
- [58] Arnaud M. J., “*Metabolism of caffeine and other components of coffee*”, in: Garattini S.(ed) “*Caffeine, coffee and heart*”, Raven Press, New York (1993) 45-95.
- [59] Arnaud M. J., “*Pharmacokinetics and metabolism of caffeine*”. in: Snel J., Lorist M. M. (eds), “*Nicotine, caffeine and social drink, behaviour and brain function*”, Harwood, Amsterdam (1998) 153-165.

-
- [60] Dews P. B., “*Caffeine: Perspectives from Recent Research*”, Berlin: Springer-Verlag. (1984).
- [61] Sawynok J., “*Pharmacological rationale for the clinical use of caffeine*”, *Drugs*, 49 (1) (1995) 37-50.
- [62] Nishijo J., Yonetani I., “*The Interaction of Theophylline with Benzylamine in Aqueous Solution*”, *Chem. Pharm. Bull.*, 30 (1982) 4507-4511.
- [63] Peck C. C., Nichols A. I., Baker J., Lenert L. L., Ezra D., “*Clinical pharmacodynamics of theophylline*”, *J Allergy Clin Immunol.*, 76(1985) 292-297.
- [64] Sharron H. F., Konjeti R. S., Hengming K., Jackie D. C., “*Inhibition of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases by Methylxanthines*” in “*Methylxanthines, Handbook of Experimental Pharmacology*”, Fredholm B. B. (ed), Springer Verlag Berlin Heidelberg (2011) 93-134.
- [65] Hendeles L., Massanari M. J., Weinberger M., “*Theophylline*”, in: Evans W. E., Schentag J. J., Jusko W. J. (eds), “*Applied pharmacokinetics*”, 2nd ed. Applied Therapeutics, San Francisco, (1986) 1105-1188.
- [66] Ogilvie R. I., “*Clinical pharmacokinetics of theophylline*”, *Clin. Pharmacokinet.*, 3(4) (1978) 267-293.
- [67] Rottier B. L., Duiverman E. J., “*Anti-inflammatory drug therapy in asthma*”, *Paediatr. Respir. Rev.*, 10(4) (2009) 214-219.
- [68] Press N. J., Gessi S., Borea P. A., Polosa R., “*Therapeutic potential of adenosine receptor antagonists and agonists*”, *Expert Opin. Ther. Pat.*, 17(8) (2007) 979-991.
- [69] Odajima Y., Okada K., Kato T., Nakano H., “*A clinical review of patients with convulsions during theophylline administration II: points to consider in administration and prognosis as determined in patients with theophylline toxicosis*”, *Arerugi.*, 56(7) (2007) 691-698.
- [70] Szentmiklósi A. J., Cseppentő A., Gesztelyi R., Zsuga J., Körtvély A., Harmati G., Nánási P. P., “*Xanthine derivatives in the heart: blessed or cursed?*”, *Curr Med Chem.*; 18(24) (2011) 3695-3706.
- [71] Barnes P. J., Pauwels R. A., “*Theophylline in the management of asthma: time for reappraisal?*”, *Eur Respir J.*, 7 (1994) 579–591.
- [72] Barnes P. J., “*Theophylline: New Perspectives for an Old Drug*”, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 167 (2003) 813–818.

Capítulo 2

Densidad y volumen molar aparente

La investigación del comportamiento de las disoluciones acuosas es importante en muchas áreas. Dicho comportamiento viene determinado por la naturaleza de las interacciones soluto-disolvente y soluto-soluto [1], pudiendo observarse los cambios inducidos por los solutos sobre la estructura espacial del disolvente. El desarrollo de modelos termodinámicos semiempíricos para la predicción de propiedades en disolución acuosa se basa en esta información, especialmente en disoluciones diluidas.

Con todo, para comprender las posibles interacciones en disolución acuosa es necesario entender el proceso de disolución, las características de los solutos hidratados, así como el comportamiento del disolvente. El proceso de disolución, tanto de electrólitos como de moléculas neutras, es una transformación relativamente compleja en virtud del elevado número de aspectos a tener en cuenta, entre los que juega un papel importante el proceso de solvatación [2], hidratación en el caso de que el disolvente sea agua.

La adición del soluto al disolvente implica la rotura de enlaces intermoleculares en dicho disolvente, para crear en su seno una cavidad con un tamaño capaz de recibir a la molécula de soluto. La magnitud de las interacciones que, consecuentemente, se crean entre el soluto y el disolvente, va a depender de la naturaleza hidrófoba o hidrófila del soluto, lo que se reflejará en un mayor o menor cambio en la organización estructural del medio.

La entrada de un soluto apolar en el agua, da lugar a un proceso de hidratación hidrófoba, que habitualmente va acompañado por un aumento de organización estructural del disolvente [3-8]. Sin embargo, la entrada de un soluto polar produce una hidratación hidrofílica que, debido a que el soluto dispone de grupos donantes o aceptadores de protones y, por lo tanto, tiene capacidad para establecer puentes de hidrógeno con el agua, es un proceso menos previsible, que dependerá de la existencia o no, de una parte apolar en la

molécula del soluto y de que ésta tenga un mayor o menor predominio, para el comportamiento final de la disolución. Si es la parte polar la que tiene mayor peso, la disolución acuosa es considerada una disolución normal [9-10].

En el caso de los electrólitos, el efecto sobre la estructura del agua es distinto, ya que su entrada en la disolución conlleva una disociación del soluto y, por lo tanto, la aparición de especies iónicas que, en la disolución, estarán hidratadas. El campo eléctrico originado por cada ión en disolución obliga a una reorganización de las moléculas de agua a su alrededor, en la capa de hidratación. Además, el agua en el entorno relativamente próximo del ión hidratado también se ve afectada y, dependiendo de la relación de fuerzas entre el ión y el agua, de una parte y, por otra, de las moléculas de agua entre sí, estos iones pueden ser clasificados como organizadores de la estructura del disolvente o *structure-making* (si tienen una fuerte interacción con el agua y aumentan la organización estructural del medio) o como desorganizadores de la estructura del disolvente o *structure-breaking* (si el efecto neto final es la disminución de la organización estructural del agua a su alrededor) [11,6].

La caracterización de esas interacciones en disolución acuosa, a un nivel molecular, puede realizarse mediante la obtención de propiedades directamente relacionadas, tales como los volúmenes molares parciales. De hecho, la determinación de magnitudes molares parciales a dilución infinita, a partir de datos experimentales, tiene una importancia fundamental, ya que en ese estado las interacciones soluto-soluto están ausentes. Puesto que entonces el comportamiento complejo tiene su origen en la naturaleza de las interacciones soluto-agua y en el efecto del soluto sobre la estructura del medio acuoso, el estudio del volumen molar parcial de un soluto, a dilución infinita, provee información importante acerca de los procesos de hidratación que le están asociados. Además, el estudio de la dependencia con la concentración del volumen molar parcial y del volumen molar aparente, puede ser utilizado para analizar las interacciones entre los solutos [12].

2.1. Volumen molar parcial y volumen molar aparente

Para una disolución binaria, sistema de 2 componentes: soluto y disolvente, el volumen total del sistema, esto es, el volumen real de la disolución, a temperatura y presión constantes, puede expresarse como suma de las aportaciones de ambos componentes, mediante el uso de los volúmenes molares parciales del disolvente, \bar{V}_1 , y del soluto \bar{V}_2 , de acuerdo con

$$V = n_1 \bar{V}_1 + n_2 \bar{V}_2 \quad (2.1.1)$$

donde n_1 y n_2 son los moles de disolvente y de soluto, respectivamente, en la disolución. El volumen por cada mol de la disolución viene definido por

$$V_m = x_1 \bar{V}_1 + x_2 \bar{V}_2 \quad (2.1.2)$$

donde x_1 y x_2 son las fracciones molares de disolvente y de soluto, respectivamente.

El volumen molar parcial del soluto (componente 2) en la disolución, se define como la variación de volumen de dicha disolución producida por la adición de un mol más de dicho soluto, a un gran volumen de disolución, manteniendo todas las demás propiedades constantes (T , p , y la cantidad de disolvente).

$$\bar{V}_2 = \left(\frac{\partial V}{\partial n_2} \right)_{T, p, n_1} \quad (2.1.3)$$

Si se considera que la contribución del volumen del disolvente, al volumen total de la disolución, es igual a la que correspondería si estuviese en su estado puro, se puede definir una nueva propiedad: el volumen molar aparente del soluto (ϕ_V). Bajo esta suposición, a temperatura y presión constantes, el volumen molar aparente del soluto (ϕ_V) vendría dado por [13]

$$\phi_V = \frac{V - n_1 \bar{V}_1^0}{n_2} \quad (2.1.4)$$

siendo \bar{V}_1^0 el volumen molar del disolvente puro [13], cuyo valor depende únicamente de la temperatura y de la presión. La ecuación (2.1.4) puede modificarse para obtener el valor de ϕ_V a partir de medidas de la densidad de la disolución, ρ , y de la densidad del disolvente puro, ρ_1 [14]. Si se considera 1 kilogramo de disolvente, $n_1 = 1000/M_1$ y $n_2 = m$ siendo m la molalidad de la disolución (mol/Kg de disolvente). Por tanto, la ecuación (2.1.1) se puede escribir como

$$V = \frac{1000 \bar{V}_1^0}{M_1} + m \phi_V \quad (2.1.5)$$

donde M_1 es el peso molecular del disolvente, expresado en ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$). Dado que $\rho_1 = M_1 / \bar{V}_1^0$ la ecuación (2.1.5) se transforma en

$$V = \frac{1000}{\rho_1} + m\phi_V \quad (2.1.6)$$

donde m es la molalidad de la disolución. Dado que el volumen de la disolución es igual a la masa total de la disolución dividido por su densidad, ρ , la ecuación (2.1.6) puede escribirse como

$$\frac{1000 + mM_2}{\rho} = \frac{1000}{\rho_1} + m\phi_V \quad (2.1.7)$$

de donde, despejando ϕ_V se obtiene, finalmente, la siguiente ecuación para el volumen molar aparente del soluto

$$\phi_V = \frac{M_2}{\rho} + \frac{1000}{m} \frac{\rho_1 - \rho}{\rho_1 \rho} \quad (2.1.8)$$

Combinando adecuadamente las ecuaciones (2.1.1) y (2.1.4) y teniendo en cuenta la ecuación (2.1.3), se obtiene que

$$\bar{V}_2 = \phi_V + n_2 \left(\frac{\partial \phi_V}{\partial n_2} \right)_{T,p,n_1} \quad (2.1.9)$$

En condiciones de concentración infinitesimal, es decir, cuando el número de moles de soluto n_2 se acerca a cero (y, consecuentemente, las interacciones entre soluto y disolvente apenas se producen en la disolución acuosa) el segundo sumando de la ecuación (2.1.9) se hace cero y el volumen molar parcial del soluto en esta situación de concentración infinitesimal \bar{V}_2^0 coincide con su volumen molar aparente ϕ_V^0 .

Para extrapolar los valores del volumen aparente a la situación de concentración infinitesimal, Masson [15], siguiendo el patrón establecido por la teoría de Debye-Hückel, desarrolló para electrólitos en disolución acuosa, una ecuación empírica en función de la raíz cuadrada de la concentración molar del soluto en la disolución

$$\phi_V = \phi_V^0 + S_V^0 \sqrt{c} \quad (2.1.10)$$

donde S_V^0 es un parámetro experimental característico de cada soluto. Esta ecuación fue comprobada por otros investigadores [16-17] con diferentes disoluciones de electrólitos, encontrando que representa adecuadamente la dependencia con la concentración del volumen molar aparente de electrólitos, en un amplio rango de temperaturas y concentraciones. Para el caso de solutos neutros, Redlich [18] demostró, con posterioridad

que, para disoluciones diluidas, el volumen molar aparente de estos solutos responde mejor a una dependencia lineal con la concentración molar, de acuerdo con la expresión siguiente

$$\phi_V = \phi_V^0 + b_V c \quad (2.1.11)$$

donde b_V representa la pendiente de la recta correspondiente, que está relacionada con las interacciones soluto-soluto en la disolución. En ambos casos, el valor de la pendiente del volumen molar aparente en función de la concentración de soluto, genera un criterio para definir la hidrofobicidad del soluto. En efecto, si la pendiente límite es positiva, entonces en la región diluida predomina la interacción hidrofílica sobre la hidrofóbica y cuanto menor es su valor, menor es el predominio hidrofílico.

2.2. Volúmenes molares aparentes en disoluciones multicomponentes

2.2.1. Regla de Young

En disoluciones que contienen más de un soluto, como en el presente trabajo de Tesis Doctoral, la determinación de las propiedades termodinámicas aumenta de complejidad. Si un soluto adicional está presente en la disolución, la determinación de las propiedades termodinámicas de esta disolución debe ser tratada en consecuencia y el efecto del soluto adicional, tenido en cuenta. Young y Smith, a partir del estudio de disoluciones de electrólitos [19], propusieron una regla de aditividad que permite el cálculo de un valor “promedio” para la propiedad molar aparente experimental de una disolución que contiene múltiples solutos, como suma de las propiedades molares aparentes de cada uno de estos solutos. Es decir, el volumen molar aparente medio observado experimentalmente, esto es, el cambio que experimenta el volumen del sistema acuoso multicomponente, cuando se añade un mol de uno de los electrólitos a la disolución acuosa, se puede predecir como el valor promedio de los volúmenes molares aparentes de las disoluciones de estos mismos electrólitos, a una fuerza iónica igual a la de la mezcla. Es decir, si se define el volumen molar aparente medio del sistema multicomponente, ϕ_V de acuerdo a la ecuación (2.2.1)

$$\phi_V = \frac{\sum m_i \phi_i}{\sum m_i} \quad (2.2.1)$$

donde m_i y ϕ_i son, respectivamente, la molalidad y el volumen molar aparente del electrólito i ; la aplicación de la ecuación (2.2.1) a una disolución acuosa en la que hay presentes dos electrólitos, conduce a la expresión

$$\phi_V = \frac{m_2\phi_2 + m_3\phi_3}{m_2 + m_3} \quad (2.2.2)$$

donde las molalidades, m , y los volúmenes molares aparentes, ϕ_V , de los solutos vienen referidos con los subíndices 2 y 3.

2.2.2. Volúmenes de transferencia

En el caso de que sea de interés conocer el comportamiento particular de uno de los solutos en una disolución multicomponente, en presencia del disolvente y de otro soluto, estos dos últimos podrán considerarse conjuntamente como si constituyesen un disolvente mixto y el análisis de las interacciones con este disolvente mixto, podrá realizarse definiendo un volumen molar de transferencia. Es decir, la diferencia entre los volúmenes molares parciales (ó aparentes) a concentración infinitesimal, del soluto cuyo estudio se pretende, en el disolvente considerado mixto (el disolvente más el otro soluto) y en el disolvente puro. De acuerdo a lo anterior, se tiene

$$\Delta\phi_V^0 = \phi_V^0(\text{disolvente mixto}) - \phi_V^0(\text{disolvente puro}) \quad (2.2.3)$$

A concentración infinitesimal, las interacciones entre las moléculas de solutos se desvanecen y, por lo tanto, los volúmenes de transferencia observados son tan solo el resultado de las interacciones entre las moléculas del soluto y las del disolvente.

A nivel molecular, los cambios de volumen que sufre un soluto cuando es transferido desde el agua hasta un disolvente mixto, pueden ser explicados mediante el modelo de superposición de esferas de hidratación, desarrollado por Friedman y Krishnan [20], según el cual, el efecto de la superposición de las esferas de hidratación es destructivo. La superposición de las esferas de hidratación de dos especies iónicas, produce un aumento de volumen, que lleva a una disminución en la tendencia desorganizadora de la estructura del ión y una reducción en el fenómeno de la electrostricción del agua, causada por su presencia. Las interacciones por puentes de hidrogeno entre grupos de carácter hidrófilo, conllevan igualmente a una contribución positiva al volumen. Y el solapamiento de esferas de

hidratación de dos grupos hidrófobos, o bien de un grupo hidrófobo y un grupo iónico, producen una disminución neta en el volumen.

Volúmenes de transferencia desde el agua hasta el disolvente mixto que sean cada vez más negativos, sugieren que en éste último, las interacciones del tipo hidrófilo–hidrófobo ó entre grupos hidrófobos, predominan sobre las del tipo hidrófilo–iónico ó entre grupos hidrófilos; mientras que valores positivos para los volúmenes de transferencia, dan información del predominio de las interacciones de tipo hidrófilo.

2.2.3. Cálculo de las constantes de asociación de solutos a partir de valores de los volúmenes molares parciales

El estudio de volúmenes molares parciales de solutos de interés farmacéutico, como en el caso de este trabajo de Tesis Doctoral, se ha desarrollado básicamente con el fin de facilitar, por una parte, el diseño de medicamentos y, por otra, como ayuda para proponer mecanismos del proceso de transferencia de fármacos a través de membranas biológicas [21-22]. Dentro del primer grupo, se han realizado estudios dirigidos a la búsqueda de información útil en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos, por ejemplo, mediante la determinación de volúmenes molares aparentes a consecuencia de la asociación de fármacos con ciclodextrinas [23-24]. Terekhova *et al.*, propusieron un modelo teórico que permite la estimación de constantes de equilibrio para la asociación de solutos en disolución acuosa, teniendo en cuenta la regla de Young (ec. (2.2.2)) para un modelo de unión 1:1 entre una ciclodextrina y un fármaco. Según este modelo, el volumen ϕ_V , que se determina separadamente para cada componente de la disolución, puede ser expresado en términos de los volúmenes de todas las especies presentes en el sistema, tanto libres como asociadas, según

$$\phi_V = (1 - \alpha_c) \phi_{V,f} + \alpha_c \phi_{V,c} \quad (2.2.4)$$

donde α_c es la fracción de moléculas asociadas y $\phi_{V,f}$ y $\phi_{V,c}$ son, respectivamente, los volúmenes aparentes de las especies libres y de las especies totalmente asociadas. Las contribuciones como consecuencia de posibles equilibrios de protonación y/ó ionización de las moléculas de fármaco, no se toman en consideración en este modelo.

La fracción de cada especie asociada viene dada por (en el caso de la ciclodextrina)

$$\alpha_c = \frac{Km_{CD,f}m_{Farmaco,f}}{m_{CD}} \quad (2.2.5)$$

y

$$m_{CD} = m_{CD,f}(1 + Km_{Farmaco,f}) \quad (2.2.6)$$

donde m_{CD} es la concentración estequiométrica de la ciclodextrina, mientras que $m_{CD,f}$ y $m_{Farmaco,f}$ son las concentraciones de la ciclodextrina y del fármaco en estado libre, respectivamente. La combinación de las ecuaciones (2.2.4), (2.2.5) y (2.2.6) conduce a

$$\phi_{V,CD} = \frac{\phi_{V,f} + K\phi_{V,c}m_{Farmaco,f}}{1 + Km_{Farmaco,f}} \quad (2.2.7)$$

La resolución analítica de la ecuación (2.2.7), a través del método de mínimos cuadrados, permite obtener ϕ_V para cada uno de los componentes, así como el valor de K y de $\phi_{V,c}$, el volumen molar aparente de la especie complejada.

Referencias bibliográficas

- [1] Robinson R. A., Stokes R. H., “*Electrolyte solutions*”, 2nd Ed. revised, Butterworths, London (1965).
- [2] Hout J. Y., Jolicoeur C., in “*The Chemical Physics of Solvation. Part A. Theory of Solvation*”, Dogonadze R. R., Kalman E., Kornyshev A. A., Ulstrup J., (ed) Elsevier: Amsterdam (1985).
- [3] Franks F., Smith H. T., “*Volumetric properties of alcohols in dilute aqueous solutions*”, Trans. Faraday Soc., 64 (1968) 2962-2972.
- [4] Franks F., Smith H. T., “*Precision densities of dilute aqueous solutions of the isomeric butanols*”, J. Chem. Eng. Data, 13 (1968) 538-541.
- [5] Franks F., Desnoyers J. E., in “*Water Science Review*”, 1, Franks F., Desnoyers J. E (eds.) Cambridge Univ. Press (1985) 171-232.
- [6] Frank H. S., Evans M. W., “*Free volume and entropy in condensed systems. III. Entropy in binary liquid mixtures; partial molal entropy in dilute solutions; structure and thermodynamics in aqueous electrolytes*”, J. Chem. Phys., 13 (1945) 507-532.
- [7] Keronei P. K., “*Intermolecular Interactions in Aqueous Binary Mixtures of Non-electrolytes*”, Thesis, University of Auckland, New Zealand, (1995) <http://researchspace.auckland.ac.nz>.
- [8] Franks F., Reid D. S., in “*Water: A Comprehensive Treatise*”, Vol. 2, Franks F. (ed.) Plenum Press, New York (1973) 330-374.
- [9] Rowlinson J. S., “*Liquids and Liquid Mixtures*”, Butherwoths, London (1959).
- [10] Franks F., in “*Hydrogen-Bonded Solvent Systems*”, in Covington A. K., Jones P. (eds), Taylor and Francis, London (1968).
- [11] Gourney R. W., “*Ionic Processes in Solution*”, McGraw-Hill Book Company Inc, N.Y, (1953).
- [12] Millero F. J., “*The Molal Volumes of Electrolytes*”, Chem. Rev., 71 (2) (1971) 147-176.
- [13] Marignac M. C., “*Recherché sur les chaleurs spécifiques, les densités et les dilatations de quelques dissolutions*”, Ann. Chim. Phys., 22 (1871) 385-444.

- [14] Wood S. E., Battino R., “*Thermodynamics of Chemical Systems*”, Cambridge University Press (1990) chp. 6.
- [15] Masson D. O., “*Solute molecular volumes in relation to solvation and ionization*”, *Phil. Mag.*, 8 (7) (1929) 218-235,
- [16] Geffcken W., “*On the apparent molar volumes of dissolved electrolytes*”, *Z. Phys. Chem. Abt. A*, 155 (1931) 1-28.
- [17] Scott A. F., “*The apparent volumes of salts in solutions: I. The test of empirical rule of Masson*”, *J. Phys. Chem.*, 35 (1931) 2315-2329.
- [18] Redlich O., “*Molar volumes of solute IV*”, *J. Phys. Chem.*, 44 (5) (1940) 619-629.
- [19] Young T. F., Smith M. B., “*Thermodynamic properties of mixtures of electrolytes in aqueous solutions*”, *J. Phys. Chem.*, 58 (1954) 716-724.
- [20] Friedman H. L., Krishnan C. V., “*Water a Comprehensive Treatise*”, in: F. Franks (ed.), vol. 3, Plenum Press, New York (1973) chp. 1.
- [21] Pardo A., Shiri Y., Cohen S., “*Partial molal volumes and solubilities of physostigmine in isopropanol:isopropyl myristate solvents in relation to skin penetrability*”, *J. Pharm. Sci.*, 80 (1991) 567-72.
- [22] Iqbal M., Jamal M. A., Maqsood A., Bashir A., “*Partial molar volumes of some drugs in water and ethanol at 35°C*”, *Can. J. Chem.*, 72 (1994) 1076-1079.
- [23] Terekhova I. V., De Lisi R., Lazzara G., Milioto S., Muratore N., “*Volume And Heat Capacity Studies To Evidence Interactions Between Cyclodextrins And Nicotinic Acid In Water*”, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 92 (1) (2008) 285–290.
- [24] Terekhova I. V., “*Volumetric and calorimetric study on complex formation of cyclodextrins with aminobenzoic acids*”, *Mendeleev Commun.*, 19 (2009) 110-112.

Capítulo 3

Viscosidad

La información concerniente a las interacciones entre un soluto y el disolvente debe basarse en el estudio simultáneo de varias propiedades de las disoluciones, dado que distintas propiedades presentan diferente sensibilidad y responden de manera desigual a una u otra característica de la estructura de la disolución. Además de la investigación relativa a los volúmenes molares parciales de los componentes de la disolución, se puede recurrir al análisis del denominado coeficiente B de viscosidad de Jones-Dole [1], de demostrada utilidad en el estudio de las interacciones entre el soluto y el disolvente.

El coeficiente de viscosidad, usualmente denominado de manera simple como viscosidad (η), es la magnitud física del fluido que caracteriza su resistencia a oponerse al movimiento producido por la acción de una fuerza externa. A un nivel molecular, la viscosidad, no su coeficiente, es de hecho un fenómeno de transporte de momento cinético, producido por la existencia de un gradiente de velocidad en la dirección perpendicular al movimiento global del fluido. Mediante el estudio de esta propiedad de transporte y de su respectivo coeficiente, se puede obtener una visión general de las interacciones que tienen lugar en una disolución, a nivel del soluto y del disolvente. Aunque no exista una teoría que permita correlacionar la viscosidad con propiedades moleculares, el mecanismo de transporte del momento cinético se ha interpretado por distintos autores, fundamentalmente, a partir de dos factores: el volumen libre existente en el líquido [2-6] y el potencial de interacción molecular [1, 7-11].

El trabajo de investigación aquí realizado, centrado en la interacción entre el soluto y el disolvente, se ha basado en la interpretación de los valores obtenidos para los coeficientes de la ecuación de Jones-Dole [1], en el caso de disoluciones de electrólitos, y en el análisis de los coeficientes de la ecuación desarrollada por Einstein [10, 11], a partir de la teoría hidrodinámica para dispersiones diluidas, en el caso de disoluciones de no-electrólitos.

3.1. Coeficientes de Jones-Dole para la interpretación de la viscosidad de disoluciones electrolíticas

Jones y Dole [1] desarrollaron una ecuación que permite relacionar la viscosidad relativa de una disolución de un electrólito, con su concentración

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + Ac^{1/2} + Bc + Dc^2 \quad (3.1.1)$$

donde η es la viscosidad de la disolución, η_0 la viscosidad del disolvente puro, y A , B y D son parámetros que dependen de la temperatura. En esta ecuación, el coeficiente A se relaciona con las fuerzas intermoleculares de largo alcance (interacciones soluto-soluto) y puede ser utilizado como un indicativo de si está ocurriendo o no, algún tipo de asociación en la disolución (Jenkins y Marcus [12] comprobaron que, para los no-electrólitos en disolución acuosa, este coeficiente suele ser muy pequeño e, incluso, puede llegar a ser insignificante). Dicho coeficiente A puede ser evaluado teóricamente [13] si se dispone de datos precisos de viscosidad para concentraciones suficientemente bajas (en disoluciones acuosas, menores de $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), si bien el método de determinación más ampliamente empleado suele ser el de su obtención a partir del ajuste, a la ecuación anterior (3.1.1), de datos experimentales de viscosidad en función de la concentración del soluto.

El coeficiente B se asocia a las interacciones soluto-disolvente que tienen lugar en la disolución y se utiliza como indicativo del carácter formador de estructura (*structure-making*) o rompedor de estructura (*structure-breaking*) del electrólito en la disolución. Es decir, un coeficiente B de viscosidad positivo se asocia a solutos con capacidad organizadora de la estructura del disolvente (*structure-making*). Así, por ejemplo, si el disolvente es agua, dicha capacidad implica que el soluto se encuentra fuertemente hidratado en la disolución y, por ello, el cambio en la viscosidad de la disolución es más acentuado con el aumento de la concentración. Asimismo, su presencia en el medio puede propiciar la formación de agregados hidrófobos en la disolución acuosa. Por el contrario, un coeficiente B de viscosidad negativo se asocia a solutos que tienen capacidad rompedora de la estructura del agua (*structure breaking*) y de los agregados hidrófobos en disolución acuosa y, además, indica que el soluto está débilmente hidratado.

Esta clasificación se correlaciona bastante bien con otras planteadas por otros autores, como es el caso de la serie de *Hofmeister* (que clasifica los iones como *cosmotrópicos* o *caotrópicos*

y los ordena según su capacidad de estabilizar proteínas y membranas [14, 15]). Sin embargo, por el momento no existe una teoría que relacione directamente el valor del coeficiente B con la estructura del agua. Es decir, cualitativamente sí se han podido obtener conclusiones importantes a partir de la interpretación del valor de este coeficiente pero, a pesar de que sus valores y las conclusiones de ellos derivadas, se encuentran ampliamente aceptados por la comunidad científica y, por ello, recogidos en la literatura científica [12, 16-17], hasta el momento presente no se ha elaborado una teoría que permita hacerlo a un nivel cuantitativo.

Stokes y Mills [7] desarrollaron un modelo para disoluciones acuosas de electrólitos que permite considerar la viscosidad de la solución y, en consecuencia, el coeficiente B , como una suma de toda una serie de contribuciones: las debidas a las interacciones electrostáticas entre los iones; las derivadas del tamaño y forma de cada ión hidratado (hidrodinámica del ión); las que guardan relación con la orientación del disolvente a consecuencia del campo eléctrico del ión; y por último, las derivadas de posibles restricciones de orientación entre moléculas del disolvente afectadas por la presencia del ión y moléculas del disolvente no perturbadas por éste. Sin embargo este modelo conlleva la enorme dificultad de la división en contribuciones iónicas individuales.

Nightingale [18] ha señalado la especial importancia de la variación de B con la temperatura, en el sentido de adquirir información estructural. El significado usualmente atribuido al signo y la magnitud de dB/dT , reflejaría el efecto de los solutos sobre la estructura del agua e indicaría el grado hidrófobo en el comportamiento del soluto. Valores de B positivos, conjugados con un coeficiente de temperatura negativo, se atribuyen a solutos con efecto organizador (*structure making*) sobre la estructura del agua, mientras que valores de B negativos, asociados a un coeficiente de temperatura positivo, estarían relacionados con solutos cuyo efecto sobre el agua sería disruptivo de su estructura (*structure breaking*) [19-21]. El comportamiento de estos últimos se podría explicar por la disminución en la organización estructural del agua, que ocurre cuando se eleva la temperatura, de modo que la agitación térmica haría disminuir la organización estructural, que podría, incluso, llegar a romperse a una temperatura más elevada. No obstante lo anterior, estos autores señalan que existirían iones, que ellos denominan como formadores *anómalos* de estructura, que presentan valores de B positivos y coeficientes de temperatura igualmente positivos; así como iones voluminosos, esencialmente no hidratados, que presentan valores de B positivos y coeficientes de temperatura negativos (este es el caso, por ejemplo, de los iones de tetralquilamonio).

El coeficiente D de la ecuación (3.1.1) se asocia tanto a las interacciones soluto-soluto como a las soluto-disolvente, siendo este coeficiente importante cuando la concentración de electrólito en la disolución es elevada. Dado que en la mayoría de los casos los estudios con electrólitos se realizan en el rango de bajas concentraciones de soluto, el coeficiente D suele ser despreciado [12]. En particular, en este trabajo de Tesis Doctoral, este coeficiente D no se tuvo en cuenta, al haber restringido el análisis realizado al rango de bajas concentraciones.

3.2. Teoría hidrodinámica y viscosidad de disoluciones no electrolíticas

Para disoluciones de no-electrólitos, el análisis de la influencia de la concentración sobre la viscosidad, puede llevarse a cabo en base a la ecuación de Einstein [10] para la presencia de partículas esféricas dispersas en un medio continuo

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + 2,5\phi + a\phi^2 \quad (3.2.1)$$

donde η_0 y η son las viscosidades del disolvente puro y de la disolución, respectivamente; ϕ es el volumen total de las partículas que están presentes en 1 cm^3 de la disolución y el coeficiente a es un parámetro que cuantifica las interacciones de segundo orden que tienen lugar en el medio. El valor de 2,5 corresponde al caso específico en el que las partículas de soluto se consideren esféricas. Esta ecuación, que identifica el medio continuo con el disolvente y las esferas con el soluto y es válida para disoluciones diluidas, fue posteriormente modificada para poder abarcar concentraciones más elevadas y tener en cuenta otras posibles formas moleculares, además de la esférica [11]. Su aplicación presupone que la entidad cinética del soluto tiene dimensiones bastante superiores a las del disolvente, teniendo en cuenta que el volumen hidrodinámico de la partícula incluye todas las moléculas de disolvente incorporadas a su capa de hidratación.

Si se expresa ϕ en términos del volumen de la entidad cinética de la molécula del soluto, es decir, de su volumen hidrodinámico, V_h , la ecuación de Einstein toma la siguiente forma

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + 2,5 \times 10^{-3} V_h c \quad (3.2.2)$$

donde V_h tiene unidades de $(\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1})$ y la concentración c de (mol dm^{-3}) . El volumen hidrodinámico del soluto incluye a las moléculas del disolvente incorporadas a su capa de

hidratación.

Algunos autores han atribuido un significado estructural a la relación B/\overline{V}_2^0 identificando el volumen hidrodinámico del soluto con el volumen molar parcial a concentración infinitesimal e interpretando las desviaciones de este cociente, con respecto al valor teórico de 2,5 de la ecuación (3.2.2) en términos estructurales [22-23]. Normalmente, valores elevados de B/\overline{V}_2^0 , superiores a 2,5 en medio acuoso, estarían asociados a la estructuración del disolvente promovida por el soluto, o bien a la formación de una primera capa de hidratación alrededor del soluto. Valores de B/\overline{V}_2^0 comprendidos entre 0 y 2,5 corresponderían a especies no hidratadas.

Referencias bibliográficas

- [1] Jones G., Dole M., “*The viscosity of aqueous solutions of strong electrolytes with special reference to barium chloride*”, J. Am. Chem. Soc., 51 (1929) 2950–2964.
- [2] Batschinski A. J., “*Investigations of Internal Friction of Fluids*“, Z. Phys. Chem., 84 (1913) 643-706.
- [3] Hildebrand J. H., “*Motions of molecules in liquids: viscosity and diffusivity*”, Science, 174 (1971) 490-493.
- [4] Horst R., Wolf B. A.,” *Space Filling and Flow Behavior*”, J. Phys. Chem., 94 (1990) 6904-6907.
- [5] Doolittle A. K., “*Studies in Newtonian Flow. II. The Dependence of the Viscosity of Liquids on Free-Space*“, J. Appl. Phys., 22 (1951) 1471-1475.
- [6] Eyring H., “*The Activated Complex in Chemical Reactions* “, J. Chem. Phys., 3 (2) (1935) 107-115.
- [7] Stokes R. H., Mills R., “*Viscosity of Electrolytes and Related Properties*”, in *Interaction Encyclopedia of Physical Chemistry and Chemical Physics*, Vol 3, Pergamon Press, N.Y. (1965).
- [8] Jenkins H. D. B., Pritchett M. S. F., “*A new approach to the analysis of absolute free energies, enthalpies and entropies of hydration of individual gaseous ions and absolute single-ion viscosity B-coefficients*“, J. Chem. Soc. Faraday Trans. I, 80 (1984)721-737.
- [9] Thompson P. T., Durbano M., Turner J. L, Wood R. H, “*Viscosities of solutions of electrolytes and nonelectrolytes in N-methylacetamide at 35° and 55°C*”, J. Sol. Chem., 9 (1980) 955-976.
- [10] Einstein A., “*A New Determination of Molecular Dimensions*”, Ann Phys. Lpz., 19 (1906) 289-305.
- [11] Thomas D. G., “*Transport characteristics of suspension: VIII. A note on the viscosity of newtonian suspensions of uniform spherical particles*“, J. Colloid Sci., 20 (1965) 267-277.
- [12] Donald H., Jenkins B., Marcus Y., “*Viscosity B-coefficients of ions in solution*”, Chem. Rev., 95 (8) (1995) 2695-2724.

-
- [13] Falkenhagen H., Dole M., “*Die Innere Reibung von Elektrolytischen und ihre Deutung nach der Debeschen Theorie*”, Phys. Z., 30 (1929) 611-622.
- [14] Hofmeister F., “*Zur Lehre von der Wirkung der Salze*”, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 24 (1888) 247-260.
- [15] Kunz W., Henle J., Ninham B. W., “*The present state of affairs with Hofmeister effects*”, Curr. Opin. Colloid Interface Sci., 9 (2004) 1-18.
- [16] Desnoyers J. E., Perron G., “*The viscosity of aqueous solutions of alkali and tetraalkyl-Ammonium halides*”, J. Sol. Chem., 1 (1972) 199-212.
- [17] Marcus Y., “*Viscosity B-coefficients, structural entropies and heat capacities, and the effects of ions on the structure of water*”, J. Sol. Chem., 23 (1994) 831-848.
- [18] Nightingale E. R., in “*Chemical Physics of electrolyte solutions*”, Conway B. E., Barradas R. G., (eds.), Wiley, New York (1966) 87.
- [20] Kaminsky M., “*Ion-Solvent Interaction and the Viscosity of Strong- Electrolyte Solutions*”, Disc. Faraday Soc., 24 (1957) 171-179.
- [21] Tyrrel H. J. V., Kennerley M., “*Viscosity B-coefficients between 5° and 20° for glycolamide, glycine, and N-methylated glycines in aqueous solution*”, J. Chem. Soc. (A), (1968) 2724-2728.
- [22] Robertson C. T., Tyrrel H. J. V., “*Viscosity B-coefficients for some substituted anilinium cations in aqueous solution at 25° and 35°*”, J. Chem. Soc (A), (1969) 1938-1942.
- [23] Zhao H., “*Viscosity B-coefficients and standard partial molar volumes of amino acids, and their roles in interpreting the protein (enzyme) stabilization*”, Biophys. Chem., 122 (2006) 157–183.
- [24] Thompson P. T., Fisher B., Wood R. H., “*Viscosities of Solutions of Electrolytes and Non-Electrolytes in Ethylene Carbonate at 40° C*”, J. Sol. Chem., 11 (1982) 1-15.

Capítulo 4

Difusión isotérmica

Hace mucho tiempo que el fenómeno de la difusión es objeto de investigación e interés por parte de la comunidad científica [1].

El fenómeno de la difusión tiene lugar cuando, en una disolución, existe un gradiente de concentración, libre del efecto de corrientes de convección, que origina un flujo espontáneo de materia para así reducir la referida diferencia en la concentración y restaurar el equilibrio. Este proceso se puede interpretar como el resultado de los movimientos permanentes de las partículas existentes en disolución, conocido como movimiento browniano. La difusión es, por tanto, un proceso irreversible importante en la naturaleza, que impone límites en muchos procesos químicos, biológicos y ambientales y se observa en todos los estados físicos de la materia.

La medida cuantitativa de la difusión se expresa a través del coeficiente de difusión de cada componente presente en la disolución, que relaciona la cantidad de flujo de la sustancia, con su gradiente de concentración. La fuerza impulsora de la difusión es el gradiente de potencial químico de la sustancia difundente que, en disoluciones ideales, es igual al gradiente de concentración a temperatura constante.

Normalmente la difusión isotérmica se suele describir a través de las leyes de Fick y de la termodinámica aplicada a los procesos irreversibles.

Aunque la difusión es un fenómeno que ocurre en tres dimensiones, la mayoría de los métodos habitualmente utilizados para su análisis lo confinan a un caso unidimensional, con el fin de simplificar el proceso de medida y el tratamiento matemático.

4.1. Conceptos matemáticos

Supóngase la difusión de un sistema multicomponente en una sola dirección, por ejemplo, a lo largo del eje x . Supóngase, también, que J es la cantidad de materia (en gramos, moles u otra unidad) que cruza, en la unidad de tiempo, un plano de área unitaria perpendicular al eje de la difusión.

La primera ley de Fick [2] para la difusión (4.1.1) dice que, para un determinado componente i , esta cantidad de materia es proporcional a su gradiente de concentración y que la constante de proporcionalidad es el coeficiente de difusión, D , del sistema

$$-\left(J_i\right)=\sum_{j=1}^q D_{ij} \frac{\partial c_j}{\partial x} \quad (i=1,2,\dots,q) \quad (4.1.1)$$

donde c representa la concentración, $\partial c / \partial x$ es la componente del gradiente de concentración en la dirección del eje x e ij representa el efecto del flujo del componente j en el comportamiento del componente i , siendo q el número de componentes independientes existentes en el sistema.

La diferenciación de la concentración respecto a x es parcial, dado que c puede ser igualmente dependiente del tiempo. Con el fin de que D resulte positivo, se introduce el signo negativo delante de la expresión, ya que si x aumenta en la dirección del flujo, la diferencial es negativa [2].

La segunda ley de Fick [3] establecida por derivación de la ecuación (4.1.1) permite evaluar el cambio en la concentración con el tiempo t , debido a la difusión

$$\left(\frac{\partial c}{\partial t}\right)_{x=const.} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D \frac{\partial c}{\partial x} \right) \quad (4.1.2)$$

en donde se considera la coordenada x de acuerdo a lo indicado anteriormente.

Para un espacio a tres dimensiones las leyes de Fick se pueden escribir de la siguiente manera [1]

$$J = -D \text{ grad } c \quad (4.1.3)$$

y

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \text{div} (\text{grad } c) \quad (4.1.4)$$

La resolución de la ecuación (4.1.3) para un proceso unidimensional es posible, ya que se considera como constante el valor del coeficiente de difusión respecto a la concentración [4]. Si bien esta consideración es menos estricta en el caso de los sistemas reales, se utiliza en el ámbito experimental, puesto que la fuerza responsable de la difusión es el gradiente de potencial químico y, por tanto, se considera que la variación del coeficiente de actividad no es significativa respecto a la diferencia de concentraciones responsable de la difusión [1]. En estas condiciones, es razonable suponer que se obtienen coeficientes de difusión diferenciales, con significado termodinámico bien definido. La determinación experimental de coeficientes de difusión se basa en las leyes de Fick, expresiones (4.1.1) y (4.1.2). Ambas han sido desarrolladas en el supuesto de que no hay corrientes de convección dentro de la disolución.

A continuación, se describirá la aplicación de estos conceptos a los sistemas de varios componentes. Para la difusión binaria, las especies vendrán indicadas por A y B (como subíndices). Para sistemas con un mayor número de componentes (sistemas multicomponentes) las especies vendrán indicadas mediante subíndices numéricos 1, 2, 3,..., q . Para el caso particular de la difusión de trazas de soluto, el componente cuya traza se está determinando vendrá indicado por un superíndice (*).

4.1.1. Aplicación en sistemas binarios

Supóngase la difusión en un sistema binario, en las condiciones anteriormente descritas. La primera ley de Fick, para la difusión en un sistema binario [1-2], vendrá dada por

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (4.1.5)$$

En el caso de un sistema en el que el volumen se mantiene constante, se debe utilizar como referencia, un sistema donde los flujos se definen comparativamente a un plano a través del cual no se produce transferencia de volumen.

Para un sistema unidimensional se tiene

$$J_A^V V_A + J_B^V V_B = 0 \quad (4.1.6)$$

donde J_A^V y J_B^V son los flujos, en moles, por unidad de área y de tiempo, de los componentes A y B . Los superíndices indican que el volumen de los planos es fijo, siendo V_A y V_B los volúmenes parciales respectivos.

Estos flujos pueden escribirse como

$$\begin{aligned} J_A^V &= -D_A^V \frac{\partial c_A}{\partial x} \\ J_B^V &= -D_B^V \frac{\partial c_B}{\partial x} \end{aligned} \quad (4.1.7)$$

en los que c_A y c_B son las concentraciones de A y B , en moles por unidad de volumen, y D_A^V y D_B^V , los respectivos coeficientes de difusión.

Combinando las ecuaciones (4.1.6) y (4.1.7) se tiene la expresión

$$D_A^V V_A \frac{\partial c_A}{\partial x} + D_B^V V_B \frac{\partial c_B}{\partial x} = 0 \quad (4.1.8)$$

en la que

$$-D_A^V V_A \frac{\partial c_A}{\partial x} \quad \text{y} \quad -D_B^V V_B \frac{\partial c_B}{\partial x} \quad (4.1.9)$$

definen, respectivamente, el volumen de A y de B transferidos por unidad de tiempo a través de un área unitaria del plano en cuestión.

De la definición de volumen parcial, en un sistema binario

$$V_A c_A + V_B c_B = 1 \quad (4.1.10)$$

se puede escribir

$$V_A \frac{\partial c_A}{\partial x} + V_B \frac{\partial c_B}{\partial x} = 0 \quad (4.1.11)$$

Para que se verifiquen las condiciones (3.1.5) y (3.1.8) es necesario que

$$D_A^V = D_B^V \quad (4.1.12)$$

a menos que $V_A = 0$ ó $V_B = 0$. Este coeficiente se denomina “*coeficiente de difusión mutua*” y se suele representar por D_{AB}^V ó D^V , aunque la mayoría de los autores lo suele designar sólo por D . Por tanto, la difusión en un sistema binario en el cual los volúmenes parciales se mantienen constantes, puede ser descrita únicamente por medio de este coeficiente de difusión.

4.1.2. Aplicación en sistemas ternarios

En un sistema con más de dos componentes independientes entre sí en la disolución, las leyes de Fick son generalmente insuficientes para describir el proceso de difusión global que tiene lugar. En efecto, el flujo de cada componente puede verse afectado por los gradientes de concentración del resto de componentes y esta interacción puede ocurrir, tengan los componentes características iónicas o moleculares [1-2,.5] Restringiendo la difusión a un proceso unidimensional, tal como se hizo en el caso de un sistema binario, el flujo del componente i viene dado por la ecuación (4.1.1).

La introducción de la restricción adicional

$$\sum_{j=1}^q \nabla_i J_j = 0 \quad (4.1.13)$$

en donde ∇_i es el volumen molar parcial del componente i , permite eliminar uno de los flujos, dado que está interrelacionado con los demás mediante esta expresión (4.1.13).

Para un sistema ternario (es decir, $q = 3$) [1,6-9] a volumen constante, indicado mediante el subíndice v , las ecuaciones de difusión mutua de los solutos 1 y 2 pueden describirse mediante las ecuaciones (4.1.14) y (4.1.15)

$$-(J_1) = (D_{11})_v \frac{\partial c_1}{\partial x} + (D_{12})_v \frac{\partial c_2}{\partial x} \quad (4.1.14)$$

$$-(J_2) = (D_{21})_v \frac{\partial c_1}{\partial x} + (D_{22})_v \frac{\partial c_2}{\partial x} \quad (4.1.15)$$

en las que J_i representa el flujo del componente i en la dirección del eje x y $\partial c / \partial x$ es la componente del gradiente de concentración del componente i en la misma dirección. Los coeficientes de difusión principales, D_{11} y D_{22} , proporcionan los flujos de los solutos 1 y 2, respectivamente, inducidos por sus propios gradientes de concentración. Los coeficientes de difusión secundarios, D_{12} y D_{21} , proporcionan el flujo acoplado de cada soluto, inducido por el gradiente de concentración del otro soluto [1, 6-9].

En disoluciones diluidas en las que los solutos no interactúan entre sí, los valores de D_{12} y D_{21} suelen ser muy pequeños por lo que, dentro del rango de imprecisión del método, pueden considerarse nulos. Para sistemas que presentan coeficientes de difusión secundarios que no pueden ser tomados como cero, un coeficiente de difusión D_{ik} ($i \neq k$) positivo revela un *co-transporte* acoplado del soluto i , desde las regiones de concentración elevada del soluto k

hacia las regiones de baja concentración de dicho soluto k . Sin embargo, un valor negativo del coeficiente D_{ik} indica un *contra-transporte* acoplado de soluto i desde regiones de baja concentración del soluto k , hacia regiones de concentración más elevada de esta sustancia.

4.1.3. Aplicación en sistemas cuaternarios

La difusión en un sistema acuoso cuaternario, esto es, soluto 1 + soluto 2 + soluto 3 + agua, descrito de manera sencilla como ijk (en donde el disolvente, componente 0, no se incluye), viene descrita mediante las ecuaciones de difusión (4.1.16) a (4.1.18) [10-12]

$$-J_1 = {}^{123}(D_{11})_v \frac{\partial c_1}{\partial x} + {}^{123}(D_{12})_v \frac{\partial c_2}{\partial x} + {}^{123}(D_{13})_v \frac{\partial c_3}{\partial x} \quad (4.1.16)$$

$$-J_2 = {}^{123}(D_{21})_v \frac{\partial c_1}{\partial x} + {}^{123}(D_{22})_v \frac{\partial c_2}{\partial x} + {}^{123}(D_{23})_v \frac{\partial c_3}{\partial x} \quad (4.1.17)$$

$$-J_3 = {}^{123}(D_{31})_v \frac{\partial c_1}{\partial x} + {}^{123}(D_{32})_v \frac{\partial c_2}{\partial x} + {}^{123}(D_{33})_v \frac{\partial c_3}{\partial x} \quad (4.1.18)$$

en las que J_i representa el flujo molar de soluto i , a través del plano de referencia de volumen fijo y ${}^{ijk}D_{ij}$ son los coeficientes de difusión cuaternarios. Los coeficientes de difusión principales ${}^{123}D_{ii}$ (estos son, ${}^{123}D_{11}$, ${}^{123}D_{22}$, y ${}^{123}D_{33}$) representan el flujo de soluto i producido por su propio gradiente de concentración. Los coeficientes de difusión secundarios ${}^{123}D_{ij}$ (${}^{123}D_{12}$, ${}^{123}D_{13}$, ${}^{123}D_{21}$, ${}^{123}D_{23}$, ${}^{123}D_{31}$, y ${}^{123}D_{32}$) representan el flujo acoplado de soluto i , impulsado por un gradiente de concentración de otro soluto j ó k .

A un sistema acuoso cuaternario, ijk , le corresponden tres sistemas acuosos ternarios, ij , ik , y jk , proporcionados por tres sistemas acuosos binarios correspondientes, i , j y k . El coeficiente de difusión cuaternario principal, ${}^{ijk}D_{ii}$, se puede confrontar con sus correspondientes ternarios, esto es, ${}^{ij}D_{ii}$ y ${}^{ik}D_{ii}$, así como con el valor del binario respectivo, D_i . Para los otros dos coeficientes principales, ${}^{ijk}D_{jj}$ y ${}^{ijk}D_{kk}$, se emplearían razonamientos paralelos. El coeficiente de difusión cuaternario secundario, ${}^{jk}D_{ij}$, únicamente se puede contrastar con un coeficiente de difusión, su homólogo ternario ${}^{ij}D_{ij}$, situación que es también válida para los demás términos secundarios. La comparación de los coeficientes de difusión del sistema ijk con los de los sistemas ij , ik y jk proporciona información sobre el efecto que, sobre los otros dos solutos, produce la adición del tercer soluto. La comparación de los coeficientes de difusión del sistema ijk con los relativos a los sistemas binarios, i , j y k , proporciona información acerca del efecto que produce la adición de cada pareja de solutos al tercero de ellos [10-12].

4.2. Información sobre las interacciones intermoleculares deducida a partir de los datos de difusión

En procesos de difusión que involucran muchos solutos, es interesante disponer de información sobre las interacciones intermoleculares que ocurren en la disolución. Un ejemplo de este tipo de difusión multicomponente se localiza en el cuerpo humano [13]. En la sangre, por ejemplo, tiene lugar la difusión simultánea de oxígeno, azúcares y proteínas. En el intestino delgado, se produce transferencia de masa de sales biliares, grasas y aminoácidos. Los iones sodio y potasio pueden atravesar las membranas celulares, mediante transporte activo. Todos estos procesos fisiológicos implican la difusión simultánea de muchos solutos y su análisis debe ser acometido desde supuestos bastante alejados de la consideración de los sistemas ideales.

Algunos autores han desarrollado modelos que permiten cuantificar esas interacciones moleculares. A continuación se describen someramente estos modelos.

4.2.1. Estimación de constantes de asociación para solutos en equilibrio químico

Para aplicar la Termodinámica de los procesos irreversibles a la ecuación (4.1.1), es necesario imponer algunas restricciones sobre la matriz de los coeficientes D_{ij} [14].

La traza de la matriz debe ser positiva

$$\sum_i D_{ii} > 0 \quad (4.2.1)$$

El determinante de la matriz debe ser mayor o igual que cero

$$|D_{ij}| \geq 0 \quad (4.2.2)$$

Para un sistema ternario, estas restricciones se reducen a

$$D_{11} + D_{22} > 0 \quad (4.2.3)$$

y

$$D_{11}D_{22} + D_{12}D_{21} \geq 0 \quad (4.2.4)$$

Además, para disoluciones diluidas en el componente i , es válida la relación siguiente

$$\lim_{c_i \rightarrow 0} D_{ij} = 0 (i \neq j) \quad (4.2.5)$$

Esta limitación es debida al hecho de que, en ausencia del componente i en la disolución, su flujo se desvanece. A concentraciones de soluto elevadas, la magnitud de los coeficientes de difusión secundaria puede sobrepasar la magnitud de uno o de ambos coeficientes de difusión principales. El motivo para que estos coeficientes sean distintos de cero, puede atribuirse bien a los diferentes volúmenes de las partículas que están intercambiando su posición en el proceso de difusión, o bien a las interacciones entre las especies de solutos. Generalmente, a valores positivos y elevados de D_{ij} ($i \neq j$) se les atribuye la presencia de efectos de *salting-out* y a los valores negativos, la existencia de interacciones atractivas entre los solutos.

Paduano *et al.* [7, 15-17] han desarrollado un modelo teórico que se ha utilizado para realizar la estimación de los valores de las constantes de asociación en sistemas multicomponente, en equilibrio químico, que involucran ciclodextrinas. Tanto su fundamento teórico, como las ecuaciones que permiten correlacionar los coeficientes de difusión con las constantes de equilibrio, están adecuadamente descritos por estos autores y recogidos en la bibliografía, por lo que únicamente se expondrán aquí los puntos más relevantes que conducen a la determinación de las referidas constantes de equilibrio.

En primer lugar, este modelo considera aceptable la aproximación de que en disoluciones diluidas los términos cruzados, coeficientes de difusión secundarios D_{12} y D_{21} , son despreciables y lo son cada vez más a medida que c_1 y c_2 se acercan más a cero. De hecho, los valores límite, a concentración infinitesimal, de estos coeficientes D_{12} y D_{21} deben ser cero, dentro del error experimental. A concentraciones distintas de cero, los valores de los coeficientes secundarios D_{12} y D_{21} son diferentes de cero (aunque, en general, sus valores se encuentran muy cerca de lo que es el valor de la incertidumbre de las medidas). Sin embargo, cuando en el medio disuelto tiene lugar un equilibrio de asociación, se produce un aumento apreciable de los valores de estos términos cruzados.

Para el caso particular de dos solutos en equilibrio químico [7, 15-17], siendo uno de ellos una ciclodextrina (1) y el otro soluto una molécula huésped (2), en un proceso de difusión isotérmica en disolución acuosa, se tiene el equilibrio $1+2 \leftrightarrow 3$ en el que la especie complejada se ha designado como el componente 3 (el disolvente, agua, será el componente 0). En estas circunstancias, las ecuaciones generales de difusión (4.1.14) y (4.1.15) deben ser sustituidas por

$$-(J_1^*) = (D_{11}^*)_v \frac{\partial c_1^*}{\partial x} + (D_{12}^*)_v \frac{\partial c_2^*}{\partial x} + (D_{13}^*)_v \frac{\partial c_3^*}{\partial x} \quad (4.2.6)$$

$$-(J_2^*) = (D_{12}^*)_v \frac{\partial c_1^*}{\partial x} + (D_{22}^*)_v \frac{\partial c_2^*}{\partial x} + (D_{23}^*)_v \frac{\partial c_3^*}{\partial x} \quad (4.2.7)$$

$$-(J_3^*) = (D_{31}^*)_v \frac{\partial c_1^*}{\partial x} + (D_{32}^*)_v \frac{\partial c_2^*}{\partial x} + (D_{33}^*)_v \frac{\partial c_3^*}{\partial x} \quad (4.2.8)$$

donde los términos cruzados, D_{ij}^* , representan las interacciones de los solutos producidas únicamente por el proceso de difusión y son independientes de la reacción química.

Considerando las relaciones siguientes, en términos de las especies constituyentes

$$J_1 = J_1^* + J_3^* \quad (4.2.9)$$

$$J_2 = J_2^* + J_3^* \quad (4.2.10)$$

$$c_1 = c_1^* + c_3^* \quad (4.2.11)$$

$$c_2 = c_2^* + c_3^* \quad (4.2.12)$$

y la constante de asociación, en términos de molaridad

$$K_c = \frac{c_3^*}{c_1^* c_2^*} \quad (4.2.13)$$

que se relaciona con la constante de asociación, en molalidad, a través de la expresión

$$K_c = K_b \left(1000 + \sum_s m_s M_s \right) / 1000 \rho \quad (4.2.14)$$

donde ρ es la densidad de la disolución y M_s es el peso molecular de los solutos (s son la CD y la molécula huésped). Cuando la disolución es diluida, la ecuación (4.2.14) se reduce a

$$K_c = K_b / \rho \quad (4.2.15)$$

Suponiendo que todos los términos secundarios en estas ecuaciones son despreciables e introduciendo las ecuaciones (4.2.6) a (4.2.13), se obtienen, después de reordenar adecuadamente, las siguientes ecuaciones, que permiten estimar K_c ,

$$D_{11} = \frac{1}{2} \left\{ (D_{11}^* + D_{33}^*) + (D_{11}^* - D_{33}^*) [1 - K_c (c_2 - c_1)] R \right\} \quad (4.2.16)$$

$$D_{12} = \frac{1}{2} \left\{ (D_{33}^* - D_{11}^*) + (D_{11}^* - D_{33}^*) [1 - K_c (c_2 - c_1)] R \right\} \quad (4.2.17)$$

$$D_{21} = \frac{1}{2} \left\{ (D_{33}^* - D_{22}^*) + (D_{22}^* - D_{33}^*) [1 - K_c (c_2 - c_1)] R \right\} \quad (4.2.18)$$

$$D_{22} = \frac{1}{2} \left\{ (D_{22}^* + D_{33}^*) + (D_{22}^* - D_{33}^*) [1 - K_c (c_2 - c_1)] R \right\} \quad (4.2.19)$$

donde

$$R = \left\{ [1 + K_c (c_2 - c_1)]^2 + 4K_c c_1 \right\}^{-1/2} \quad (4.2.20)$$

Para obtener una estimación de K_c a partir de las ecuaciones (4.2.16) a (4.2.20), se ha considerado que D_{11}^* y D_{22}^* son iguales, respectivamente, a los valores de los coeficientes de difusión binarios, D_1 (ciclodextrina) y D_2 (huésped) a la concentración correspondiente, corregida por la viscosidad de la disolución en dicha concentración. Los valores de D_{33}^* y K_c son aquellos que mejor ajustan los datos experimentales, dentro de los márgenes de error de estas determinaciones.

4.2.2. Estimación de constantes de asociación a partir de difusión de trazas de solutos

El análisis de la difusión en sistemas binarios y muticomponentes se ha detallado anteriormente. A continuación se describirá el tratamiento relacionado exclusivamente con la difusión de trazas de soluto (1) en disoluciones acuosas que contienen un exceso de un segundo soluto (2) [18-20].

En este caso, las ecuaciones que describen el transporte de solutos en sistemas ternarios (4.1.14) y (4.1.15) se escribirán como

$$-(J_1) = (D_{11})_v^* \frac{\partial c_1}{\partial x} \quad (4.2.21)$$

$$-(J_2) = (D_{21})_v \frac{\partial c_1}{\partial x} + (D_{22})_v \frac{\partial c_2}{\partial x} \quad (4.2.22)$$

donde J_i y $(\partial c_i / \partial x)$ son los flujos molares y los gradientes de concentración de los solutos. Dado que $c_1 \approx 0$, D_{22} será el coeficiente de difusión mutua binario del soluto 2 y D_{11}^* el coeficiente de difusión, a concentración infinitesimal del soluto 1, que a partir de ahora se denominará como el coeficiente de difusión en condiciones de traza del soluto. El término secundario D_{21} representa el flujo acoplado del soluto 2, producido por el gradiente del soluto 1. Este término puede ser importante si los solutos 1 y 2 se asocian, o si ambos son electrólitos. El correspondiente D_{12} desaparece, por definición, de la ecuación (4.1.14) porque es imposible que el gradiente del soluto 2 produzca un flujo significativo del soluto 1, presente apenas como traza. Asimismo, se pueden obtener los coeficientes de difusión de trazas de soluto 2, en disoluciones acuosas que contienen un exceso de soluto 1.

A partir de estos datos, es posible relacionar los coeficientes de difusión de los solutos con los coeficientes de difusión de las especies difundentes en la disolución. Las expresiones para el cálculo de las constantes de asociación y de los coeficientes de difusión de las especies asociadas, que se describen a continuación, se han adaptado [18-20] para el caso de dos solutos genéricos.

Supóngase un sistema acuoso donde coexisten dos solutos A (1) y MX (2), siendo éste último un electrólito fuerte. Supóngase que A es un no-electrólito o un electrólito débil, cuya constante de disociación es suficientemente baja como para que pueda despreciarse. Supóngase que el soluto A interacciona con uno de los iones del otro soluto (se ha elegido el catión M^+).

Si se asume que las interacciones entre ellos ocurren en la proporción de 1:1, el equilibrio que se establece vendría descrito por



En esa situación se tendrían 4 especies en disolución: A ; AM^+ ; M^+ y X^- . Las ecuaciones de balance de masas vendrían dadas por

$$c_1 = [A] + [AM^+] \quad (4.2.24)$$

$$c_2 = [M^+] + [AM^+] \quad (4.2.25)$$

y las fracciones asociadas de A (X_1) y de M^+ (X_2) se pueden escribir como

$$X_1 = \frac{[AM^+]}{[A] + [AM^+]} \quad (4.2.26)$$

y

$$X_2 = \frac{[AM^+]}{[M^+] + [AM^+]} \quad (4.2.27)$$

La difusividad de la especie asociada AM^+ y la respectiva constante de asociación pueden ser estimadas mediante el uso de las ecuaciones (4.2.28) y (4.2.29) y de los datos experimentales obtenidos a través de medidas de los coeficientes de difusión ternaria de trazas de A , D_{11}^0 ($c_1/c_2=0$), disuelto en disoluciones acuosas de MX , y de medidas de los coeficientes de difusión ternaria de trazas de MX , D_{22}^0 ($c_1/c_2=0$), disuelto en disoluciones acuosas de A .

$$D_{11}^0 \left(\frac{c_1}{c_2} = 0 \right) = X_1 D_{AM^+}^0 + (1 - X_1) D_A^0 \quad (4.2.28)$$

$$D_{22}^0 \left(\frac{c_1}{c_2} = 0 \right) = 2D_{X^-} \frac{X_2 D_{AM^+}^0 + (1 - X_2) D_{M^+}^0}{D_{X^-} + X_2 D_{AM^+}^0 + (1 - X_2) D_{M^+}^0} \quad (4.2.29)$$

donde D_A^0 y $D_{AM^+}^0$ representan los coeficientes de difusión, a concentración infinitesimal, de las moléculas de A y del complejo AM^+ , respectivamente. El valor de D_A^0 se toma como igual al del coeficiente de difusión (binario) infinitesimal de A en disolución acuosa.

Entonces, en condiciones de difusión de trazas de cada componente, $X_1 = X_2$, la constante de asociación puede definirse según

$$K = \frac{X_1}{c_1(1 - X_1)} = \frac{X_2}{c_2(1 - X_2)} \quad (4.2.30)$$

Reorganizando las ecuaciones (4.2.26) a (4.2.30) se puede obtener la constante de asociación del complejo, así como el coeficiente de difusión de la especie asociada. La influencia de la viscosidad de la disolución en el coeficiente de difusión se tiene en cuenta en el cálculo, es decir, los coeficientes de difusión de las especies se corrigen por la viscosidad de la respectiva disolución a través de la expresión

$$D_i \approx \left(\frac{\eta}{\eta_0} \right) D_i^0 \quad (4.3.31)$$

donde D_i es el coeficiente de difusión de la especie i , D_i^0 es el coeficiente de difusión a concentración infinitesimal de la especie i , η es la viscosidad de la disolución y η_0 es la viscosidad del agua. Para llegar a obtener los valores finales de la constante de estabilidad de los solutos, se han introducido varias aproximaciones. La contribución de la constante dieléctrica y cambios en la hidratación de los solutos [1] son parámetros no tenidos en cuenta

en este cálculo. El modelo supone que, en el rango de concentraciones estudiado, el coeficiente de actividad de las especies en la disolución es igual a la unidad y que las movilidades de las especies libres y asociadas no cambian con la concentración.

4.3. Método de Dispersión de Taylor

4.3.1. Conceptos generales

La técnica de dispersión de Taylor, empleada para la medida de los coeficientes de difusión, está basada en el trabajo publicado por Taylor entre 1953 y 1954 [21-23]. Esta técnica fue desarrollada sobre la base de una primera observación de Griffiths [24] quien identificó que, cuando una pequeña cantidad de disolución se inyecta en un tubo capilar, en el que esté fluyendo agua u otra disolución, con los mismos componentes que la primera, pero a distinta concentración, el pulso de disolución inyectada se mueve a lo largo del tubo, como si fuera una columna simétrica en crecimiento lento.

Taylor proporcionó un tratamiento matemático para esta situación, señalando que la dispersión a lo largo del tubo resulta de la acción combinada entre la difusión molecular radial, producida por el gradiente de concentración, y el gradiente de velocidad.

En 1956 Aris [25] presentó una solución más general para la cuestión de la dispersión, demostrando que bajo ciertas condiciones, la distribución de concentración dentro de la columna de soluto, a medida que atraviesa el tubo, se puede utilizar para determinar el coeficiente de difusión binario de un sistema de dos componentes.

Basándose en estos modelos matemáticos y aprovechando el creciente desarrollo de la tecnología, científicos tales como Ouano (1972) [26], Alizadeh *et al.* (1980) [27] o Akgerman [28] buscaron diseñar y construir equipos que operaran de acuerdo con la descripción matemática más simple para la dispersión de un pulso de soluto en un líquido en flujo laminar. Más tarde Price (1988) [8] y Leaist (1990) [29] extendieron la teoría a sistemas multicomponente. De esta forma el método de dispersión de Taylor se ha convertido en una de las técnicas más económicas y convenientes para la determinación cuantitativa de los coeficientes de difusión en los líquidos debido a su gran precisión, a la simplicidad de los equipos utilizados, a su versatilidad y a la rapidez de ejecución de la medida.

En la técnica de dispersión de Taylor [5, 6], un pequeño pulso de soluto (disolución de inyección) se introduce en un tubo largo y uniforme de longitud L y radio R , donde fluye

lentamente y de modo laminar la disolución de disolvente (disolución de flujo). Posteriormente a la inyección, el soluto se dispersa bajo la acción de una combinación de dos procesos: la difusión molecular, producida por el gradiente de concentración y el perfil parabólico de velocidades del eluyente. El flujo laminar distorsiona el pulso inicial de soluto y lo dispersa: si la difusión molecular es lo suficientemente rápida, las moléculas del soluto estarán moviéndose desde la parte interior del tubo hacia la región cercana a las paredes y viceversa, en un movimiento radial que disminuye el efecto de la dispersión axial [26]. Este perfil de la dispersión del soluto a lo largo del tubo en un experimento de Taylor, se representa en la Figura 4.1.

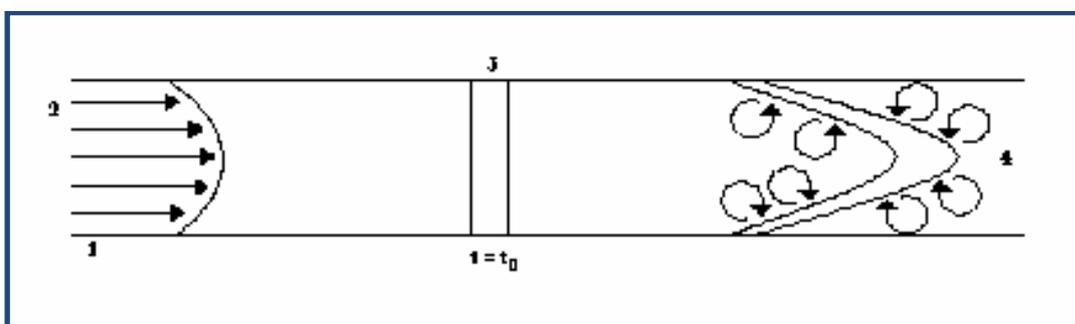


Figura 4.1. Técnica de Taylor: perfil de dispersión de un soluto en el tubo de dispersión [21].

(1: tubo capilar; 2: perfil de velocidad en flujo laminar; 3: inyección de soluto; 4: difusión radial)

La distribución de la dispersión de los solutos a la salida del tubo de dispersión, se puede seguir haciendo pasar el eluyente a través de un detector, por ejemplo, usando un refractómetro diferencial, que facilita información acerca del perfil de la concentración radial media, en función del tiempo.

4.3.2. Teoría del método

En coordenadas cilíndricas, la ecuación de continuidad en un punto fijo (r, x) , aplicada al sistema en estudio, para especies definidas en términos de su concentración molar, c , se escribe como [5, 30-31]

$$D = \left[\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} + \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \right] = u(r) \frac{\partial c}{\partial x} + \frac{\partial c}{\partial t} \quad (4.3.1)$$

en donde $u(r)$ es la velocidad de flujo relativa a las coordenadas del laboratorio.

El coeficiente de difusión mutua se asume que es una constante, aproximación que resulta válida si el gradiente de concentración es pequeño. Se admite, además, que no tiene lugar ninguna reacción química, que la densidad del líquido es constante y que se trata de un flujo laminar con un perfil de velocidad parabólico característico de los líquidos Newtonianos. Así pues, la velocidad de flujo viene dada por

$$u(r) = 2\bar{u} \left[1 - \left(\frac{r}{R} \right)^2 \right] \quad (4.3.2)$$

donde \bar{u} es la velocidad promedio del flujo y R es el radio del tubo de dispersión. Sin embargo, resulta más conveniente medir la distribución de la concentración en relación a una coordenada axial, x_1 , que se mueve a la velocidad promedio del flujo \bar{u} .

Por lo tanto, la velocidad, $v(r)$, en este marco de referencia, es igual a

$$v(r) = u(r) - \bar{u} \left\{ 1 - 2 \left[1 - \left(\frac{r}{R} \right)^2 \right] \right\} \quad (4.3.3)$$

Taylor [21-23] demostró que, eligiendo condiciones experimentales adecuadas, los efectos de la difusión axial sobre el pulso inyectado pueden no ser tenidos en cuenta. Estas condiciones vienen dadas por

$$\frac{L}{\bar{u}} \gg \frac{2R^2}{(3.8)^2 D} \quad (4.3.4)$$

en donde L es la longitud del tubo de dispersión. Así, despreciando el término de la dispersión axial y considerando la convección a través de un plano que se mueve con la velocidad promedio del flujo, \bar{u} , la ecuación (4.3.1) se reduce a

$$\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} = \frac{R^2}{D} \frac{\partial c}{\partial t} + \frac{R^2 \bar{u}}{D} \left[1 - 2 \left(\frac{r}{R} \right)^2 \right] \frac{\partial c}{\partial x_1} \quad (4.3.5)$$

en la cual $x_1 = x - \bar{u}t$. La concentración media radial, \bar{c} , definida como

$$\bar{c} = \frac{2}{R^2} \int_0^R c_r d_r \quad (4.3.6)$$

puede medirse fácilmente.

La condición (4.3.4) significa que las variaciones radiales en \bar{c} son pequeñas en comparación con las correspondientes en la dirección longitudinal en el punto de detección y, por tanto, la solución de la ecuación (4.3.5) en términos de concentración media, obedece a la siguiente ecuación diferencial

$$\frac{\partial \bar{c}}{\partial t} = K \frac{\partial^2 \bar{c}}{\partial x_1^2} \quad (4.3.7)$$

en la que K es el coeficiente de dispersión de Taylor efectivo. Aris [25] utilizó el método de los momentos para demostrar que la definición de K , en el trabajo original de Taylor, se encontraba incompleta. Hunt [32] verificó que la definición de Aris para K era correcta, viniendo su valor dado por

$$K = D + \frac{R^2 \bar{u}^2}{48D} \quad (4.3.8)$$

Las aproximaciones de Taylor conducen a la eliminación del primer término de la derecha de la ecuación. En la práctica, la aproximación es razonable, dado que el primer término es normalmente varios órdenes de magnitud menor que el segundo término. Consiguientemente

$$K \cong \frac{R^2 \bar{u}^2}{48D} \quad (4.3.9)$$

4.3.3 Análisis de resultados y estimación de los parámetros

4.3.3.1 Sistemas binarios

La ecuación (4.3.7) puede ser resuelta analíticamente en el caso de una inyección de soluto, con peso molecular M , de concentración conocida en el momento cero [5, 30-31]. La concentración media radial, \bar{c} , en el final del tubo de difusión, a la distancia L del punto de inyección, viene dada por

$$\bar{c} = \frac{M}{\pi R^2 (4\pi Kt)^{1/2}} \exp \left[-\frac{(L - \bar{u}t)^2}{4Kt} \right] \quad (4.3.10)$$

o, enunciado de una manera alternativa, por

$$\bar{c} = \frac{M}{\rho\pi R^2 (2\pi)^{1/2} \bar{u} (2Kt/\bar{u}^2)^{1/2}} \exp\left[-\frac{(t-\bar{t})^2}{2(2Kt/\bar{u}^2)}\right] \quad (4.3.11)$$

en donde \bar{t} representa el tiempo de retención del soluto y ρ su densidad molar. Es evidente que la ecuación (4.3.11) es el producto de un término constante multiplicado por la curva del error estándar con la varianza

$$\sigma^2 = \frac{2K\bar{t}}{\bar{u}^2} \quad (4.3.12)$$

Para el cálculo del coeficiente de difusión suele emplearse el método de los mínimos cuadrados, método que ha sido el utilizado en este trabajo de Tesis Doctoral.

Como antes se indicó, la disolución, a la salida del tubo de dispersión, se hace pasar a través de un detector del índice de refracción, a fin de determinar la dispersión del soluto a lo largo del tubo. En el detector se obtiene una respuesta lineal a los cambios en esta propiedad, dependiente de la concentración. La señal externa del detector, $V(t)$, depende del tiempo de elución, según

$$V(t) = V_0 + V_1 t + k\Delta R \Delta C(t) \quad (4.3.13)$$

donde $V_0 + V_1 t$ es la señal de la línea base del detector (el término $V_1 t$ se incluye en las fluctuaciones de la línea base), $k = dV/dn$ representa su sensibilidad, $\Delta R = \partial n / \partial c$ representa la variación del índice de refracción en función de la concentración \bar{c} y $\Delta C(t) = c(t) - \bar{c}$.

Combinando la ecuación (4.3.11) con la ecuación (4.3.13), se obtiene

$$V(t) = V_0 + V_1 t + V_{m\acute{a}x} \left(\frac{t_r}{t}\right)^{1/2} \exp\left[-\frac{12D(t-\bar{t})^2}{r^2 t}\right] \quad (4.3.14)$$

donde $V_{m\acute{a}x}$ es la altura relativa del pico respecto a la línea base

$$V_{m\acute{a}x} = kR \frac{\Delta c \Delta V}{\pi r^3 U} \sqrt{\frac{12D}{\pi t}} \quad (4.3.15)$$

Si $|t - \bar{t}| \leq t$, entonces se tiene

$$\frac{(t - \bar{t})^2}{t} \cong \frac{(t - \bar{t}^2)}{\bar{t}} \quad (4.3.16)$$

en el pico del soluto y la ecuación (4.3.14) es similar a una distribución gaussiana, centrada en \bar{t} tal como se muestra en la figura 4.2, con una varianza de $r^2 t_r / 24D = \sigma^2$.

El coeficiente de difusión binario se puede calcular utilizando el método de los mínimos cuadrados para ajustar la ecuación (4.3.14) a las medidas del detector $V(t)$ y utilizando V_0 , V_1 , $V_{máx}$ y \bar{t} como parámetros ajustables.

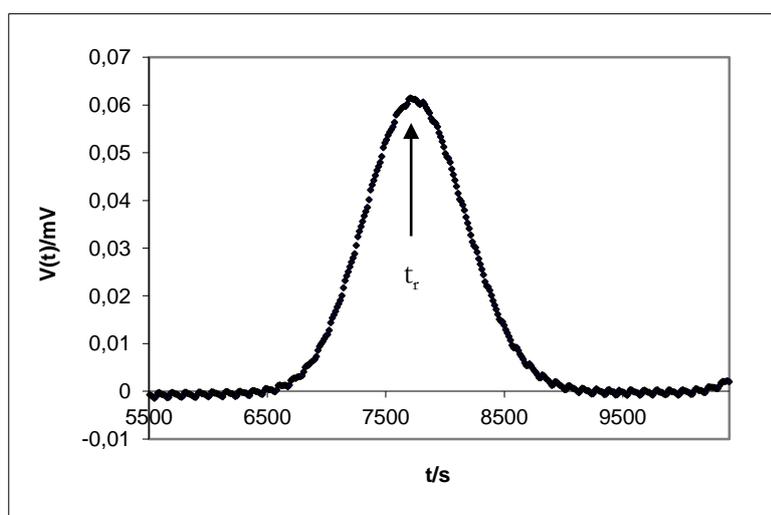


Figura 4.2: Perfil de dispersión del tipo binario

En resumen, el método de los mínimos cuadrados supone que la distribución de las concentraciones expresadas por la ecuación (4.3.11) proviene, únicamente, de una distribución gaussiana. Consecuentemente, se puede aplicar un proceso de ajuste no lineal a la curva y obtener los valores de \bar{t} y σ^2 . Suponiendo que $D\bar{t}/R^2 > 10$, de la combinación de las ecuaciones (4.3.8) y (4.3.12) se obtiene que

$$D = \frac{R^2 \bar{t}}{24\sigma^2} \quad (4.3.17)$$

Utilizando los valores de \bar{t} y σ^2 en la ecuación (4.3.17) se obtiene el valor del coeficiente de difusión.

4.3.3.2 Sistemas ternarios

En el caso de disoluciones de tres componentes [8-9, 29], es decir soluto 1 + soluto 2 + agua, el análisis de los resultados es más complejo debido a la existencia de difusión acoplada, es decir, debido al transporte del soluto 1 por efecto del gradiente de concentración del soluto 2 y viceversa. Los coeficientes de difusión ternaria D_{ik} se utilizan para medir el flujo del soluto i producido por el gradiente de concentración del soluto k . Como resultado de estas interacciones entre los flujos de los solutos, la difusión ternaria no se limita a la simple superposición de los procesos binarios de difusión.

Considerando que \bar{c}_1 y \bar{c}_2 representan, respectivamente, las concentraciones de los solutos 1 y 2 en la disolución de flujo y que $\bar{c}_1 + \Delta\bar{c}_1$ y $\bar{c}_2 + \Delta\bar{c}_2$ representan las concentraciones de las disoluciones de inyección, con un volumen de inyección ΔV , la distribución de la dispersión de la concentración del soluto, a una distancia L del punto de inyección, se obtiene por un ajuste lineal, de acuerdo a la ecuación

$$\Delta c_i(t) = c_i(t) - \bar{c}_i = \sum_{k=1}^2 \frac{2A_{ik}}{\pi r^3 U} \left(\frac{3D_i}{\pi r} \right)^{1/2} \exp \left[-\frac{12D_i U (t - t_R)^2}{r^2 L} \right] \quad (4.3.18)$$

donde D_1 y D_2 representan los valores de los coeficientes de difusión binarios para cada uno de los componentes, en la matriz \mathbf{D} de los coeficientes de difusión D_{ik}

$$D_1 = \{D_{11} + D_{22} + (D_{11} - D_{22}) [1 + (4D_{12}D_{21}/(D_{11} - D_{22})^2)]^{1/2}\} / 2 \quad (4.3.19)$$

$$D_2 = \{D_{11} + D_{22} - (D_{11} - D_{22}) [1 + (4D_{12}D_{21}/(D_{11} - D_{22})^2)]^{1/2}\} / 2 \quad (4.3.20)$$

A la salida del detector del índice de refracción, se tiene una función lineal que depende de las diferencias de concentración entre ambos solutos

$$\Delta V(t) = k [R_1 \Delta c_1(t) + R_2 \Delta c_2(t)] \quad (4.3.21)$$

donde R_1 y R_2 representan la derivada de la propiedad detectada (índice de refracción) respecto de la concentración, esto es $R_1 = \partial n / \partial c_1$ y $R_2 = \partial n / \partial c_2$.

Proporcionados los valores de los coeficientes de difusión ternarios, las ecuaciones anteriores pueden utilizarse para predecir la forma del pico producido por la dispersión del soluto. En general, la señal del detector $\Delta V(t)$ para la difusión ternaria es la suma de dos distribuciones estándares con una varianza de $r^2 L / 24 D_1 U$ y $r^2 L / 24 D_2 U$.

En este caso concreto, la señal en la salida del detector se convierte en una distribución estándar. Por tanto, la señal a la salida del detector del índice de refracción vendrá dada por

$$V(t) = V_0 + V_1 t + V_{\max} \left(\frac{t_R}{t} \right)^{1/2} \left[W_1 \exp \left(-\frac{12D_1(t-t_R)^2}{r^2 t} \right) + (1-W_1) \exp \left(-\frac{12D_2(t-t_R)^2}{r^2 t} \right) \right] \quad (4.3.22)$$

Son necesarios, al menos, dos experimentos con diferentes valores, para determinar los coeficientes de difusión ternarios para cada conjunto \bar{c}_1 , \bar{c}_2 y cuanto mayor sea el número de experimentos, mayor será la precisión del resultado. Asimismo, también las razones R_1/R_2 y $\Delta\bar{c}_1/\Delta\bar{c}_2$ deben ser conocidas. Sin embargo, siempre que se empleen los momentos normalizados, los valores de la sensibilidad del detector k y del volumen de inyección ΔV no son obligatorios. De manera similar a los sistemas binarios, la velocidad de flujo debe elegirse de manera que se cumplan las ecuaciones (4.3.4) y (4.3.9), reemplazando D por D_i .

4.3.3.3. Sistemas cuaternarios

Extensiones de la técnica de Taylor se han utilizado para medir coeficientes de difusión cuaternaria $^{ijk}(D_{ij})$ para disoluciones multicomponentes [10-12]. Estos coeficientes $^{ijk}(D_{ij})$, definidos por las ecuaciones (4.1.15) a (4.1.18), se evalúan a través del ajuste de la ecuación de dispersión cuaternaria (ecuación 4.3.23)

$$V(t) = V_0 + V_1 t + K \sum_{i=1}^3 R_i [c_i(t) - \bar{c}_i] \quad (4.3.23)$$

donde V es la señal del detector, $K = dV/dn$ es la sensibilidad del detector, n es el índice de refracción, $R_i = dn/d\bar{c}_i$ mide el cambio en la propiedad detectada por unidad de cambio de la concentración del soluto, y $c_i(t) - \bar{c}_i$ representa la dispersión de la concentración media del soluto, dada por

$$c_i(t) - \bar{c}_i = \frac{2\Delta V}{\pi r^3 u} \left(\frac{3}{\pi t} \right)^{1/2} \sum_{k=1}^3 \sum_{p=1}^3 A_{ik} B_{kp} \Delta C_p D_k^{1/2} \times \exp \left[-12D_k(t-t_R)^2 / r^2 t \right] \quad (4.3.24)$$

donde los D_k son los valores propios de la matriz \mathbf{D} de los coeficientes de difusión cuaternarios, las columnas de la matriz \mathbf{A} son los vectores propios independientes de \mathbf{D} y la matriz \mathbf{B} es la inversa de \mathbf{A} .

En un experimento para la medida de coeficientes cuaternarios de difusión, pequeños volúmenes ΔV de disolución de composición $(\bar{c}_1 + \Delta\bar{c}_1)$, $(\bar{c}_2 + \Delta\bar{c}_2)$ y $(\bar{c}_3 + \Delta\bar{c}_3)$, son inyectados en disoluciones de transporte de composiciones \bar{c}_1 , \bar{c}_2 y \bar{c}_3 en el tiempo $t = 0$. Como anteriormente se comentó al tratar los sistemas ternarios, se necesitan, como mínimo, tres experimentos con diferentes valores, para determinar los coeficientes de difusión cuaternarios para cada conjunto \bar{c}_1 , \bar{c}_2 , \bar{c}_3 .

Referencias bibliográficas

- [1] Tyrrel H. J. V., Harris K. R., “*Diffusion in Liquids*”, Butterworths, London (1984).
- [2] Tibor E. G., “*Transport Phenomena in Aqueous Solutions*”, Adam Hilger, London (1974).
- [3] Tyrrel H. J. V., ”*The origin and present status of Pick's diffusion law*”, J. Chem. Ed., 41 (1964) 397-400.
- [4] Hartley G. S., Crank J., “*Some fundamental definitions and concepts in diffusion processes*”, Trans. Faraday Soc., 45 (1949) 801-818.
- [5] Cussler E. L., “*Diffusion Mass Transfer In Fluid Systems*”, University of Minesota (1984).
- [6] Miller D. G., Albright J. G., “*Measurements of the transport properties of fluids: experimental thermodynamics*”, in Wakeham W. A., Nagashima A., Sengers J. V. (eds), Blackwell, Oxford (1991).
- [7] Vitagliano V., Sartorio R., “*Some aspects of diffusion in ternary systems*”, J. Phys. Chem., 74 (1970) 2949-2956.
- [8] Price W. E., “*Theory of the Taylor dispersion technique for three-component-system diffusion measurements*”, J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1, 84 (1988) 2431-2439.
- [9] Callendar R., Leaist D. G., “*Diffusion Coefficients for Binary, Ternary and Polydisperse Solutions from Peak Width Analysis of Taylor Dispersion Profiles*”, J. Sol. Chem., 35 (3) (2006) 353-379
- [10] Ribeiro A. C. F., Santos C. I. A. V., Lobo V. M. M., Estes M. A., “*Quaternary diffusion coefficients of β -cyclodextrin + KCl+ Caffeine+ Water at 298.15 K using a Taylor Dispersion Method*”, J. Chem. Eng. Data, 55 (7) (2010) 2610–2612.
- [11] Leaist D. G., Noulty R. A., “*Quaternary Diffusion in Aqueous KCl-KH₂PO₄-H₃PO₄ Mixtures*”, J. Phys. Chem., 91 (1987) 1655-1658.
- [12] Leaist D. G., Hao L., “*Quaternary Diffusion Coefficients of NaCl-MgCl₂-Na₂SO₄-H₂O Synthetic Seawaters by Least-Squares Analysis of Taylor Dispersion Profiles*”, J. Sol. Chem., 22 (3) (1993) 263-277.
- [13] Miller G. E., “*Fundamentals of Biomedical Transport Processes*”, Morgan & Clypool Publishers (2010).

- [14] Miller D. G., Vitagliano V., Sartorio R., “*Some comments on multicomponent diffusion: Negative main term diffusion coefficients, second law constraints, solvent choices and reference frame transformations*”, J. Phys. Chem., 90 (1986) 1509-1519.
- [15] Paduano L., Sartorio R., Vitagliano V., Castronuovo G., “*Calorimetric and diffusional behavior of the system alpha-cyclodextrin l-phenylalanine in aqueous-solution.*”, Thermochem. Acta, 162 (1990) 155-161.
- [16] Paduano L., Sartorio R., Vitagliano V., Costantino L., “*Diffusion-coefficients in systems with inclusion-compounds .2. alpha-cyclodextrin-(dl)norleucine-water at 25-degrees-c*”, Ber. Bunsenges Phys. Chem., 94 (7) (1990) 741-745.
- [17] Paduano L., Sartorio R., Vitagliano V., “*Diffusion Coefficients of the Ternary System alpha-Cyclodextrin-Sodium Benzenesulfonate-Water at 25 °C: The Effect of Chemical Equilibrium and Complex Formation on the Diffusion Coefficients of a Ternary System*”, J. Phys. Chem. B, 102 (1998) 5023-5028.
- [18] Leaist D. G., “*Coupled Tracer Diffusion Coefficients of Solubilizates in Ionic Micelle Solutions from Liquid Chromatography*”, J. Sol. Chem., 20 (2) (1991) 175-186.
- [19] Leaist D. G., “*Ternary diffusion coefficients of 18-crown-6 ether-KCl-water by direct least-squares analysis of Taylor dispersion measurements*”, J. Chem. Soc. Faraday Trans., 87 (1991) 597-601.
- [20] Leaist D. G., “*Simplified theory of diffusion of mixed electrolytes with simultaneous chemical reactions. Application to glycine + HCl + H₂O mixtures*”, J. Soc. Faraday Trans. I, 78 (1982) 3069-3079.
- [21] Taylor G. I., “*Dispersion of Soluble Matter in Solvent Flowing Slowly through a Tube*”, Proc. R. Soc. Lond. A, 219 (1953) 186-203.
- [22] Taylor G. I., “*The Dispersion of Matter in Turbulent Flow through a Pipe*”, Proc. R. Soc. Lond. A, 223 (1954) 446-468.
- [23] Taylor G. I., “*Diffusion and Mass Transport in Tubes*”, Proc. Phys. Soc. B, 67 (1954) 857-869.
- [24] Griffiths A., “*On the Movement of a Coloured Index along a Capillary Tube, and its Application to the Measurement of the Circulation of Water in a Closed Circuit*”, Proc. Phys. Soc. London, 23 (1911) 190-197.

- [25] Aris R., “*On the Dispersion of a Solute in a Fluid Flowing through a Tube*“, Proc. R. Soc. Lond. A, 235 (1956) 67-77.
- [26] Ouano A. C., “*Diffusion on liquid systems - I. Simple and fast method for measuring diffusion constant*”, Ing. Eng. Chem. Fundam., 11 (1972) 268-277.
- [27] Alizadeh A., Nieto de Castro C. A., Wakeham W. A., “*The theory of the Taylor dispersion technique for liquid diffusivity measurements*”, Int. J. Thermophys., 1 (3) (1980) 243-284.
- [28] Erkey C., Akgerman A., “*Taylor Dispersion*” in “*Measurement of Transport Properties of Fluids*”, Wakeham W. A., Nagashima A., Sengers J. V., (eds.) Blackwell Scientific Publications, London (1991).
- [29] Leaist D. G., “*Determination of ternary diffusion coefficients by the Taylor dispersion method*”, J. Phys. Chem., 94 (12) (1990) 5180–5183.
- [30] Loh W., “*A técnica de dispersão de Taylor para estudos de difusão em líquidos e suas aplicações*”, Quimica Nova, 20 (5) (1997) 541-545.
- [31] Fernandez K. D. M., “*Multicomponent Mutual Diffusion in Mixed Surfactant Solutions*”, Ph.D. Thesis, University of Western Ontario, London, Canada (2003).
- [32] Hunt B., “*Diffusion in laminar pipe flow*”, Int. J. Heat and Mass Transfer, 20 (1976) 393-401.

Capítulo 5

Aspectos experimentales

5.1. Productos

5.1.1. Xantinas

La cafeína (calidad *pro analysi*, con una pureza > 98,5 %) y la teofilina (calidad *anhidra*, con una pureza > 99,0 %) utilizadas en el presente trabajo de Tesis Doctoral, fueron suministradas por Sigma-Aldrich. Estos productos se usaron tal y como vienen comercializados, sin someterlos a ningún proceso de purificación. Únicamente se mantuvieron almacenados dentro de un desecador con gel de sílice.

5.1.2. Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas empleadas fueron la β -ciclodextrina (del 98% de pureza, con una fracción en masa de agua del 13,1 %) y su derivado 2- hidroxipropil- β -ciclodextrina (del 100% de pureza y una fracción en masa de agua del 18,2 %). Estas ciclodextrinas tampoco fueron sometidas a ningún procedimiento de purificación previo a su utilización. Tan solo se guardaron en un desecador con gel de sílice.

5.1.3. Electrólitos (Cloruro potásico)

El KCl (calidad *pro analysi*, con una pureza >99,5 %) utilizado en los estudios de los sistemas ternarios y cuaternarios, fue también de la firma Sigma-Aldrich.

Dada la alta calidad del producto, éste no fue sometido a proceso alguno de recristalización antes de ser utilizado. Únicamente fue secado en estufa a la temperatura de 150 °C y posteriormente mantenido en un desecador con gel de sílice.

5.1.4. Agua

Como disolvente se usó agua. En las disoluciones empleadas para las medidas de difusión, ésta fue destilada, presentando un valor de conductividad promedio de $5,5 \times 10^{-7} \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Las disoluciones utilizadas para las medidas de densidad y viscosidad, se prepararon con agua desionizada obtenida mediante un sistema de purificación de agua Milli-Q[®] Gradient A10 de Millipore[®]. Dicho sistema emplea “cartuchos” de resinas de intercambio iónico Quantum[®] Ex. Ultrapure Organex (que, además, elimina materia orgánica) y un filtro de membrana Millipack[®] Express 20, de $0,22 \mu\text{m}$ de tamaño de poro (para la eliminación de la mayoría de bacterias habitualmente presentes en el agua). El agua así obtenida presentó un valor de conductividad de $5,6 \times 10^{-8} \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

En todos los casos, previamente a su utilización, se procedió a hervir el agua para eliminarle la mayor parte de los gases disueltos, cuya insolubilización, con el aumento de la temperatura durante las medidas, podría afectar la precisión y repetividad.

5.2. Aparatos

5.2.1 Densímetro

La densidad de las disoluciones se determinó con el auxilio de un densímetro digital de la firma Antón Paar, modelo DMA 5000 (Figura 5.1), que permite obtener valores de la densidad de líquidos con una sensibilidad de $1 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ y una reproducibilidad de $\pm 5 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$, en el rango de $0\text{-}90 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura y de $0\text{-}10$ bares de presión.

La densidad se calcula a partir de la medida del período de vibración de un tubo sujeto rígidamente (celda en U) que contiene la muestra, de acuerdo con la técnica desarrollada por Stabinger y colaboradores [1]. Este tubo en U, uno de cuyos extremos está abierto, se llena con el líquido problema con la ayuda de una jeringa.

Según estos autores [1], esta técnica se basa en la aplicación de las leyes del movimiento armónico simple, a partir del conocimiento de la frecuencia de resonancia de un oscilador mecánico que contiene la muestra que se pretende estudiar (tubo en U), que es excitado electromagnéticamente para que vibre a su frecuencia natural.



Figura 5.1.- Densímetro Anton Paar, modelo DMA 5000, utilizado para medir la densidad de los líquidos.

Las oscilaciones del tubo se mantienen estacionarias mediante la aplicación de una fuerza electromagnética controlada, proveniente de un sistema patrón que transforma las oscilaciones mecánicas en una señal eléctrica. Como frecuencia patrón de referencia puede emplearse la de un oscilador de cuarzo termocontrolado, o bien la de cualquier fluido situado en una “segunda” celda de medida. Las señales de frecuencia se transforman en tiempo, mediante un circuito comparador de fases que lleva incorporado el equipo. La frecuencia del oscilador mecánico depende de la naturaleza del líquido situado en su interior, el cual puede caracterizarse, directamente, a través del valor de su densidad. Ahora bien, dado que la magnitud utilizada en esta técnica de medida es la frecuencia de vibración, no resulta necesario conocer ni el peso, ni el volumen de la muestra problema que se introduce en el tubo en U. Por otra parte, tampoco afecta al resultado encontrado, la viscosidad o la tensión superficial de la muestra bajo estudio, si bien la temperatura sí influye sobre el resultado encontrado, hecho por el cual ésta debe controlarse con un alto grado de precisión y estabilidad [2].

Una vez introducida la muestra líquida en el tubo en U y alcanzado el equilibrio térmico, se lee el periodo de vibración, T_v . La densidad, ρ , del líquido en estudio se puede así correlacionar con este período de vibración mediante una relación basada en un modelo de oscilador armónico simple, según

$$\rho = AT_v^2 + B \quad (5.2.1)$$

en donde A y B son constantes cuyo valor depende de la masa y volumen de la muestra utilizada, así como del modulo de elasticidad del oscilador.

Cuando se trabaja con disoluciones, es práctica habitual recurrir a la medida de las densidades correspondiente a la disolución problema en cuestión, ρ , y al disolvente puro, ρ_0 , ambas medidas a la misma temperatura. Aplicando la ecuación (5.2.1) a ambos valores de densidad, se encuentra que la diferencia entre la densidad de la disolución y la densidad de su disolvente queda reducida a

$$\rho - \rho_0 = A(T^2 - T_0^2) \quad (5.2.2)$$

siendo A la denominada constante de calibración del equipo, que depende de la temperatura, y T y T_0 los periodos de oscilación mecánica del tubo lleno con la disolución de estudio y con el disolvente, respectivamente. Este valor de A se determina midiendo el periodo de vibración de dos fluidos patrón de densidad perfectamente conocida a la temperatura de trabajo. Generalmente, este tipo de equipos emplea como fluidos patrón agua bidestilada y aire.

Realizando la calibración con dos sustancias patrón, cuyas densidades, ρ_1 y ρ_2 , son perfectamente conocidas, la densidad de una muestra problema, ρ_x , se obtiene a partir de la ecuación (5.2.2) según

$$\rho_x = A(T_x^2 - T_1^2) + \rho_1 \quad (5.2.3)$$

siendo

$$A = \frac{\rho_1 - \rho_2}{T_1^2 - T_2^2} \quad (5.2.4)$$

y T_1 y T_2 los periodos de vibración medidos para las dos sustancias patrón y T_x el período de oscilación del tubo conteniendo la muestra problema.

La calibración del equipo usado para las medidas de este trabajo de Tesis Doctoral se realizó a 293,15 K utilizando aire y agua ultrapura como sustancias patrón (usando como valores de referencia los que internamente vienen instalados en el equipo). La termostatación de cada muestra se realizó mediante el termostato de estado sólido (sistema Peltier) que viene integrado en el equipo y que mantiene constante la temperatura de las muestras en el interior del tubo-U de medida, con una oscilación de $\pm 0,005$ °C, lo que garantiza una incertidumbre de $\pm 0,01$ grados.

Adicionalmente, el densímetro se calibró diariamente, antes del inicio de cada sesión de medidas, usando, consecutivamente, agua Milli-Q® y aire, siguiendo las instrucciones de uso del equipo.

5.2.2. Viscosímetro

En el presente trabajo, las medidas de viscosidad se realizaron con un viscosímetro del tipo Ostwald, modelo Cannon-Fenkse A-1, serie 25, de Comecta S.A., que permite obtener valores de viscosidad de líquidos con una incertidumbre de $\pm 0,2\%$.

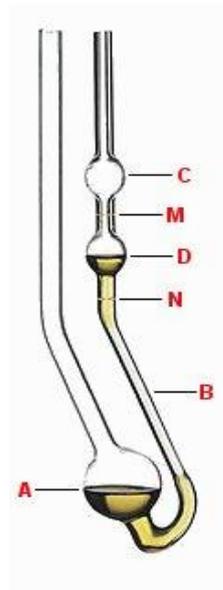


Figura 5.2.- Viscosímetro Cannon-Fenkse, usado para la medida de la viscosidad de los líquidos.

A – depósito conteniendo la muestra líquida problema (7 mL)

M y N – marcas de enrase

B – capilar de diámetro variable

C y D – depósitos auxiliares

Con este viscosímetro (Figura 5.2) se mide el tiempo de flujo requerido para que un volumen de muestra líquida de 7 mL, contenida en un depósito superior (A) situado entre dos enrases (M y N), se descargue a través de un capilar (B) conectado a dicho depósito, bajo la fuerza de su propio peso.

La ecuación de Hagen-Poiseuille [3-5] relaciona la viscosidad absoluta del líquido, η , con el tiempo de flujo, t , para un volumen, V , del líquido que fluye por un capilar de radio r y longitud L , según

$$\eta = \frac{\pi \Delta p r^4 t}{8LV} \quad (5.2.5)$$

donde Δp es la diferencia de presión a lo largo del capilar. Si el flujo del líquido se produce bajo la acción de la gravedad, dicha diferencia de presión valdrá $\Delta p = \rho g h$, siendo ρ la densidad del líquido, h la altura hidrostática media del capilar y g la aceleración de la gravedad. Sustituyendo este valor en la ecuación (5.2.5), ésta toma la forma

$$\eta = \frac{\pi \rho g h r^4 t}{8LV} \quad (5.2.6)$$

válida para fluidos newtonianos, incompresibles, en régimen de flujo laminar.

Puesto que diferentes viscosímetros capilares conducen a distintos valores de tiempos de flujo, t , para una misma muestra (ya que es muy difícil que ambos viscosímetros tengan exactamente las mismas dimensiones), la determinación de la viscosidad de un líquido requiere del conocimiento de las dimensiones del viscosímetro utilizado. Para evitar la necesidad de disponer de los valores geométricos de dicho viscosímetro, como paso previo imprescindible en el cálculo de la viscosidad del líquido bajo estudio, se recurrió a realizar medidas relativas de esta magnitud, lo que hace innecesario este conocimiento del tamaño del tubo capilar y del volumen del depósito.

El procedimiento implica medir el tiempo que tarda en fluir una determinada sustancia de referencia (t_0), normalmente agua, así como determinar el tiempo de flujo, t , del líquido cuya viscosidad se pretende obtener. Puesto que V , L y r son los mismos en ambas medidas, para un determinado viscosímetro, si la temperatura no varía, η es proporcional a la densidad, ρ , de la correspondiente muestra y a los valores de t .

Así pues, aplicando la ecuación (5.2.6) a ambos líquidos, el de referencia y aquel cuya viscosidad se quiere determinar, se obtiene que

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{\rho t}{\rho_0 t_0} \quad (5.2.7)$$

ecuación que permite determinar la viscosidad η del líquido problema a partir, solamente, del conocimiento de su densidad y de los valores correspondientes al líquido patrón empleado para su calibración. En este trabajo de Tesis Doctoral, el viscosímetro se calibró, previamente a su utilización, con agua Milli-Q® [6-8].

5.2.3. Equipo para las medidas de difusión

Los coeficientes de difusión se determinaron por el método de dispersión de Taylor, en dos laboratorios independientes, en el Departamento de Química de la Universidad de Coimbra (Portugal) y en el Departamento de Química de la Universidad *Federico II* de Nápoles (Italia). La base de ese método de medida es la dispersión de pequeñas cantidades de un cierto soluto, inyectado en el seno de un disolvente, o en el de una disolución de una cierta composición, que fluye en régimen laminar a través de un tubo muy largo y de muy pequeño diámetro. En estos estudios se utilizaron, como eluyentes, diferentes disoluciones de flujo de concentraciones determinadas.

En la Figura 5.3 se presenta un esquema del montaje experimental del equipo de medida utilizado (Coimbra). Cada disolución de flujo, recogida en un matraz situado al inicio de la cadena, entra en el tubo de difusión a través de un filtro de paso que sirve de protección para evitar la entrada de impurezas al sistema. Su movimiento en el tubo de difusión, en régimen de flujo continuo (no de flujo pulsado) se mantuvo mediante el empleo de una bomba peristáltica (Gilson, modelo Miniplus 3), a una velocidad de flujo constante de $0,17 \text{ mL min}^{-1}$.

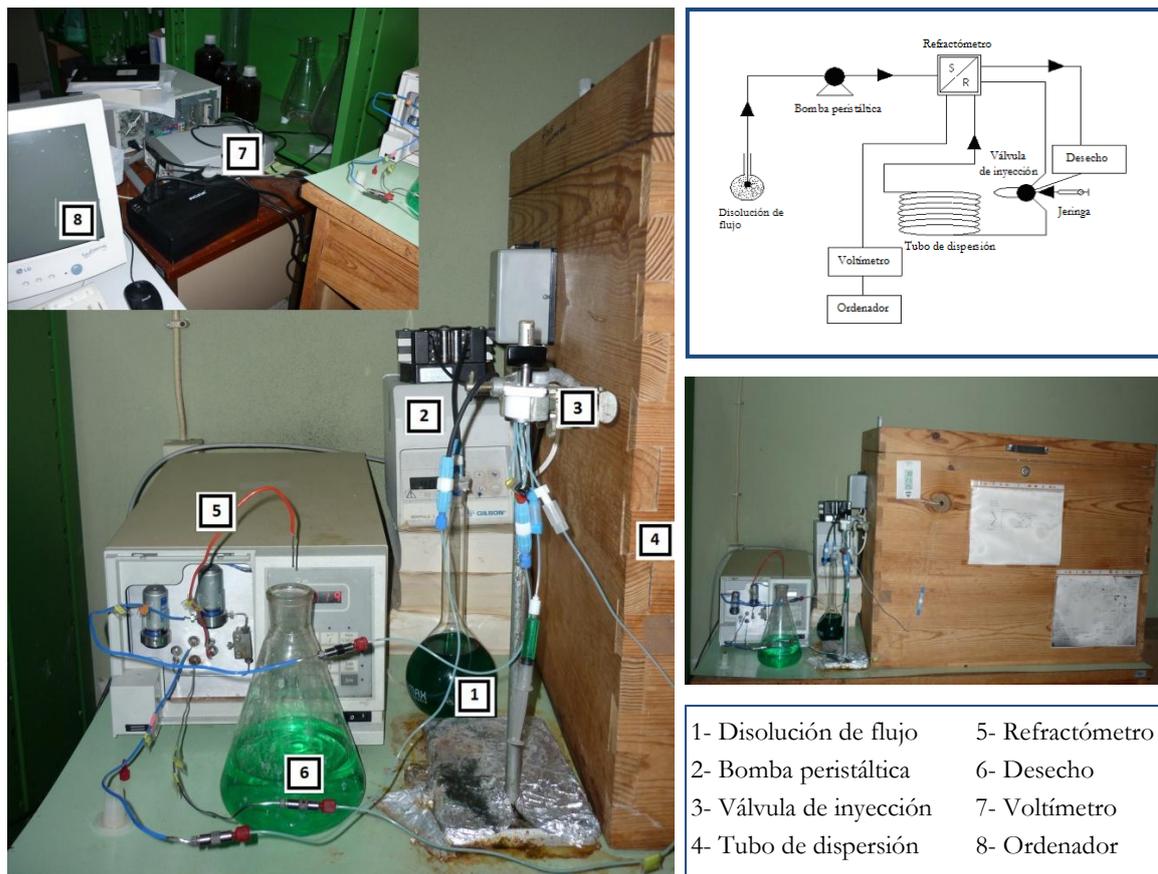


Figura 5.3.- Montaje experimental de la técnica de dispersión de Taylor en Coimbra

El establecimiento de una velocidad constante de $0,17 \text{ mL min}^{-1}$ para la realización de todas las medidas se basó en los resultados obtenidos a partir de ensayos previos desarrollados para optimizar las condiciones técnicas y de funcionamiento del equipo [10]. Es decir, se han medido coeficientes de difusión de diferentes mezclas binarias (cuyos valores son bien conocidos) en un rango $0,3 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ a $1,8 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ y obtenidos resultados con una incertidumbre del orden de $\pm 1 - 2\%$. Todas las mediciones se llevaron a cabo a la temperatura de $298,15 \text{ K}$ y presión atmosférica estándar. Los resultados se contrastaron con los correspondientes de la literatura y se eligió como velocidad de trabajo, aquella cuyas

desviaciones fueran las menores posibles para todos los coeficientes de difusión medidos en el rango estudiado.

Las disoluciones de muestra se inyectaran por medio de una jeringa acoplada a una válvula de inyección, localizada en un punto determinado del tubo de difusión, antes de su entrada al interior del termostato, en donde se mantiene enrollado circularmente y de manera homogénea. La extensión del tubo de dispersión utilizado se midió directamente en una sala grande, usando dos teodolitos de alta calidad y espejos apropiados para enfocar con total exactitud los extremos del tubo. Esta técnica dio una longitud del tubo de $3,2799 (\pm 0,0001) \times 10^4$ mm, concordante con medidas de control adicionales menos exactas (cinta métrica de buena calidad). El radio interno del tubo, $0,5570 (\pm 0,0003)$ mm, se calculó a partir del volumen del tubo, obtenido mediante diferencia de pesada rigurosa (resolución 0,1 mg) de éste vacío y lleno con agua destilada de densidad conocida. Las conexiones del tubo de difusión al detector (refractómetro) se realizaron a través de conectores de volumen muerto, en acero inoxidable, de Cole-Parmer Instrument Co.

La dispersión de las muestras inyectadas se siguió por medio de un refractómetro diferencial (Waters, modelo 2410) colocado a la salida del tubo de dispersión. La diferencia entre el valor del índice de refracción de la disolución de flujo y la disolución de inyección, se convirtió en una señal de voltaje eléctrico que fue leída con el voltímetro digital (Agilent 34401 A), provisto de una interface IEEE. Estas lecturas se realizaron a intervalos de 13 segundos. Los datos encontrados se procesaron mediante un ordenador provisto de un programa de adquisición de datos, desarrollado en BASIC (descrito en el anexo Y), que registra valores de la señal del voltímetro, frente al tiempo.

El equipo instalado en el Departamento de Química de la Universidad *Federico II* de Nápoles (Italia) estaba integrado por un tubo capilar de 20 m con un radio interno de $0,4020 (\pm 0,0001)$ mm conectado a una bomba peristáltica (Watson Marlow 403U/VM2) regulada para una velocidad de flujo de $0,17 \text{ mL min}^{-1}$. El radio interior del tubo se determinó mediante la calibración del aparato con una disolución 0,2 M de KCl a 298,15 K, dado que el coeficiente de difusión de este sistema es bien conocido y corresponde a un mínimo en la variación de D frente a la composición. La dispersión de las muestras inyectadas se siguió por medio de un refractómetro diferencial Knauer modelo K2301.

5.2.4. Termostatos

Dado que los valores de las magnitudes medidas experimentalmente en este trabajo de Tesis Doctoral vienen altamente influenciados por el de la temperatura y por las variaciones que ésta experimente durante el desarrollo de una sesión de medidas, así como para distintas medidas realizadas en tiempos diferentes, fue necesario utilizar dispositivos termostáticos para mantener la temperatura constante en el lapso de los diferentes estudios realizados.

Para los estudios de viscosidad, se empleó un termostato de ventanas de vidrio, de 30 litros de capacidad, que lleva acoplado un cabezal termostático Selecta (modelo Tectron Bio) provisto de un sistema automático de calefacción a impulsos (con una capacidad de calentamiento máxima de 960 vatios), controlado mediante un relé conectado a un termómetro de contacto de mercurio. Como líquido termostático se utilizó agua destilada. Para llevar de forma continua el control de la temperatura del baño, se acopló a este sistema un termómetro de mercurio y una sonda termométrica digital, Delta modelo HD-2107.1, con resolución de 0,01 °C en el rango de lecturas comprendido entre (-30 y + 120) °C. De esta manera, las temperaturas en el baño termostático se mantuvieron, en todo momento, con una oscilación máxima de $\pm 0,01$ °C.

En los estudios de difusión realizados en Coimbra, se empleó un termostato de aire, de fabricación propia, para albergar el tubo calibrado de difusión. La temperatura en el interior del termostato se mantiene mediante un sistema de calentamiento formado por 2 lámparas de 100 vatios, una de las cuales se mantiene constantemente encendida mientras que la otra está comandada por un relé. El aire del interior del termostato se hace circular con la ayuda de un ventilador. La temperatura se controló con la ayuda de un termómetro digital (Summit modelo SDT 20), apreciándose oscilaciones máximas de $\pm 0,2$ °C.

En los estudios de difusión realizados en la Universidad de Nápoles, el tubo de difusión se encontraba introducido en un baño de agua, a termostatzado a la temperatura de la medida, mientras que a su vez, todo equipo estaba incorporado dentro de un termostato de aire regulado a 298,15 K ($\pm 0,01$ K).

Todas las medidas de esta Tesis Doctoral se realizaron a las temperaturas constantes de 298,15 y 310,15 K.

5.2.5. Balanzas

Para la pesada de los solutos se usó una balanza analítica monoplato, Mettler H80, con capacidad máxima de 160 g y resolución de 0,0001 g, siguiendo las normas generales de pesada por diferencia, hasta obtener valores de pesada constantes, dentro de la precisión de la balanza. Durante las fases de la pesada se comprobó que la posición del cero en la escala no se alteró.

En la preparación de las disoluciones utilizadas para las medidas de densidad y viscosidad, se empleó el método de pesada directa de todos sus componentes. En ese caso, tanto el soluto como el agua se pesaron con una balanza Mettler AE 240, con una resolución de 0,0001 g, hasta obtener valores de pesada constantes, dentro de la resolución de la balanza, con mantenimiento de la posición del cero de la escala.

Todas las pesadas se corrigieron a vacío de acuerdo a la expresión

$$m = s (1 + k 10^{-3}) \quad (5.8)$$

donde m es el peso corregido a vacío; s , el peso aparente que señala la balanza y k es una constante que está relacionada con la naturaleza del material de las pesas de la balanza (a través de su densidad, ρ_{pesas}) y con las densidades del cuerpo que se pesa (ρ_{cuerpo}) y del aire (ρ_{aire}), en las condiciones ambientales en que dicha pesada se efectúa, según

$$k = 1000 \rho_{aire} (1/\rho_{cuerpo} - 1/\rho_{pesas}) \quad (5.9)$$

Esta constante, k , se encuentra tabulada [9] en función de las densidades tanto de la sustancia cuyo peso se desea corregir, como del material de las pesas de la balanza.

5.2.6. Laboratorio

Con el fin de conseguir un mejor control de la temperatura en los estudios realizados, se recurrió a controlar las condiciones ambientales de los laboratorios en los que se llevaron a cabo estas medidas, manteniendo la temperatura en 25 ± 1 °C, con una humedad relativa del 40-60 %.

5.3. Técnicas operatorias

5.3.1 Preparación de las disoluciones

Para obtener medidas de densidad y de viscosidad con un mínimo de incertidumbre, y así poder derivar a partir de ellas otras magnitudes termodinámicas de interés, se consideró muy necesario conocer el valor de la concentración de estas disoluciones con un alto nivel de fidelidad. Frente a las limitaciones que, en ese sentido, presentan las técnicas volumétricas, la técnica de pesada directa de ambos, disolvente y soluto(s), conduce a un conocimiento más riguroso del pretendido valor de concentración. Por tal motivo, esta fue la técnica empleada para preparar los 100 cm³ de cada una de las disoluciones de trabajo utilizadas para estos estudios.

Dado que las medidas de los coeficientes de difusión, mediante la técnica Taylor, no son muy sensibles al valor de la concentración de la disolución, las disoluciones para estas medidas de difusión se prepararon por volumen, utilizando matraces aforados previamente calibrados con agua destilada. Para ello, se pesó la cantidad adecuada de soluto que, una vez disuelta en una pequeña porción de agua, se arrastró al interior del matraz aforado, enrasando con agua destilada. Para la determinación de estos coeficientes de difusión se prepararon 500 cm³ de disolución de flujo y 25 cm³ de las disoluciones de inyección de las concentraciones adecuadas. Todas las disoluciones se prepararon inmediatamente antes de ser utilizadas para su estudio.

Para el cálculo de la concentración de los solutos en cada una de las disoluciones estudiadas, se tuvo siempre en cuenta cual era el contenido de agua que acompañaba a los solutos.

Antes de iniciar las medidas, las disoluciones se desairearon con la ayuda de un baño de ultrasonidos, por un tiempo de 30 minutos aproximadamente, a fin de eliminar (o, en todo caso, minimizar) durante las medidas de estas magnitudes, la posible aparición de burbujas de aire insolubilizado con las variaciones de temperatura, tanto en el tubo de difusión como en la celda del refractómetro y del densímetro, hecho éste que alteraría los resultados obtenidos de una manera significativa.

5.3.2. Determinación de las densidades

Para la determinación experimental de la densidad, se procedió a tomar una pequeña porción de la disolución a estudiar y, con ayuda de una jeringa, se introdujo aproximadamente 1 mL de ésta en el tubo en U del densímetro. Esta operación se realizó con sumo cuidado, para evitar la presencia de pequeñas burbujas de aire en el interior del tubo de medida, que distorsionarían completamente la medida (el densímetro viene equipado con un sistema de videocámara que permite controlar la ausencia de burbujas de gas en el tubo en U). Con el fin de garantizar la pureza de la muestra en el interior del tubo de medida, se inyectó disolución problema en cuantía suficiente como para que la primera porción de disolución introducida quedase eliminada de la zona de medida.

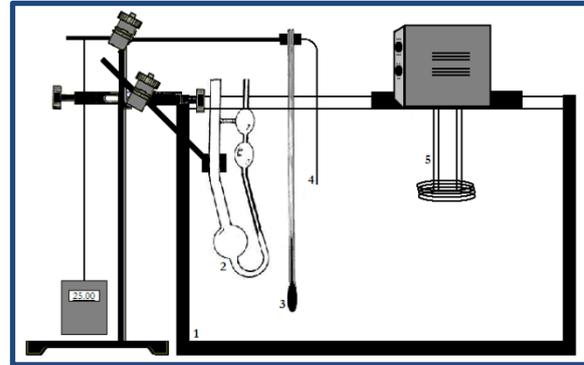
Pasado el tiempo suficiente para que la disolución problema alcanzase la temperatura de experimentación, se procedió a efectuar y registrar una primera medida de la densidad. Posteriormente, después de transcurridos un par de minutos y usando la misma muestra de disolución, se volvió a medir la densidad. Este proceso se repitió varias veces más hasta obtener un mínimo de 4 lecturas de densidad, correspondientes a la misma muestra, que diferían entre sí en $\pm 0,000\ 001$ unidades. El valor promedio de este grupo de 4 lecturas fue el que se tomó como valor de densidad de esta muestra de la disolución bajo estudio.

A continuación se procedió a evacuar la muestra medida, a lavar el tubo de muestreo con abundante agua destilada, extrayendo constantemente ésta con la ayuda de la bomba de succión del densímetro. Seguidamente se lavó con etanol absoluto y se secó, completamente, mediante el paso de aire, por acción de la bomba de succión.

Posteriormente se repitió el proceso de inyección de una nueva muestra, de la misma disolución anterior bajo estudio, repitiendo la serie de manipulaciones y medidas anteriormente indicadas, hasta obtener un segundo valor de densidad de dicha muestra. Este proceso se repitió varias veces más hasta disponer de, al menos, 6 series de medidas sobre otras tantas muestras de esa disolución, cuyos valores de densidad difiriesen en $\pm 0,000\ 005$ unidades. El valor de densidad correspondiente a la disolución estudiada, se determinó como el valor promedio ponderado de esas 6 series de medidas. Los valores así obtenidos fueron reproducibles con una incertidumbre del 0,01 %.

5.3.3. Determinación de la viscosidad

Para la medida experimental de la viscosidad se dispuso el montaje cuyo esquema se ha representado en la Figura 5.4.



1- Baño de agua

3- Termómetro de mercurio

5- Cabezal de calentamiento

2- Viscosímetro Ostwald

4- Sonda termométrica digital

/ enfriamiento

Figura 5.4.- Montaje experimental para la medida de viscosidades

El viscosímetro, lavado y seco, se enjuagó con una pequeña cantidad de disolución a estudiar. Posteriormente, se le introdujeron 7 mL de la disolución bajo estudio, colocándolo en posición vertical en el interior del baño termostático, donde se mantuvo durante 2 horas, tiempo suficiente para alcanzar la temperatura de estudio y lograr el equilibrio térmico.

Transcurrido ese tiempo, la disolución a estudiar se elevó hasta el depósito superior y, posteriormente, se dejó fluir bajo la acción de la gravedad. El tiempo que tardó en fluir el volumen calibrado de la muestra (tiempo de flujo) se midió con una resolución de $\pm 0,01$ segundos, con la ayuda de un cronómetro digital (Kenko modelo KK-1025). Este proceso de medida se repitió varias veces con la misma muestra de disolución, hasta obtener, al menos, 4 valores de tiempos de flujo con diferencias entre sí de $\pm 0,05$ segundos. La media aritmética de esas 4 medidas se tomó como valor del tiempo de flujo para el cálculo de la viscosidad de la disolución bajo estudio.

Concluido el estudio, se eliminó la muestra líquida medida, se lavó el viscosímetro con abundante agua y se enjuagó con agua destilada y finalmente con la siguiente disolución a estudiar.

5.3.4. Determinación de los coeficientes de difusión

Los ensayos experimentales dirigidos a la obtención de los coeficientes de difusión mutua, se iniciaron, una vez estabilizada la temperatura en el interior del termostato de aire, haciendo circular la disolución de flujo a través del tubo de flujo y registrando la línea base correspondiente en el refractómetro.

Una vez estabilizada esta línea base, se inició la ejecución del programa de adquisición automática de datos y se inyectó, con la ayuda de una válvula de inyección de 6 vías (Rheodyne, modelo 5020), un volumen de 0,063 mL de disolución de muestra (disolución de inyección de concentración de soluto(s) $c \pm \Delta c$ ó $c - \Delta c$) en el flujo laminar de la disolución de flujo (disolución eluyente) de concentración de soluto(s) c . La velocidad de flujo se mantuvo constantemente igual a $0,17 \text{ mL min}^{-1}$, con tiempos de retención de $1,1 \times 10^4 \text{ s}$.

Tras esta primera inyección de la muestra, se llevaron a cabo otras inyecciones posteriores, en el interior de la misma disolución eluyente, a fin de obtener un número suficiente de picos de concentración, respecto de la línea base, que facilitaron otros tantos valores de tiempo de elución y, consecuentemente, de coeficientes de difusión, que permitieron estimar un valor promedio para dicho coeficiente de difusión de la disolución de muestra estudiada, con una incertidumbre del 0,1 %. Estas inyecciones sucesivas se realizaron a intervalos de tiempo suficientemente largos (1 hora, aproximadamente) como para evitar que se produjesen superposiciones entre los diferentes picos resultantes.

Finalizado el estudio, se substituyó la disolución eluyente por agua destilada, con la que se lavó adecuadamente el sistema hasta la total eliminación de la disolución estudiada.

5.3.4.1. Determinación de los coeficientes de difusión binarios

En un ensayo para la obtención de coeficientes de difusión mutua en sistemas binarios (soluto y disolvente), tanto la muestra inyectada como la disolución eluyente contenían ambos componentes, aunque a concentraciones diferentes, siendo éstas $c \pm \Delta c$ y c , respectivamente. Los coeficientes de difusión D se obtuvieron a partir del ajuste, a una curva de gauss, de los valores experimentales de los diferentes picos de concentración definidos respecto de la línea base, correspondientes a cada una de las diferentes muestras inyectadas, usando para ello el programa de tratamiento de datos, en lenguaje BASIC, descrito en el anexo I.

5.3.4.2. Determinación de los coeficientes de difusión ternarios

En los estudios para la obtención de los coeficientes de difusión mutua en sistemas ternarios (soluto 1, soluto 2 y disolvente), ambas disoluciones, la de inyección y la de flujo, contenían también los tres componentes. Sin embargo, mientras que en la disolución de flujo las concentraciones de ambos solutos se mantuvieron siempre constantes, en las disoluciones que se inyectaron se hizo variar la concentración de uno de los solutos, bien la del soluto 1 o bien la del soluto 2, manteniendo la del otro soluto en el valor correspondiente a la disolución de flujo. Las muestras se inyectaron alternativamente, siempre formando grupos de número par. Es decir, primero se inyectó una disolución de concentraciones $c_1 \pm \Delta c_1$ y c_2 y, transcurrido el tiempo oportuno, se inyectó una siguiente disolución de concentraciones c_1 y $c_2 \pm \Delta c_2$. Este ciclo de inyecciones se repitió varias veces durante el estudio de cada disolución de flujo.

Mediante este procedimiento, se obtuvieron varios grupos de 2 picos de concentración, respecto de la línea base de la disolución eluyente, que se analizaron usando el programa de tratamiento de datos, en BASIC, descrito en el Anexo I. Este análisis permitió obtener los valores de los coeficientes de difusión principales, D_{ij} y secundarios, D_{ip} a partir del ajuste de los picos a curvas gaussianas.

5.3.4.3. Determinación de los coeficientes de difusión cuaternarios

En los estudios para la obtención de los coeficientes de difusión mutua en sistemas cuaternarios (soluto 1, soluto 2, soluto 3 y disolvente), las disoluciones de inyección difirieron de la correspondiente disolución de flujo tan solo en la concentración de uno de los solutos (bien la concentración del soluto 1, bien la del soluto 2, o bien la del soluto 3), manteniendo las concentraciones de los otros 2 solutos en los valores correspondientes a la disolución de flujo. Las muestras se inyectaron, de manera alternativa, pero siempre en grupos múltiplos de tres. Es decir, se inyectó una primera disolución de concentraciones $c_1 \pm \Delta c_1$, c_2 y c_3 ; a continuación, después de transcurrido el tiempo suficiente, una segunda disolución de concentraciones c_1 , $c_2 \pm \Delta c_2$ y c_3 y, finalmente, tras un nuevo lapso, una tercera disolución de concentraciones c_1 , c_2 y $c_3 \pm \Delta c_3$. Esta secuencia de inyecciones de muestras se repitió varias veces en el estudio de cada disolución de flujo.

Mediante el programa de tratamiento de datos, en BASIC, descrito en el Anexo I, aplicado a los diferentes grupos de 3 picos obtenidos, se determinaron los valores de los

coeficientes de difusión principales, D_{ii} y secundarios, D_{ijk} siguiendo el procedimiento de ajuste anteriormente señalado.

Referencias bibliográficas

- [1] Kratky O., Leopold H., Stabinger H.; in “*Methods in Enzymology, Vol XXVII, Enzyme Structure Part D*”, Hirs C. H. W., Timasheff S. N. (eds.), Academic Press, New York (1973) cap. 5.
- [2] Esparza Barroso M., “*Estudio de propiedades de transporte de bromuro de litio en mezclas agua-etanol a 25 °C*”, Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna (1986).
- [3] Hagen G., “*Movement of water in a narrow cylindrical tube*”, Ann. Phys. Chem., 46 (1839) 423-442.
- [4] Poiseuille J. L. M., «*Recherches expérimentales sur le mouvement des liquides dans les tubes de très petits diamètres, I. Influence de la pression sur la quantité de liquide qui traverse les tubes de très petits diamètres*», C. R. Acad. Sci., 11 (1840) 961–967.
- [5] Poiseuille, J. L. M., «*Recherches expérimentales sur le mouvement des liquides dans les tubes de très petits diamètres; II. Influence de la longueur sur la quantité de liquide qui traverse les tubes de très petits diamètres; III. Influence du diamètre sur la quantité de liquide qui traverse les tubes de très petits diamètres*», C. R. Acad. Sci., 11 (1840) 1041-1048.
- [6] Swindells J. F., Coe J. R., Godfrey T. B., “*Absolute viscosity of water at 20°*”, J. Res. Nat. Bur. Stand., 48(1952) 1-31.
- [7] Coe J. R., Godfrey T. B., “*Viscosity of Water*”, J. Appl. Phys., 15 (1944) 625- 626.
- [8] Weber. W., “*Die temperatur abhängigkeit der Viskosität der Wassers zwischen 0 and 40 C*”, Z. Angew. Phys., 7 (1955) 96 in “*CRC Handbook of Chemistry and Physics*”, 69th Edition, CRC Press (1988-1989).
- [9] *Handbook of Chemistry and Physics*, 88th ed., Lide D. R. (ed.), CRC Press, Boca Raton, USA, (2007-2008) 8-133.
- [10] Santos C. I. A. V., “*Estudo da Difusão de α e β -Ciclodextrina em Solução Aquosa*”, Tesis de Licenciatura, Universidad de Coimbra (2005).

Capítulo 6

Caracterización de propiedades fisicoquímicas de fármacos en disolución acuosa

La eficacia de un fármaco está condicionada, de una manera muy importante, por el valor de su solubilidad en agua, puesto que el agua es el disolvente por excelencia en los organismos de los seres vivos (el cuerpo humano está constituido por un 60-75% de agua, aproximadamente) [1]. Así, la absorción de un cierto fármaco desde el tracto gastrointestinal hasta el sistema circulatorio, por difusión pasiva, depende fundamentalmente de cuál es su solubilidad en agua. Por otra parte, el tránsito de un fármaco a través de una determinada membrana y, en consecuencia, la disponibilidad de ese fármaco en el entorno celular correspondiente, también depende del correcto equilibrio de solubilidad, entre agua y lípidos, que éste presente. En resumen, para que un fármaco resulte eficaz, éste debe ser administrado en una forma farmacéutica que sea soluble en agua [2, 3]. Además de todo lo mencionado anteriormente, y dado que el agua es, por otra parte, el disolvente más comúnmente utilizado para llevar a cabo cualquier proceso de naturaleza física o química de utilidad, es obvio el interés que tiene el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de las disoluciones acuosas de estos compuestos.

No obstante, cuando el fármaco en cuestión resulta ser poco soluble en agua, en su forma farmacéutica, se suele recurrir a suministrar dicho fármaco acompañado de excipientes funcionales (como es el caso de las ciclodextrinas) que posean capacidad para interactuar con las moléculas del fármaco, mediante mecanismos basados en el establecimiento de uniones no covalentes y en la formación de estructuras complejas (que pueden, o no, ser de inclusión), para de ese modo contribuir al pretendido aumento de su solubilidad aparente en agua [p. ej. 4-9].

Sobre la base de lo señalado en los párrafos precedentes, este trabajo de Tesis Doctoral se focalizó hacia el estudio de ciertas propiedades fisicoquímicas de disoluciones acuosas de sustancias estimulantes del sistema nervioso central (algunas metilxantinas), así como de varias ciclodextrinas en disolución acuosa. Los mencionados estudios se llevaron a cabo con las sustancias puras y, también, con mezclas de estos compuestos.

Para cada uno de los sistemas investigados se obtuvo y analizó su densidad, su viscosidad y su coeficiente de difusión, en disoluciones acuosas de diferentes concentraciones y a las temperaturas de 298,15 K y 310,15 K. En la bibliografía especializada se encuentran recogidos algunos valores de estas propiedades para estos sistemas aunque, en su mayoría, únicamente a 298,15 K [10-17].

A partir de los datos experimentales de la densidad de las disoluciones acuosas, se obtuvieron los valores correspondientes a los volúmenes molares aparentes del soluto (o solutos) y, a partir de su análisis, se determinaron los correspondientes a su volumen molar parcial a concentración infinitesimal (situación de dilución infinita). A partir de estas informaciones se buscó caracterizar las interacciones moleculares que tienen lugar en estos sistemas disueltos, al tiempo que estimar características estructurales de las disoluciones bajo estudio.

A través de los valores experimentales de la viscosidad y, más concretamente, del de su parámetro B de viscosidad de Jones-Dole (en el caso de los electrolitos), o de su equivalente (en el caso de los no-electrolitos), se caracterizó la capacidad estructurante (*structure making*) o rompedora (*structure breaking*) de la estructura del agua, que se considera poseen estos solutos.

Finalmente, de los datos encontrados para los coeficientes de difusión mutua, se estimaron los valores del radio y del volumen hidrodinámico de las moléculas de los solutos bajo estudio.

Las metilxantinas estudiadas en este trabajo de Tesis Doctoral, cafeína y teofilina, son importantes solutos bioquímicos que exhiben interesantes propiedades físico-químicas, aunque realmente son poco conocidas. La interacción de estos solutos con el agua y su efecto sobre la estructura de la disolución acuosa, es de particular interés ya que ambas xantinas poseen propiedades farmacodinámicas similares, sobre todo como diuréticos [18]. Sus fórmulas estructurales (Capítulo 1, Fig. 3, página 8) incluyen un anillo de purina, que se encuentra en los nucleótidos del ADN, adenina y guanina. La colocación de los grupos N-metilo determina el perfil farmacológico específico de cada compuesto.

6.1. Sistema cafeína + agua

6.1.1. Medidas de densidad

En la tabla 6.1 se presentan los valores experimentales de la densidad, ρ (en $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), obtenidos para las disoluciones acuosas de cafeína de las distintas concentraciones ensayadas (cuyos valores aparecen relacionados en la primera columna), a las temperaturas de 298,15 K y 310,15 K. Asimismo, se indican los valores de desviación estándar encontrada, σ , estimados considerando todas las medidas realizadas. A ambas temperaturas, los valores encontrados en este trabajo de Tesis Doctoral están en muy buena concordancia con los determinados por otros autores, en análogas condiciones, y que se encuentran recogidos en la bibliografía [14, 15], lo que es un indicativo de que los datos aquí presentados poseen un aceptable nivel de confianza.

Tabla 6.1. Densidades, ρ , y volúmenes molares aparentes, ϕ_V , para disoluciones acuosas de cafeína a 298,15 K y 310,15 K

$10^3 m$ /($\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$)	ρ /($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	$10^6 \sigma$ (^a)	ϕ_V /($\text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$)	ρ /($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	$10^6 \sigma$ (^a)	ϕ_V /($\text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$)
T=298,15 K				T=310,15 K		
0,505724	0,997073	1,5	144,04	0,993355	1,0	149,01
1,01145	0,997099	1,2	144,28	0,993379	5,6	148,70
4,04580	0,997259	2,2	142,17	0,993528	1,0	146,52
8,09159	0,997468	3,8	142,49	0,993728	2,5	146,01
10,3145	0,997593	6,7	141,52	0,993835	7,5	146,05
12,6431	0,997722	2,2	141,08	0,993938	1,5	146,88
25,2862	0,998366	0,5	142,16	0,994574	4,1	145,58
50,5725	0,999665	0,1	142,15	0,995817	1,8	145,36

(^a) σ representa la desviación estándar de todas las medidas realizadas

La representación gráfica de los valores de la densidad frente a la concentración se muestra en la Figura 6.1. Como cabía esperar, en ambas temperaturas estudiadas, los valores de la densidad aumentan monótonamente con la concentración de cafeína en la disolución.

Además, como puede observarse, este incremento de la densidad con la concentración transcurre prácticamente paralelo en ambas temperaturas, lo que lleva a concluir que en el intervalo aquí estudiado, el cambio de esta variable se debe, casi exclusivamente, al efecto térmico introducido, sin que pueda considerarse la existencia de ningún efecto estructural adicional en las disoluciones de cafeína estudiadas; esto es, la presencia creciente del soluto en la disolución no produce ningún efecto adicional en la estructura de aquella, más allá del que provoca la agitación térmica molecular como consecuencia del cambio de la temperatura.

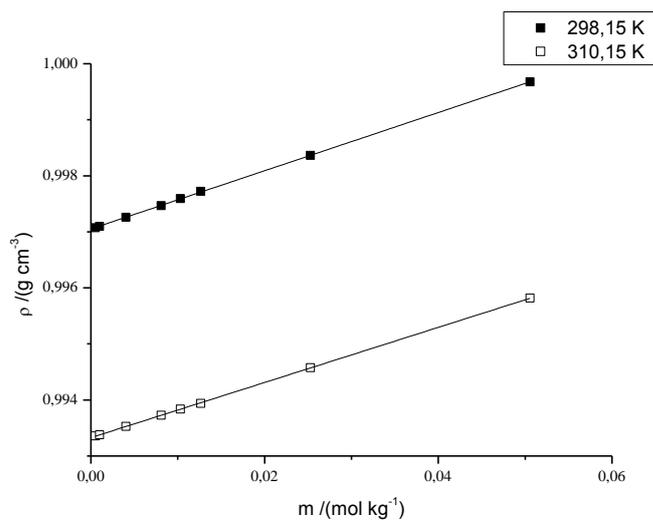


Figura 6.1. Variación de la densidad de disoluciones acuosas de cafeína con la concentración a 298,15 y 310,15 K

Del ajuste de estos datos experimentales, mediante un método de mínimos cuadrados, se han obtenido las ecuaciones lineales siguientes ($r^2 = 0,999$)

$$\rho = 0,997043 (\pm 0,000003) + 0,0519 m \quad (\text{para } 298,15 \text{ K})$$

$$\rho = 0,993332 (\pm 0,000002) + 0,0492 m \quad (\text{para } 310,15 \text{ K})$$

donde m representa la molalidad de la disolución.

6.1.2. Volúmenes molares aparentes

A partir de los valores de densidad medidos para cada una de las disoluciones estudiadas, se calcularon los de sus volúmenes molares aparentes, ϕ_V (en cm³·mol⁻¹).

En la Tabla 6.1 se presentan los valores del volumen molar aparente, ϕ_V , calculados para las disoluciones acuosas de cafeína estudiadas, a 298,15 K y 310,15 K. Estos valores de ϕ_V se

ajustaron, frente a la raíz cuadrada de la concentración molar, a la ecuación de Masson [19] (ecuación 2.1.10, capítulo 2) obtenida sobre la base de las teorías de las disoluciones de electrolitos. En esta ecuación, ϕ_V^0 es el volumen molar aparente a concentración infinitesimal (cuyo valor, en estas condiciones límite, es coincidente con el de su volumen molar parcial, $\overline{V^0}$) y S_V^o es la pendiente correspondiente, cuyo valor depende de la naturaleza del electrolito y de la temperatura de medida.

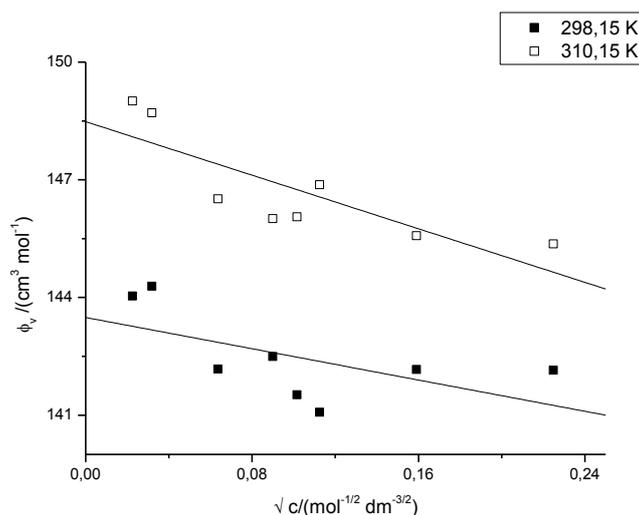


Figura 6.2. Volumen molar aparente de disoluciones acuosas de cafeína a 298,15 K y 310,15 K

En la Figura 6.2 se encuentra representada gráficamente esta variación de ϕ_V con la raíz cuadrada de la concentración molar, c , prevista por la ecuación (2.1.10), variaciones que responden, numéricamente, a las expresiones matemáticas ($r^2 = 0,999$)

$$\phi_V = 143,5(\pm 0,6) - 9,9\sqrt{c} \quad (\text{para } 298,15 \text{ K})$$

$$\phi_V = 148,5(\pm 0,6) - 17,1\sqrt{c} \quad (\text{para } 310,15 \text{ K})$$

Como puede apreciarse, se observa una tendencia hacia la disminución de los valores de ϕ_V con el aumento de la concentración del soluto, lo que parece indicativo de la existencia de interacciones entre las moléculas de cafeína, que podrían dar lugar a la estabilización de estructuras de asociación cafeína-cafeína, tal como afirman diversos autores [14, 20], al tiempo que sugiere la existencia de una fuerte interacción entre las moléculas de cafeína y de agua, que conferirían a este soluto un cierto carácter formador (*structure making*) de la estructura del agua, en las condiciones de trabajo ensayadas. Es decir, según Falk. *et al.* [21] los enlaces por puente de hidrógeno entre los grupos C=O de la cafeína y el agua

disminuirían a medida que va ocurriendo asociación entre moléculas de soluto, liberando moléculas de agua hacia el medio y, consecuentemente, la cafeína actuaría como un promotor de estructura. En realidad y de acuerdo con Franks [22-23], esta menor aportación del soluto, por mol, al volumen total de la disolución, podría deberse al hecho de que las primeras adiciones de soluto al agua y la posterior formación de la correspondiente esfera de hidratación en torno a éste, provocaría la consiguiente aparición de fuertes enlaces de hidrógeno soluto-agua que conllevarían a una contracción del volumen de la disolución. Por otra parte y de manera simultánea, estas entidades soluto-moléculas de agua, podrían introducirse en los “huecos” de la estructura abierta, tipo hielo, del disolvente agua, por el denominado efecto de hidratación hidrofóbica [24-25], ya que la ocupación de estos huecos daría como resultado una disminución de la energía libre total de la disolución. El aumento progresivo de moléculas de soluto en la disolución, conllevaría a una cierta suavización de este efecto, como consecuencia de la disminución de intersticios libres en la estructura del agua [26-27].

A partir del ajuste de los valores de ϕ_V a la ecuación (2.1.10) se extrapolaron los correspondientes a la situación de concentración infinitesimal, ϕ_V^0 , los cuales están en buena concordancia, a ambas temperaturas estudiadas, con los obtenidos anteriormente por otros autores [14, 15]. Estos valores límite informan de las interacciones soluto-agua en la disolución, dado que en esta situación extrema no tienen lugar interacciones soluto-soluto. El aumento de ϕ_V^0 a consecuencia del incremento de la temperatura, viene a abundar en la idea, ya comentada a lo largo de este trabajo de Tesis Doctoral, del carácter promotor de la estructura (*structure making*) del agua que posee la cafeína.

6.1.3. Viscosidades

En la tabla 6.2 se presentan los valores experimentales de la viscosidad (junto con los de su desviación estándar) correspondientes a las disoluciones acuosas de cafeína estudiadas, a las temperaturas de 298,15 y 310,15 K. Como cabía esperar, estos valores de la viscosidad aumentan al hacerlo el de la concentración de cafeína en la disolución, si bien puede apreciarse que dicho incremento es pequeño, en especial a la menor de las temperaturas estudiadas (298,15 K). El aumento de temperatura, por el contrario, produce el esperado descenso en el valor de la viscosidad de la disolución; descenso que es menos acentuado a medida que aumenta la presencia de cafeína en la disolución.

Tabla 6.2. Viscosidad, η , de las disoluciones acuosas de cafeína a 298,15 y 310,15 K.

$10^3 m$ /(mol·kg ⁻¹)	η /cP	$10^3 \sigma$ (a)	η /cP	$10^3 \sigma$ (a)
T=298,15 K			T=310,15 K	
0,505724	0,8905	0,7	0,6918	0,9
1,01145	0,8908	0,7	0,6923	0,8
4,04580	0,8914	0,3	0,6942	0,5
8,09159	0,8923	0,5	0,6967	0,2
10,3145	0,8930	0,2	0,6988	0,3
12,6431	0,8935	0,7	0,7004	0,3
25,2862	0,8969	0,5	0,7094	0,2
50,5725	0,9042	0,3	0,7273	0,3

(a) σ representa la desviación estándar de todas las medidas realizadas

Dado que la cafeína es una base débil en disolución acuosa, que posee un momento dipolar de 3,64 debye, el análisis de la influencia de la concentración sobre el de la viscosidad de sus disoluciones acuosas, se ha llevado a cabo usando la conocida ecuación empírica de Jones-Dole [28] (ecuación 3.1.1, capítulo 3) válida para las disoluciones de electrolitos. En esta ecuación, el coeficiente A se relaciona con las interacciones soluto-soluto y puede ser utilizado como indicativo de que esté ocurriendo algún tipo de asociación en la disolución. El coeficiente B de la ecuación (3.1.1) se asocia a las interacciones soluto-disolvente en la disolución y se utiliza como indicativo del carácter promotor (*structure-making*) o destructor (*structure-breaking*) del electrolito en la disolución. El coeficiente D depende tanto de las interacciones soluto-soluto como de las soluto-disolvente, siendo importante cuando la concentración de electrolito es elevada. Para el análisis realizado en este trabajo de Tesis Doctoral, y teniendo en cuenta el rango de concentraciones estudiado, este coeficiente D no se tuvo en cuenta.

Los valores obtenidos para por los coeficientes A y B de la ecuación de Jones-Dole, que dependen tanto de la naturaleza del soluto como del disolvente, se han calculado a partir del ajuste, por aplicación de un método de mínimos cuadrados, de los valores experimentales de viscosidad. Estos valores se presentan en la Tabla 6.3, junto con los obtenidos para el coeficiente de correlación, r^2 , correspondiente al ajuste.

Tabla 6.3. Valores de los coeficientes A y B para las disoluciones acuosas de cafeína a diferentes temperaturas

Temperatura / (K)	A / ($\text{dm}^{3/2} \cdot \text{mol}^{-1/2}$)	B / ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$)	r^2
298,15	- 0,004 (\pm 0,002)	0,31 ₀ (\pm 0,01)	0,999
310,15	- 0,003 (\pm 0,007)	1,03 ₆ (\pm 0,03)	0,999

Asimismo, en la Figura 6.3 se presenta la variación de la viscosidad relativa frente a la raíz cuadrada de la concentración de las diferentes disoluciones estudiadas.

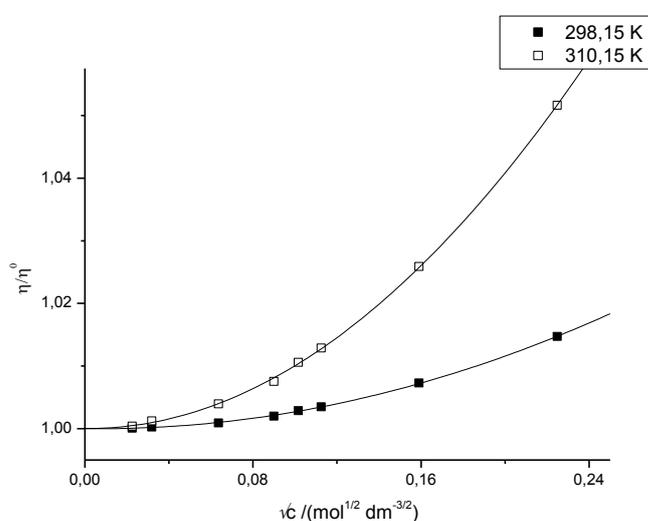


Figura 6.3. Variación de la viscosidad relativa de las disoluciones de cafeína, con la concentración

El valor obtenido para el coeficiente A es muy bajo y negativo en ambas temperaturas estudiadas, de lo que se puede inferir la presencia de débiles interacciones soluto-soluto, en especial a la temperatura de 295,15 K, hecho éste que está en concordancia con la conocida tendencia que presenta la cafeína, en disolución acuosa, para auto-asociarse mediante un efecto de "vertical-stacking" [14, 21, 29].

Por otra parte, el valor positivo encontrado para el coeficiente de viscosidad B , para la cafeína en ambas las temperaturas, junto con el valor positivo de su variación con la temperatura, dB/dT ($=$ 0,06), sugiere, tal como ha sido propuesto por diversos autores [30-31], que la cafeína posee una cierta capacidad anómala promotora de estructura, caracterizada por la existencia de fuertes interacciones soluto-disolvente. Tal afirmación es concordante

con el comportamiento descendente del valor de ϕ_V con el aumento de la concentración de cafeína en la disolución, ya comentado con anterioridad al analizar esta magnitud termodinámica.

El valor de B puede correlacionarse con el volumen molar parcial a dilución infinita (es decir, el volumen molar aparente a concentración infinitesimal) del soluto y proporcionar información relativa a que éste esté o no solvatado. Normalmente valores elevados de B/\overline{V}_2^0 (superiores a 2,5) son indicativos de la formación de una primera capa de hidratación alrededor de un soluto. Valores de B/\overline{V}_2^0 entre 0 y 2,5 corresponden habitualmente a especies no solvatadas [32, 33]. Para la cafeína, los valores del cociente B/\overline{V}_2^0 son de 2,2 y 7,1 a 298,15 K y 310,15 K, respectivamente. O sea, existe una capa ordenada de moléculas de disolvente alrededor de la cafeína, consistente con las observaciones anteriores de que éste es un soluto con carácter promotor de estructura.

6.1.4. Coeficientes de difusión

En la tabla 6.4 se presentan los valores medios del coeficiente de difusión mutua, D , para la cafeína en disolución acuosa. Los datos que aparecen listados para la temperatura de 298,15 K han sido tomados de la bibliografía [13], mientras que los correspondientes a 310,15 K se midieron experimentalmente usando el método de dispersión de Taylor. Para cada disolución de flujo, ϵ , se obtuvieron al menos 4 perfiles experimentales diferentes, generados por la inyección de muestras de concentración mayor o menor que la correspondiente a la disolución de flujo. Por ello, junto con los valores de D se presentan los de la desviación estándar, S_D , del valor promedio calculado. Los valores así encontrados presentaron una muy buena reproducibilidad, del orden del 99%.

Como puede comprobarse al analizar los valores obtenidos para el coeficiente de difusión de la cafeína en disolución acuosa, se confirma la esperada tendencia hacia la disminución en el valor de este parámetro de transporte, para las dos temperaturas estudiadas, a medida que aumenta la concentración de la disolución, siendo dicho descenso más acentuado cuando la temperatura es mayor.

Tabla 6.4. Coeficientes de difusión mutua de disoluciones acuosas de cafeína, medidos con la técnica de Taylor, a 298,15 y 310,15 K.

c /(mol·dm ⁻³)	Δc /(mol·dm ⁻³)	D /(10 ⁻⁹ m ² ·s ⁻¹) ^{a,[13]} (298,15 K)	$D \pm S_D$ /(10 ⁻⁹ m ² ·s ⁻¹) ^{b,c} (310,15 K)
0,001	0,001	0,760	1,053 ± 0,012
0,002	0,002	0,751	1,031 ± 0,009
0,004	0,004	0,742	0,995 ± 0,008
0,005	0,004	0,738	0,980 ± 0,009 ^d
0,008	0,004	0,719 ^e	0,952 ± 0,005
0,010	0,004	0,703	0,944 ± 0,003 ^d

^{a,b} Cada valor tabulado de D corresponde a una media de, al menos, 4 réplicas; S_D representa la desviación estándar de la media; ^d referencia [16]; ^e Valor estimado para la difusión de la cafeína acuosa haciendo uso de la ecuación lineal $D/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}) = D^0 + a_1 c + a_2 c^2 + a_3 c^3$ (desviación estándar <1%); D^0 es el coeficiente de difusión a concentración infinitesimal [13].

6.1.4.1. Influencia de la concentración sobre el coeficiente de difusión

Los coeficientes de difusión mutua se han analizado en función de los cambios en la concentración de la disolución. A partir de este análisis se encontró, por aplicación de un método de ajuste por mínimos cuadrados, que la variación de los datos de difusión obtenidos experimentalmente, en función de la concentración de cafeína, puede representarse a través de un polinomio del tipo $D = D^0 + a_1 c + a_2 c^2 + a_3 c^3$, siendo D^0 el valor que correspondería a la situación de concentración infinitesimal. En la Figura 6.4 está representada esta dependencia.

El valor recogido en la bibliografía para 298,15 K es $D^0 = 0,764 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [13] y el calculado mediante el ajuste de los datos aquí obtenidos, para la temperatura de 310,15 K, $D^0 = 1,077 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, siendo los valores encontrados para los parámetros de ajuste: $a_1 = -25,38 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ y $a_2 = 1213,3 \text{ dm}^6 \cdot \text{mol}^{-2}$ y un coeficiente de correlación de 0,98.

La determinación de los coeficientes de difusión a concentración infinitesimal, por vía experimental, es también posible, dentro de la imprecisión que acompaña a este método de dispersión, mediante perfiles de concentración generados por la inyección de muestras de disoluciones diluidas del soluto estudiado, en un flujo laminar de agua. Mediante esta técnica se obtuvo, para el coeficiente de difusión infinitesimal de la cafeína, un valor de $D^0 = 0,760 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, a 298,15 K y de $D^0 = 1,052 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, a 310,15 K.

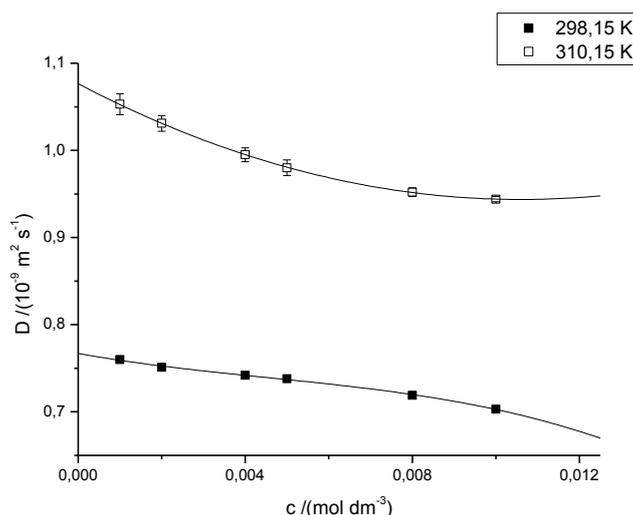


Figura 6.4. Variación del coeficiente de difusión, D , de la cafeína en disolución acuosa con la concentración, a diferentes temperaturas

Al analizar los resultados, se comprueba que el coeficiente de difusión mutua disminuye con el aumento de la cantidad de cafeína presente en la disolución, para cada temperatura. Este comportamiento es el previsible si se tiene presente que el aumento en el número de partículas presentes en la disolución, hace que disminuya la movilidad de las moléculas de soluto y, consecuentemente, que también disminuya su coeficiente de difusión. Por el contrario, el aumento de temperatura produce el efecto inverso, que debe explicarse en términos del aumento del movimiento térmico y, consecuentemente, de la velocidad media de las moléculas y, por consiguiente, de su coeficiente de difusión. Se aprecia un aumento promedio del 30%.

En cuanto a los aspectos cuantitativos de este aumento, hay que señalar un efecto de la concentración sobre el coeficiente de difusión distinto para las dos temperaturas ensayadas, en el rango de concentración estudiado. Así, mientras que a 298,15 K, D disminuye un 8%, aproximadamente, a 310,15 K, dicha disminución en D es en torno a un 11,5%.

A partir del análisis de los datos anteriormente presentados para la densidad y la viscosidad de estas disoluciones acuosas de cafeína, se dedujo que debían ocurrir interacciones del tipo soluto-soluto derivadas de la auto-asociación de la cafeína. De hecho, la cafeína en agua es una base muy débil, por lo que prácticamente no se encuentra disociada en disolución acuosa, manteniéndose una gran parte de la misma bajo la forma molecular. Al aumentar la temperatura, la constante de equilibrio disminuye [20] dando lugar a la existencia de una mayor cantidad de cafeína protonada en disolución, lo que podría contribuir a una mayor movilidad de las especies en disolución y, como consecuencia de ello, a un aumento

en el valor del coeficiente de difusión mutua derivado de la creciente concentración de cafeína y del aumento de la temperatura.

En disolución acuosa, la cafeína sufre un proceso de auto-asociación de manera progresiva. Hay que tener en cuenta que solo sus formas monómeras están protonadas. Los dímeros y otros polímeros que pudiesen existir en el medio, son bases más débiles que los monómeros de la cafeína, por lo que su protonación se produce en una menor cuantía. Para temperaturas más bajas, la libre auto-asociación de la cafeína es más fuerte [20]. Por lo tanto, a temperaturas más bajas hay una mayor cantidad de cafeína en forma de dímeros y polímeros, que pueden contribuir a la disminución de la movilidad iónica, lo que lleva a una disminución del coeficiente de difusión, lo que está de acuerdo con los resultados experimentales aquí encontrados.

6.1.4.2. Influencia de la temperatura sobre el coeficiente de difusión

La ecuación de Stokes-Einstein [34-39] para una partícula que se mueve en un medio hidrodinámico continuo, permite relacionar el coeficiente de difusión con la viscosidad del medio y con las dimensiones de la partícula. Para una partícula esférica se tiene que

$$r = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (6.1.1)$$

siendo r el radio hidrodinámico efectivo; k_B , la constante de Boltzman; T , la temperatura absoluta; η , la viscosidad del medio y D , el coeficiente de difusión.

En el caso particular de las disoluciones diluidas, la concentración del soluto tiende a acercarse a cero y, por tanto, la viscosidad de la disolución se aproxima a la viscosidad del disolvente. En esas condiciones, la aplicación de la ecuación de Stokes-Einstein permite analizar los cambios que se producen en el valor del coeficiente de difusión, por efecto de la temperatura, para las moléculas de cafeína en disolución acuosa [40]

$$r = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D^0} \quad (6.1.2)$$

donde D^0 es el coeficiente de difusión a concentración infinitesimal y η_0 la viscosidad del agua pura a la temperatura de trabajo, T [41-43].

A partir de la aplicación de la ecuación (6.1.2) se obtuvieron los siguientes valores: $r(298,15 \text{ K}) = 0,321 \text{ nm}$ y $r(310,15 \text{ K}) = 0,305 \text{ nm}$.

Conocido el radio hidrodinámico, es posible estimar el valor del volumen hidrodinámico molar límite para la molécula. Los valores que se han obtenido son los siguientes: 83,47 $\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$, a 298,15 K y 71,61 $\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$, a 310,15 K. Esto es, con el aumento de la temperatura, el tamaño aparente de la molécula hidratada disminuye. Es decir, a mayor temperatura la molécula tiende a encontrarse más deshidratada.

6.2. Sistema teofilina + agua

6.2.1. Medidas de densidad

En la tabla 6.5 se presentan los valores experimentales de la densidad, ρ (en $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$), obtenidos para las disoluciones acuosas de teofilina de las distintas concentraciones ensayadas (cuyos valores aparecen relacionados en la primera columna), a las temperaturas de 298,15 K y 310,15 K. Asimismo, se indican los valores de desviación estándar encontrada, σ , estimados considerando todas las medidas realizadas.

Tabla 6.5. Densidades, ρ , y volúmenes molares aparentes, ϕ_V , para disoluciones acuosas de teofilina a 298,15 K y 310,15 K

$10^3 m$ /($\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)	ρ /($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	$10^6 \sigma$ (^a)	ϕ_V /($\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$)	ρ /($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	$10^6 \sigma$ (^a)	ϕ_V /($\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$)
T=298,15 K			T=310,15 K			
0,506551	0,997067	1,0	143,62	0,993350	1,0	147,62
1,01310	0,997087	2,3	142,29	0,993369	1,6	144,72
2,02621	0,997124	1,9	142,95	0,993408	3,5	143,74
4,05241	0,997207	1,5	141,30	0,993479	4,1	144,68
8,30482	0,997386	4,0	139,75	0,993643	3,9	143,42
10,1310	0,997466	3,1	139,10	0,993734	4,0	141,23
15,1965	0,997672	4,2	139,32	0,993917	3,8	142,32
20,2621	0,997887	2,3	138,93	0,994128	1,6	141,46
40,5241	0,998708	1,1	139,26	0,994899	4,5	141,97

(^a) σ representa la desviación estándar de todas las medidas realizadas

Aunque la teofilina es un compuesto ampliamente utilizado, pues presenta múltiples aplicaciones farmacológicas (descritas en el capítulo 1), no se conoce que, hasta la fecha, se hayan publicado datos acerca de la densidad de sus disoluciones acuosas.

Tal como ocurre en el caso de la cafeína, los valores de densidad aumentan monótonamente con la concentración de teofilina en la disolución, para ambas temperaturas estudiadas. Asimismo, se observa que no hay un efecto apreciable de la temperatura sobre estos valores de la densidad, ya que sus variaciones transcurren de forma casi paralela para las dos temperaturas analizadas. Por ello, también como entonces, puede concluirse que los cambios estructurales provocados por el efecto de la temperatura, no se ven prácticamente afectados por la presencia del soluto.

La representación gráfica de los valores de la densidad frente a la concentración se muestra en la Figura 6.5.

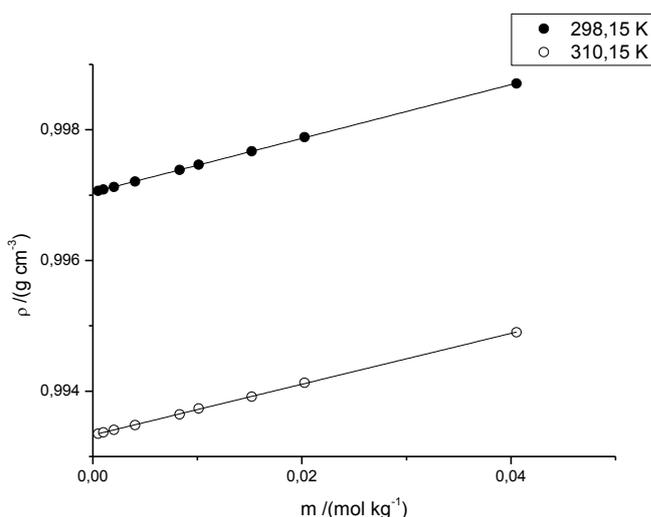


Figura 6.5. Variación de la densidad de disoluciones acuosas de teofilina con la concentración, a 298,15 y 310,15 K

A partir del ajuste mediante el método de mínimos cuadrados, de los datos de esta representación gráfica, se han obtenido las ecuaciones lineales siguientes ($r^2 = 0,999$)

$$\rho = 0,997043 (\pm 0,000002) + 0,0412 m \quad (\text{para } 298,15 \text{ K})$$

$$\rho = 0,993332 (\pm 0,000003) + 0,0389 m \quad (\text{para } 310,15 \text{ K})$$

donde m representa la molalidad de la disolución.

6.2.2. Volúmenes molares aparentes

En la Tabla 6.5 se presentan los valores del volumen molar aparente, ϕ_V , calculados, mediante la ecuación (2.1.8), para las disoluciones acuosas de teofilina, a 298,15 K y 310,15 K. Estos valores son similares a los encontrados para la cafeína, tal como cabía esperar dada la similitud entre las estructuras de ambas moléculas.

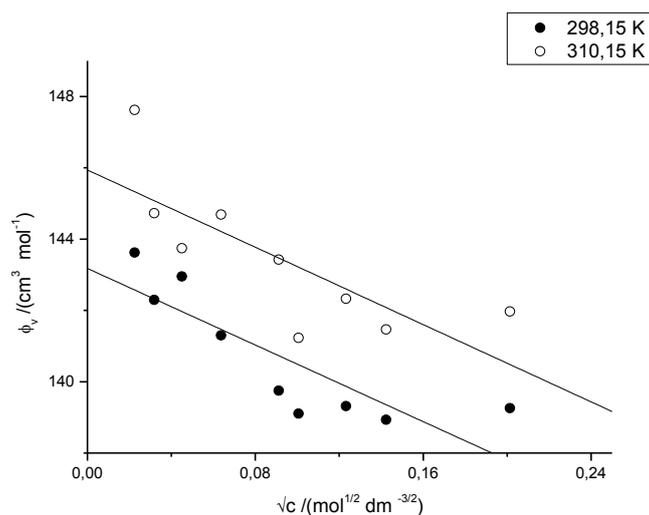


Figura 6.6. Volumen molar aparente de disoluciones acuosas de teofilina a 298,15 y 310,15 K

Del ajuste de estos valores a la ecuación de Masson (ecuación 2.1.10), representados en la Figura 6.6, para ambas temperaturas estudiadas, se han encontrado las relaciones siguientes

$$\phi_V = 143,2(\pm 0,7) - 26,9 \sqrt{c} \quad (\text{para } 298,15 \text{ K})$$

$$\phi_V = 145,9(\pm 0,9) - 27,1 \sqrt{c} \quad (\text{para } 310,15 \text{ K})$$

que, como puede observarse, son muy próximas a las encontradas para las disoluciones de cafeína anteriormente analizadas, si bien el valor encontrado para el volumen molar parcial a concentración infinitesimal de la teofilina es más pequeño, sobre todo a la temperatura más alta estudiada. Nuevamente, se aprecia que el volumen molar aparente disminuye con el incremento de la concentración, lo que podría justificarse en términos de la existencia de posibles interacciones entre las moléculas de teofilina que, al igual que se indicó para el caso de la cafeína, podrían dar lugar a la estabilización de estructuras asociativas entre las moléculas de teofilina. Asimismo, este comportamiento de ϕ_V con la concentración de soluto, sugiere que el carácter formador (*structure making*) de la estructura del agua, por parte de la

teofilina en las condiciones de trabajo ensayadas, se amortigua a medida que aumenta su concentración.

6.2.3. Viscosidades

En la tabla 6.6 se presentan los valores experimentales de la viscosidad, η (en cP), (junto con los de su desviación estándar) correspondientes a las disoluciones acuosas de teofilina estudiadas, a las temperaturas de 298,15 y 310,15 K.

Como cabía esperar, estos valores de la viscosidad aumentan al hacerlo el de la concentración de teofilina en la disolución, siendo dicho incremento pequeño, en especial a la temperatura de 298,15 K. El aumento de temperatura produce el esperado descenso en el valor de la viscosidad de la disolución, descenso que se va amortiguando, incluso de una forma más suave que en el caso de la cafeína, a medida que aumenta la concentración de teofilina en la disolución.

Tabla 6.6. Viscosidad, η , de las disoluciones acuosas de teofilina a 298,15 y 310,15 K.

$10^3 m$ /(mol·kg ⁻¹)	η /cP	$10^3 \sigma$ (a)	η /cP	$10^3 \sigma$ (a)
T=298,15 K			T=310,15 K	
0,506551	0,8904	1,0	0,6916	0,7
1,01310	0,8905	2,3	0,6917	0,4
2,02621	0,8907	1,9	0,6924	0,6
4,05241	0,8914	1,5	0,6946	0,6
8,30482	0,8919	4,0	0,6961	0,4
10,1310	0,8922	3,1	0,6974	0,9
15,1965	0,8934	4,2	0,7002	0,7
20,2621	0,8955	2,3	0,7042	0,3
40,5241	0,8996	1,1	0,7174	0,5

(a) σ representa la desviación estándar de todas las medidas realizadas

La teofilina en disolución acuosa es un ácido débil con un momento dipolar de 4,28 debye. Por ello, el análisis de la influencia de la concentración sobre los valores

experimentales medidos para la viscosidad de sus disoluciones acuosas, se realizó aplicando la ecuación de Jones-Dole (ecuación (3.1.1)).

Tabla 6.7. Valores de los coeficientes A y B para las disoluciones acuosas de teofilina a diferentes temperaturas

Temperatura /(K)	A / (kg·mol ^{-1/2})	B / (kg ² ·mol ^{-3/2})	r^2
298,15	- 0,012 (± 0,001)	0,309 (± 0,008)	0,999
310,15	- 0,021 (± 0,007)	1,03 ₁ (± 0,032)	0,999

Al igual que se hizo para el caso de la cafeína, en el análisis de los datos de viscosidad de las disoluciones de teofilina, no se tuvo en cuenta el posible valor del coeficiente D . Los valores para los coeficientes A y B de la ecuación de Jones-Dole se calcularon a partir de un ajuste no lineal, por un método de mínimos cuadrados, de los valores experimentales de viscosidad. Estos valores se presentan en la Tabla 6.7, junto con los obtenidos para el coeficiente de correlación, r^2 , correspondiente al ajuste.

En la Figura 6.7 se muestra la variación de la viscosidad relativa frente a la raíz cuadrada de la concentración de las diferentes disoluciones estudiadas.

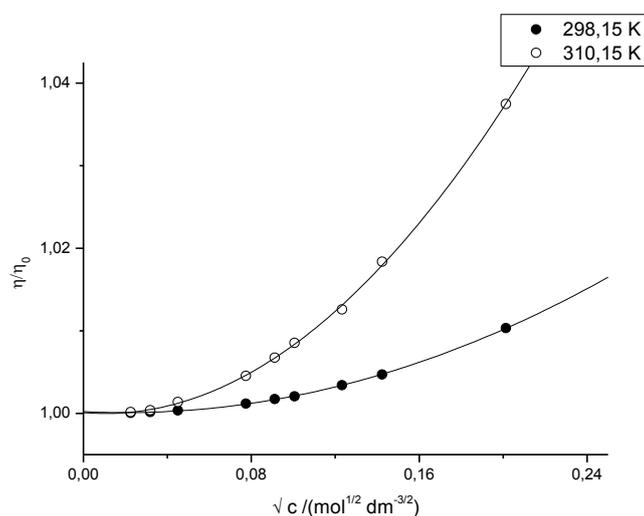


Figura 6.7. Variación de la viscosidad relativa de las disoluciones de teofilina, con la concentración

Como puede verse, también para las disoluciones acuosas de teofilina se obtienen valores negativos para el coeficiente A . Sin embargo, los valores obtenidos en el caso presente, son

mucho mayores que los que se encontraron para la cafeína (son un orden de magnitud superiores), lo que es indicativo de que, aunque ambas bases de purina en disolución acuosa poseen capacidad auto-asociativa, las interacciones que tienen lugar entre las moléculas de teofilina son más fuertes que las que se producen entre las moléculas de cafeína, principalmente a 310,15 K.

En este caso se halla un valor positivo para el coeficiente B de viscosidad de la teofilina, en ambas temperaturas, siendo el de dB/dT ($= 0,06$) también positivo; es decir, dicho coeficiente B aumenta con la temperatura. Los valores de la relación $B/\sqrt{V_2^0}$ son iguales a los de la cafeína, a las mismas temperaturas, es decir, 2,2 y 7,1 a 298,15 y 310,15 K, respectivamente. Esto significa que en estas disoluciones existen fuertes interacciones soluto-disolvente que se ven reforzadas por el aumento de la temperatura, lo que supone un indicativo de que la teofilina posee capacidad para incrementar la estructura del agua (carácter *structure-making*) en la disolución.

No obstante, el coeficiente B para la teofilina tiene un valor inferior al que presenta la cafeína, lo cual indica que las interacciones que tienen lugar entre las moléculas de teofilina y el disolvente, el agua, deben ser menores en este caso que en el de la cafeína. Tal conclusión está en concordancia con el hecho de que la molécula de teofilina no dispone de grupo metilo en la posición 7 (como sí sucede con la cafeína), por lo que es un compuesto más polar (es decir, menos hidrofóbico) que aquella; por tal motivo, es de esperar que la estructura del agua deba verse menos afectada por la auto-asociación de este soluto [44].

6.2.4. Coeficientes de difusión

En la tabla 6.8 se presentan los valores medios correspondientes a las varias determinaciones realizadas para cada una de las diferentes disoluciones de flujo, ϵ , del coeficiente de difusión mutua, D , para la teofilina en disolución acuosa, a 298,15 K y a 310,15 K. Junto a éstos, se presentan los encontrados para la desviación estándar, S_D , de dicho valor medio calculado. Estos valores fueron medidos con la técnica de dispersión de Taylor. También en este caso se obtuvo una buena reproducibilidad de los resultados experimentales, del orden del 99%.

Como puede verse a partir del análisis de estos valores tabulados, tal como ocurrió en el caso del coeficiente de difusión de las disoluciones acuosas de cafeína, para las dos temperaturas estudiadas, la tendencia observada es hacia una disminución del coeficiente de

difusión de la teofilina con el aumento de la concentración. Esta disminución es más acentuada cuando la temperatura es mayor

Tabla 6.8. Coeficientes de difusión mutua de disoluciones acuosas de teofilina, medidos con la técnica de Taylor, a 298,15 K y 310,15 K.

c /(mol·dm ⁻³)	Δc /(mol·dm ⁻³)	$D^a \pm S_D^b$ /(10 ⁻⁹ m ² ·s ⁻¹) (298,15 K)	$D^a \pm S_D^b$ /(10 ⁻⁹ m ² ·s ⁻¹) (310,15 K)
0,001	0,001	0,801 ± 0,012	1,124 ± 0,009
0,002	0,002	0,785 ± 0,007	1,098 ± 0,009
0,004	0,004	0,769 ± 0,005	1,053 ± 0,009
0,005	0,004	0,762 ± 0,005 ^c	1,035 ± 0,009 ^c
0,008	0,004	0,742 ± 0,006	0,994 ± 0,005
0,010	0,004	0,734 ± 0,004 ^c	0,979 ± 0,006 ^c

^a Cada valor de D corresponde a una media de, al menos, 4 réplicas; ^b S_D representa la desviación estándar de la media; ^c referencia [11].

6.2.4.1. Influencia de la concentración sobre el coeficiente de difusión

Al analizar los resultados recogidos en la tabla 6.8 se verifica que, tal como sucede con la cafeína, para cada una de las temperaturas estudiadas, el coeficiente de difusión mutua de la teofilina disminuye con el aumento de la cantidad de soluto presente en la disolución. Esta disminución, sin embargo, no es independiente de la temperatura. En efecto, mientras que a 298,15 K el coeficiente de difusión, D , experimenta una disminución, con el aumento de la temperatura, del 8% aproximadamente, a 310,15 K esta disminución en D es de un 13%, aproximadamente. El aumento de la temperatura conduce, por el contrario, a un aumento del 33-40%, aproximadamente, en el valor del coeficiente de difusión. Estos valores son muy próximos a los encontrados para la cafeína, por lo que su justificación debe discurrir de forma paralela al de aquella.

En la Figura 6.8 se ha representado gráficamente esta variación del coeficiente de difusión de la teofilina con la concentración de la disolución, a las dos temperaturas estudiadas.

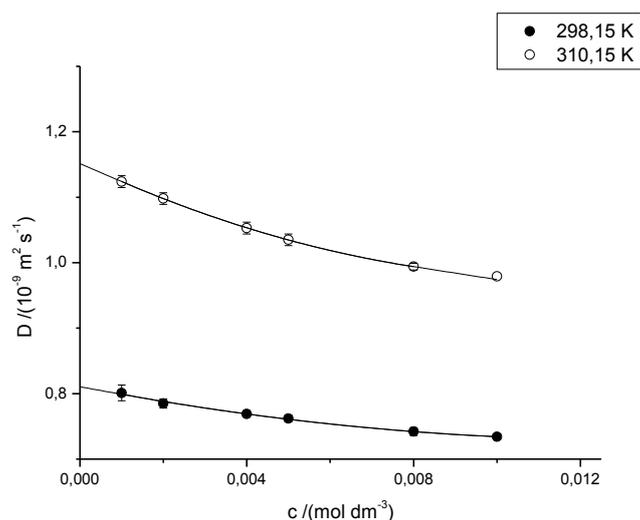


Figura 6.8. Variación del coeficiente de difusión de la teofilina acuosa con la concentración, a diferentes temperaturas

Los datos de difusión de la tabla 6.8 se analizaron, en función de la concentración de la disolución, por ajuste a un polinomio del tipo $D = D^0 + a_1 c + a_2 c^2$. A partir del mismo, se obtuvo el valor correspondiente al coeficiente de difusión a concentración infinitesimal, D^0 . En la tabla 6.9 se recogen los valores encontrados para los parámetros del ajuste.

Tabla 6.9. Parámetros del ajuste polinómico de D frente a la concentración, para disoluciones acuosas de teofilina, a 298,15 y 310,15 K.

T / (K)	D^0 /($10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	a_1 /($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$)	a_2 /($\text{dm}^6 \cdot \text{mol}^{-2}$)	r^2
298,15	0,811	-12,36	468,75	0,995
310,15	1,152	-29,81	1250,0	1,000

El coeficiente de difusión a concentración infinitesimal se determinó también por vía experimental (esto es, mediante extrapolación para $c = 0$ de los datos experimentales obtenidos a partir de perfiles de concentración generados por la inyección de muestras diluidas del soluto estudiado, en flujos laminares de agua), obteniendo a 298,15 K un valor de $D^0 = 0,806 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ y a 310,15 K de $D^0 = 1,157 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Como puede apreciarse, ambos valores están en muy buena concordancia con los obtenidos mediante ajuste de los valores de D frente a la concentración de la teofilina en disolución.

6.2.4.2. Influencia de la temperatura sobre el coeficiente de difusión

De igual manera que en el caso de la cafeína, se estimó el valor del radio hidrodinámico de la molécula de teofilina en estos medios acuosos, a través de la ecuación de Stokes-Einstein [34-39] (ecuación (6.1.2)). Los valores así encontrados fueron $r = 0,302$ nm (para 298,15 K) y $r = 0,285$ nm (para 310,15 K). Tal como ocurre con la cafeína, el aumento de la temperatura parece conducir a un efecto de deshidratación de la molécula de teofilina.

Asimismo, se hizo una estimación del valor correspondiente al volumen hidrodinámico molar límite de la molécula de teofilina a ambas temperaturas ensayadas, encontrando los valores de $71,08 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ a 298,15 K y de $57,90 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ a 310,15 K. Ambos valores son, como cabía esperar, inferiores a los encontrados para la molécula de cafeína.

6.3. Resumen

El estudio de las propiedades de las disoluciones acuosas de cafeína y teofilina permitió comprobar que, en medio acuoso, ambas xantinas presentan un comportamiento semejante en cuanto a las propiedades aquí estudiadas (densidad, viscosidad, y difusión), tal como cabría esperar, dadas las similitudes de estructura que ambas moléculas presentan (difieren en la presencia, en el caso de la cafeína, de un grupo metilo en el carbono 7 del anillo de purina).

Evidentemente, a ambas las temperaturas se verificó que la teofilina presenta un valor del volumen molar parcial a concentración infinitesimal menor que el de la cafeína, acorde con su diferente estructura, ya comentada con anterioridad.

Del análisis de los coeficientes de la ecuación de Jones-Dole para la viscosidad de disoluciones de electrolitos (ambas xantinas lo son, aunque débiles) se deduce, por una parte, a partir del valor encontrado para el coeficiente A , que aunque la constante de asociación de la cafeína posee un valor mayor que la correspondiente a la teofilina, las interacciones asociativas que tienen lugar entre las moléculas de ésta última son más fuertes.

Por otra parte, se encuentra que el valor del coeficiente B de la ecuación de Jones-Dole es positivo para ambos solutos, si bien es ligeramente inferior para la teofilina, y muy similar a ambas temperaturas. El hecho de que su variación con la temperatura, igual en ambos casos: $dB/dT = 0,06$, sea también positivo, lleva a considerar que ambos compuestos poseen un carácter promotor de estructura (*structure making*) anómalo en disolución acuosa, aunque la capacidad para potenciar una mayor estructura del agua es ligeramente mayor en el caso de la

cafeína. También el cociente entre el valor del coeficiente B de la ecuación de Jones-Dole y el volumen molar aparente a concentración infinitesimal (el volumen molar parcial a dilución infinita), conduce a valores iguales para ambos solutos, de 2,2 y 7,1, a 298,15 y 310,15 K, lo cual es una evidencia más del carácter *structure making* ya manifestado en base a los resultados anteriores.

Respecto a la difusión de estas especies en disolución acuosa, se confirma que los coeficientes de difusión siguen la tendencia ya observada en las anteriores propiedades fisicoquímicas analizadas. Es decir, la cafeína es la que presenta un coeficiente de difusión menor, lo que es consistente, por una parte, con su mayor masa molecular y con un mayor radio hidrodinámico y, por otra parte, con su mayor tendencia a la auto-asociación y, por lo tanto, para tener una menor movilidad.

6.4. Sistema β -ciclodextrina + agua

Las ciclodextrinas, sobre todo sus derivados alquilados, son frecuentemente utilizadas en aplicaciones farmacológicas, comúnmente para aumentar la solubilidad de medicamentos y en el diseño de sistemas de liberación controlada de moléculas de fármacos [4-9].

En disolución acuosa, la cavidad ligeramente apolar de las ciclodextrinas está ocupada por moléculas de agua que pueden ser fácilmente desplazadas por "*moléculas huésped*" del tamaño apropiado, que sean menos polares que el agua. La ciclodextrina disuelta es el "*anfitrión*" y la fuerza que conduce a la formación del complejo es la sustitución de las moléculas de agua del interior de la cavidad, por moléculas menos polares de un "*invitado*" adecuado. Sin embargo, cada ciclodextrina tiene su propia capacidad para formar complejos de inclusión con moléculas específicas. Una capacidad que depende, por una parte, de que pueda realizarse un buen ajuste de la molécula huésped en la cavidad hidrofóbica y, por otra, de la existencia de una fuerza neta de conducción energética que lleve a la formación del complejo [45-46]. No obstante, la asociación de las ciclodextrinas con fármacos puede verse favorecida sin que lleguen a formarse complejos de inclusión.

Por lo tanto, dado que la formación del complejo ocurre en disolución acuosa, las propiedades termodinámicas de estas disoluciones acuosas de las ciclodextrinas deben tener un papel importante en el proceso de complejación.

En este trabajo de Tesis Doctoral se ha investigado la β -ciclodextrina (a continuación referida como β -CD) y uno de sus derivados, la hidroxipropil- β -ciclodextrina (a continuación

referida como HP- β -CD), analizado el comportamiento de cada una de estas sustancias en disolución acuosa.

6.4.1. Medidas de densidad

En la Tabla 6.10 se presentan los valores experimentales de la densidad, ρ ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), obtenidos para las disoluciones acuosas de β -CD a las distintas concentraciones ensayadas, a las temperaturas de 298,15 K y 310,15 K. Asimismo, se indican los valores de desviación estándar encontrados, σ , estimados a partir de las medidas realizadas. A 298,15 K se encuentran publicados en la bibliografía [10, 30] valores para esta magnitud, que están en buena concordancia con los presentados en este trabajo de Tesis Doctoral, lo que indica que los datos aquí presentados poseen un aceptable nivel de precisión. Sin embargo, a la temperatura fisiológica (310,15 K) no se han encontrado datos publicados.

Tabla 6.10. Densidades, ρ , y volúmenes molares aparentes, ϕ_V , para disoluciones acuosas de β -ciclodextrina a 298,15 K y 310,15 K

$10^3 m$ /($\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$)	ρ /($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	$10^6 \sigma$ (^a)	ϕ_V /($\text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$)	ρ /($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	$10^6 \sigma$ (^a)	ϕ_V /($\text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$)
T=298,15 K			T=310,15 K			
0,436590	0,997236	8,4	705,04	0,993513	3,2	721,84
0,895318	0,997432	4,8	707,19	0,993708	3,1	717,61
1,74313	0,997799	5,2	704,42	0,994060	2,6	719,08
3,47949	0,998535	2,2	707,39	0,994790	3,8	717,22
6,95898	1,00001 ₂	2,8	707,76	0,996223	4,6	719,54
8,73180	1,00076 ₃	2,9	707,70	0,996988	5,9	715,72
10,5840	1,00157 ₂	1,3	705,15	0,997737	4,9	717,72
13,2300	1,00269 ₂	2,3	705,21	0,998805	4,2	719,06

(^a) σ representa la desviación estándar de todas las medidas realizadas

Estos valores de densidad se han representado frente a la concentración de soluto, a ambas temperaturas estudiadas, en la Figura 6.9.

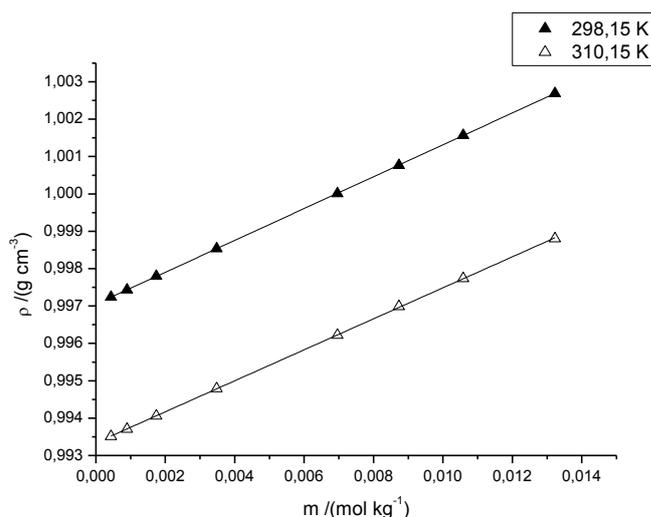


Figura 6.9. Variación de la densidad de las disoluciones acuosas de β -ciclodextrina con la concentración, a 298,15 y 310,15 K

Tal como era de esperar, los valores de la densidad aumentan con la concentración de la disolución para ambas temperaturas estudiadas. Por otra parte, este aumento se produce prácticamente con la misma variación a las dos temperaturas ensayadas, lo que permite afirmar que el efecto sobre la estructura del medio, como consecuencia del cambio en la temperatura, no se ve influido significativamente por la presencia de una mayor concentración de este soluto, al menos en el rango de concentración estudiado.

A partir de esta representación gráfica, mediante un método de mínimos cuadrados, se obtuvieron las ecuaciones lineales siguientes ($r^2 = 0,999$)

$$\rho = 0,997043 (\pm 0,000004) + 0,0426 m \quad (\text{para } 298,15 \text{ K})$$

$$\rho = 0,993332 (\pm 0,000009) + 0,0415 m \quad (\text{para } 310,15 \text{ K})$$

donde m representa la molalidad de la disolución.

6.4.2. Volúmenes molares aparentes

En la Tabla 6.10 se presentan los valores del volumen molar aparente, ϕ_V , calculados, mediante la ecuación (2.1.8), para las disoluciones acuosas de β -CD, a 298,15 K y 310,15 K. A 298,15 K, estos valores están en buena concordancia con los publicados anteriormente por otros autores [10, 47]. Dado que no se han podido encontrar datos a la temperatura fisiológica, tal comparación no ha sido posible a dicha temperatura.

Para el caso de solutos no-electrólitos, de acuerdo con Redlich [48], en disoluciones diluidas el volumen molar aparente responde mejor a una dependencia lineal con la concentración molar, de acuerdo a la ecuación (2.1.11). Esta fue, pues, la ecuación empleada para ajustar los datos experimentales para la β -CD en disoluciones acuosas. A partir de estos ajustes se obtuvieron las expresiones:

$$\phi_V = 706,2(\pm 0,9) - 2,0 c \quad (\text{para } 298,15 \text{ K})$$

$$\phi_V = 719,2(\pm 1,1) - 119,7 c \quad (\text{para } 310,15 \text{ K})$$

En la Figura 6.10 se encuentran representadas gráficamente estas variaciones de ϕ_V con la concentración molar, c .

Como puede apreciarse en la representación anterior, no aparece una linealidad claramente definida entre los valores de ϕ_V y la concentración de ciclodextrina, por lo que el error que acompaña a la determinación, por extrapolación, de los valores de ϕ_V^0 es relativamente elevado. Ello es debido, en gran medida, al pequeño rango de concentraciones que puede ser investigado (hasta 0,01 molar), dado la limitada solubilidad de la β -CD en agua.

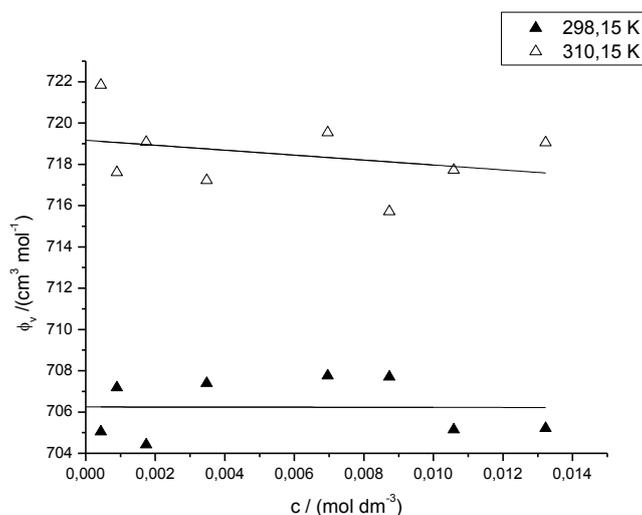


Figura 6.10. Volumen molar aparente de las disoluciones acuosas de β -ciclodextrina a 298,15 y 310,15 K

No obstante lo anterior, hay que reseñar que los valores elevados y positivos que se obtienen para los volúmenes molares aparentes de esta ciclodextrina son consistentes con los generalmente observados para compuestos orgánicos de alto peso molecular. Asimismo, es también destacable el hecho de que el valor del volumen molar parcial a concentración infinitesimal determinado en este trabajo de Tesis Doctoral mediante este procedimiento, a

298,15 K, es concordante con los valores publicados anteriormente por otros autores [10, 47].

Por otra parte, de acuerdo con las ecuaciones lineales encontradas a partir del análisis de los datos experimentales, el valor de ϕ_V tiende a disminuir con el aumento de la concentración de ciclodextrina en la disolución. Tal situación llevaría a considerar la existencia de interacciones entre las moléculas de ciclodextrina y la consiguiente estabilización de estructuras dímeras ciclodextrina-ciclodextrina, tal como ha sido sugerido por otros autores para el caso de la β -CD [49], proponiendo la existencia de dímeros del tipo cabeza-cabeza, mediante uniones de hidrógeno entre los dos grupos OH secundarios de la β -CD, así como también para el caso de las α -CD y γ -CD, en base a los valores de entropía molar parcial de exceso calculados para disoluciones acuosas de éstas últimas [50].

6.4.3. Viscosidades

En la tabla 6.11 se presentan los valores experimentales de la viscosidad (junto con los de su desviación estándar) correspondientes a las disoluciones de β -CD en agua estudiadas, a las temperaturas de 298,15 y 310,15 K.

Tabla 6.11. Viscosidad, η , de las disoluciones acuosas de β -ciclodextrina a 298,15 y 310,15 K.

$10^3 m$ /(mol·kg ⁻¹)	η /cP	$10^3 \sigma$ (a)	η /cP	$10^3 \sigma$ (a)
T=298,15 K			T=310,15 K	
0,436590	0,8911	0,7	0,6924	0,2
0,895318	0,8919	0,7	0,6934	0,8
1,74313	0,8933	0,3	0,6952	0,5
3,47949	0,8963	1,0	0,6988	0,2
6,95898	0,9021	0,8	0,7061	0,6
8,73180	0,9051	0,3	0,7099	0,3
10,5840	0,9082	0,5	0,7138	0,2
13,2300	0,9127	0,3	0,7193	0,3

(a) σ representa la desviación estándar de todas las medidas realizadas

Como era previsible, estos valores de la viscosidad aumentan, de manera importante, con el aumento de la concentración de β -CD en la disolución, observándose que dicho incremento se intensifica a la temperatura más alta de las estudiadas (310,15 K). Por otra parte, el aumento de temperatura provoca el lógico descenso de la viscosidad de la disolución; descenso que es menor a medida que aumenta la presencia de β -CD en la disolución.

Considerando que, para moléculas grandes de no-electrólitos el segundo término a la derecha de la ecuación (3.2.1) del capítulo 3 es equivalente al producto de un coeficiente numérico por el volumen molar del soluto (solvatado) y por la concentración molar de la disolución [52], la ecuación anterior puede escribirse de la forma

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + Bc + Dc^2 \quad (6.4.1)$$

donde los coeficientes B y D son constantes que dependen tanto de la naturaleza del soluto como de la del disolvente, así como de la temperatura y de la presión. Este coeficiente B puede suponerse que es equivalente al que aparece en la ecuación de Jones-Dole para la viscosidad de los electrólitos, por lo que también reflejará los efectos de las interacciones soluto-disolvente en la disolución de estos no-electrólitos, por lo que se utiliza como criterio para la medida de la capacidad que tiene el soluto para incrementar (*structure-making*) o romper (*structure-breaking*) la estructura del agua en la disolución. El signo y la magnitud del coeficiente D , a su vez, se ha relacionado con las interacciones soluto-soluto que tienen lugar en el medio.

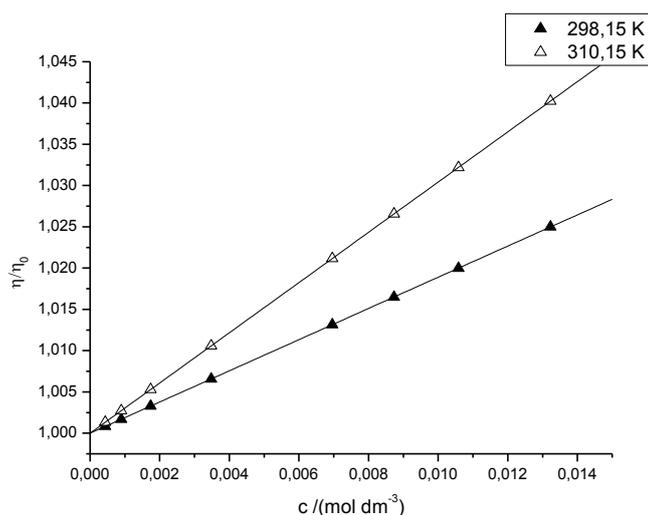


Figura 6.11: Variación de la viscosidad relativa de las disoluciones de β -ciclodextrina con la concentración, a diferentes temperaturas

Para el presente trabajo de Tesis Doctoral, se usó la ecuación de Einstein (ecuación (6.4.1)) en el análisis de la dependencia de la viscosidad con la concentración de las disoluciones de β -CD. Miyajima *et al.* [50] han probado que esta ecuación es válida para describir la viscosidad de disoluciones acuosas de α - y γ -CD hasta concentraciones del orden de $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. En la Figura 6.11 se representa la variación de la viscosidad relativa, frente a la concentración, para las diferentes disoluciones acuosas de β -CD estudiadas. Asimismo, en la tabla 6.12 se presentan los valores encontrados para los coeficientes B y D de la ecuación (6.4.1), calculados a partir del ajuste de los datos experimentales obtenidos, mediante un método de mínimos cuadrados, junto con los del coeficiente de correlación, r^2 , correspondiente al ajuste.

De la observación de los datos recogidos en la tabla anterior, se destaca el valor tan pequeño encontrado para el coeficiente D a ambas temperaturas, por lo que dada la incertidumbre implicada en su determinación, mayor que el valor mismo del parámetro, su consideración aportaría muy poco, o casi nada, al análisis de la viscosidad de estos sistemas y no se ha tenido en cuenta en dicho análisis. No sucede lo mismo con el coeficiente B , cuyos valores encontrados son elevados y positivos, lo cual es indicativo de que la β -CD posee capacidad formadora (“*structure-making*”) de la estructura del agua [31], en concordancia con el comportamiento observado para las otras ciclodextrinas, por otros autores [50]. Además, de la información obtenida a partir de la relación $B/\sqrt{V_2^0}$, cuyos valores son elevados de (2,6 a 298,15 K y 4,23 a 310, 15 K) son indicativos de la formación de una capa de hidratación alrededor de la ciclodextrina en disolución acuosa, es decir, que la ciclodextrina se encuentra hidratada.

Tabla 6.12. Valores de los coeficientes B y D obtenidos para las disoluciones acuosas de β -ciclodextrina a diferentes temperaturas

Temperatura / (K)	B / ($\text{dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$)	D / ($\text{dm}^6\cdot\text{mol}^{-2}$)	r^2
298,15	$1,89 (\pm 9,2\cdot 10^{-13})$	$- 1,3\cdot 10^{-10} (\pm 6,9\cdot 10^{-11})$	0,999
310,15	$3,05 (\pm 9,2\cdot 10^{-13})$	$- 2,8\cdot 10^{-11} (\pm 6,9\cdot 10^{-11})$	0,999

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que el valor positivo encontrado para dB/dT (= 0,10) plantea que este soluto debe poseer un carácter opuesto (“*structure-breaking*”), tal y como ha sido sugerido por algunos autores [53], que debe provocar un efecto neto de disminución

de la estructura del agua. Sin embargo, tal como afirma Marcus [31], no existe una teoría definitiva sobre el coeficiente B de viscosidad, que permita relacionar de una forma satisfactoria la magnitud de su valor, o su variación con la temperatura, con los efectos estructurales del agua en la disolución, debiendo mantenerse en la tendencia, ampliamente aceptada por un buen número de investigadores (pues se correlaciona bastante bien con otros criterios que puedan manejarse), de que el carácter rompedor (“*structure-breaking*”) o formador (“*structure-making*”) de la estructura del agua que posee un soluto, responde, principalmente, al valor negativo o positivo, respectivamente, que presenta el parámetro B de viscosidad de este soluto.

6.4.4. Coeficientes de difusión

En la tabla 6.13 se presentan, para cada disolución de flujo utilizada, los valores medios obtenidos para el coeficiente de difusión, D , para las diferentes disoluciones acuosas de β -CD [10-11] estudiadas, a 298,15 K y 310,15 K, medidos usando el método de dispersión de Taylor. Como en ocasiones precedentes, para cada disolución de flujo, c , se realizaron al menos 4 perfiles de inyección diferentes, por lo que también se facilitan los valores correspondientes a la desviación estándar, S_D , del valor promedio calculado para D . Los valores así encontrados presentaron una muy buena reproducibilidad, del orden del 99%. Asimismo, los valores obtenidos a 298,15 K están en buena concordancia (desviación <1.3%) con los existentes en la literatura [10].

Tabla 6.13. Coeficientes de difusión de disoluciones acuosas de β -ciclodextrina, medidos con la técnica de Taylor, a 298,15 K y 310,15 K.

c /(mol·dm ⁻³)	Δc /(mol·dm ⁻³)	$D^a \pm S_D^b$ /(10 ⁻⁹ m ² ·s ⁻¹) (298,15 K) ^c	$D^a \pm S_D^b$ /(10 ⁻⁹ m ² ·s ⁻¹) (310,15 K)
0,002	0,002	0,324 ± 0,003	0,443 ± 0,005
0,004	0,004	0,323 ± 0,001	0,441 ± 0,004
0,005	0,004	0,322 ± 0,003	0,441 ± 0,003
0,006	0,004	0,321 ± 0,003	0,440 ± 0,003
0,008	0,004	0,318 ± 0,002	0,439 ± 0,004
0,010	0,004	0,316 ± 0,002	0,436 ± 0,004

^aCada valor de D corresponde a una media de, al menos, 4 réplicas; ^b S_D representa la desviación estándar de la media; ^c referencia [11].

Del análisis de los resultados de la tabla 6.13 se desprende que, como es de esperar, el coeficiente de difusión de la β -CD en estas disoluciones acuosas, disminuye con el aumento de la concentración en el medio, para las dos temperaturas estudiadas. Dicha disminución es, no obstante, muy poco importante con variaciones en D que son inferiores al 2%. Este hecho puede justificarse acudiendo a la consideración del tamaño de las moléculas de β -CD. En efecto, para que esta molécula se mueva en el seno de la disolución de flujo, debe encontrar un “hueco” adyacente en la disolución de tamaño adecuado [54] lo que, probablemente, no deberá depender de la pequeña diferencia existente entre las dos temperaturas ensayadas, insuficiente para justificar que puedan existir diferencias importantes entre la estructura del medio en ambas temperaturas. Asimismo, tampoco parece que el carácter formador de la estructura del agua de este soluto, ya comentado al analizar, en el epígrafe anterior, los valores de viscosidad de sus disoluciones acuosas, permita augurar que los cambios en la estructura del medio, producidos por ese efecto, sean suficientes como para influir en la velocidad de difusión de este soluto.

El efecto térmico sí que se deja sentir de manera significativa. En efecto, el aumento de temperatura, desde 298,15 K hasta 310,15 K, produce un incremento en el valor del coeficiente de difusión de la β -CD en torno a un 30%, resultado que se encuentra en consonancia con los encontrados para el resto de los solutos estudiados.

6.4.4.1. Influencia de la concentración sobre el coeficiente de difusión

Los valores obtenidos para el coeficiente de difusión de la β -CD en agua se analizaron en función de los cambios de concentración de la disolución, aplicando para ello un ajuste lineal, por el método de mínimos cuadrados, del tipo $D = D^0 + a c$, donde una vez más D^0 es el coeficiente de difusión a concentración infinitesimal. En la Figura 6.12 se ha representado esta dependencia, estando recogidos en la tabla 6.14 los valores encontrados para los parámetros del ajuste.

El valor obtenido a 298,15 K, $D^0 = 0,326 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, es coincidente con el publicado por otros autores [10] para este sistema. Estos valores de D^0 se determinaron, además, por vía experimental (a partir de perfiles de concentración obtenidos por inyecciones de disoluciones diluidas de este soluto, en un flujo laminar de agua) encontrándose valores concordantes con los recogidos en la tabla 6.14.

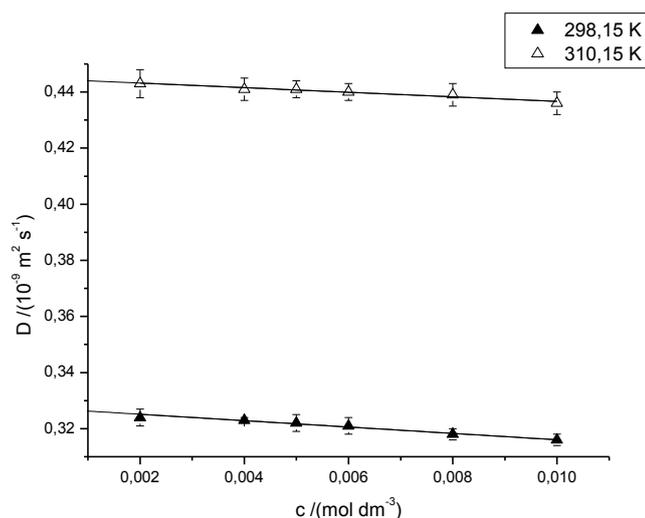


Figura 6.12: Variación con la concentración, del coeficiente de difusión de la β -ciclodextrina acuosa a diferentes temperaturas

Tabla 6.14: Parámetros del ajuste de los coeficientes de difusión de β -ciclodextrina con la concentración, a diferentes temperaturas

Temperatura / (K)	D^0 / ($10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	a / ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$)	r^2
298,15	0,326	-1,00	0,976
310,15	0,464	-0,77	0,960

6.4.4.2. Influencia de la temperatura sobre el coeficiente de difusión

A partir de la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación (6.1.2)), se estimó un valor de $0,75_2$ nm a 298,15 K y de $0,74_7$ nm a 310,15 K, para el radio hidrodinámico de la molécula de β -CD en estos medios acuosos. Estos valores son muy próximos a los reportados por Longsworth [55] para este mismo soluto. Asimismo, Evans *et al.* [56] han obtenido resultados del mismo orden a éste, al analizar otros sistemas similares.

Como puede apreciarse, las variaciones en r con la temperatura son muy pequeñas, inferiores al 1% y, por lo tanto, están dentro de la precisión que acompaña a las medidas de difusión. Es decir, se podría concluir que en estos medios acuosos, el valor del radio hidrodinámico de esta ciclodextrina no se ve afectado por el aumento de temperatura realizado, al menos en el rango de concentración estudiado.

A partir de los valores anteriores, se hizo una estimación de los volúmenes hidrodinámicos molares de las moléculas de β -CD, obteniendo los valores de 1074,3 $\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ a 298,15 K y de 1021,9 $\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ a 310,15 K.

6.5. Sistema hidroxipropil- β -ciclodextrina + agua

6.5.1. Medidas de densidad

En la Tabla 6.15 se presentan los valores experimentales de la densidad, ρ ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$), obtenidos para las disoluciones acuosas de HP- β -CD a las distintas concentraciones ensayadas (cuyos valores aparecen relacionados en la primera columna), a las temperaturas de 298,15 K y 310,15 K. Asimismo, se indican los valores de desviación estándar encontrados, σ , estimados a partir de las medidas realizadas.

Tabla 6.15. Densidades, ρ , y volúmenes molares aparentes, ϕ_V , para disoluciones acuosas de hidroxipropil- β -ciclodextrina a 298,15 K y 310,15 K

$10^3 m$ /($\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)	ρ /($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	$10^6 \sigma$ (^a)	ϕ_V /($\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$)	ρ /($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	$10^6 \sigma$ (^a)	ϕ_V /($\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$)
T=298,15 K			T=310,15 K			
0,414638	0,997266	2,1	854,21	0,993543	2,7	874,49
0,826814	0,997478	0,5	860,56	0,993750	4,1	877,69
1,64707	0,997894	0,5	866,46	0,994150	5,6	885,54
3,31054	0,998772	0,7	858,84	0,994981	3,5	883,38
6,62107	1,00040 ₀	2,8	871,86	0,996610	5,2	884,71
8,27634	1,00127 ₄	1,0	866,72	0,997459	5,8	880,38
12,4145	1,00334 ₃	1,0	868,55	0,999400	3,2	888,53
16,5363	1,00549 ₀	0,4	863,24	1,00159 ₂	4,2	875,82

(^a) σ representa la desviación estándar de todas las medidas realizadas

La representación gráfica de los valores de la densidad frente a la concentración de soluto se muestra en la Figura 6.13. Como en los casos anteriores, el valor de la densidad de las disoluciones aumenta monótonamente con el aumento de la concentración de la disolución,

para ambas temperaturas estudiadas. También, en este sistema el aumento se produce prácticamente con la misma magnitud a las dos temperaturas; o sea, puede afirmarse, como en los casos precedentes, que la temperatura es la propiedad que influye, de forma más significativa, en la estructura de estas disoluciones, en el rango de concentración estudiado.

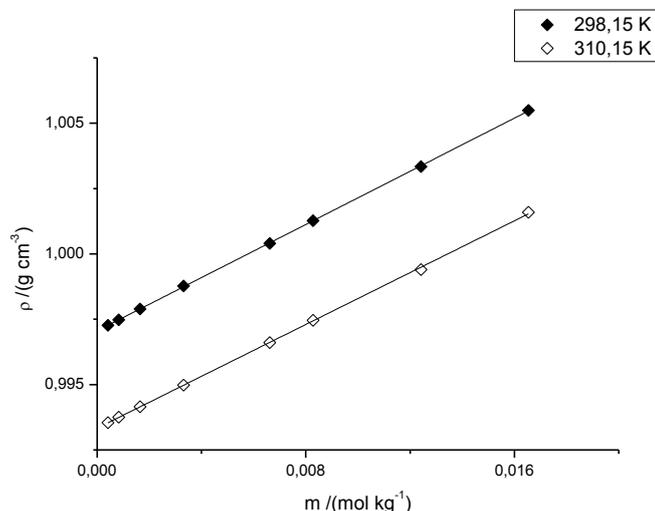


Figura 6.13. Variación de la densidad de las disoluciones acuosas de hidroxipropil-β-ciclodextrina con la concentración a 298,15 y 310,15 K

Del ajuste de los datos experimentales anteriores, usando un método de mínimos cuadrados, se obtuvieron las ecuaciones siguientes ($r^2 = 0,999$)

$$\rho = 0,997043 (\pm 0,000001) + 0,0509 m \quad (\text{para } 298,15 \text{ K})$$

$$\rho = 0,993332 (\pm 0,000002) + 0,0496 m \quad (\text{para } 310,15 \text{ K})$$

donde m representa la molalidad de la disolución.

6.5.2. Volúmenes molares aparentes

En la Tabla 6.15 se presentan los valores del volumen molar aparente, ϕ_V , calculados a partir de la densidad de las disoluciones acuosas de HP-β-CD, a 298,15 K y 310,15 K. Estos valores de ϕ_V se ajustaron a la ecuación lineal (2.1.11) propuesta por Redlich [48], encontrándose las siguientes relaciones para ambas temperaturas estudiadas

$$\phi_V = 861,0 (\pm 2,9) + 448,6 c \quad (\text{para } 298,15 \text{ K})$$

$$\phi_V = 880,8 (\pm 2,9) + 88,7 c \quad (\text{para } 310,15 \text{ K})$$

Dichas ecuaciones lineales están representadas en la Figura 6.14.

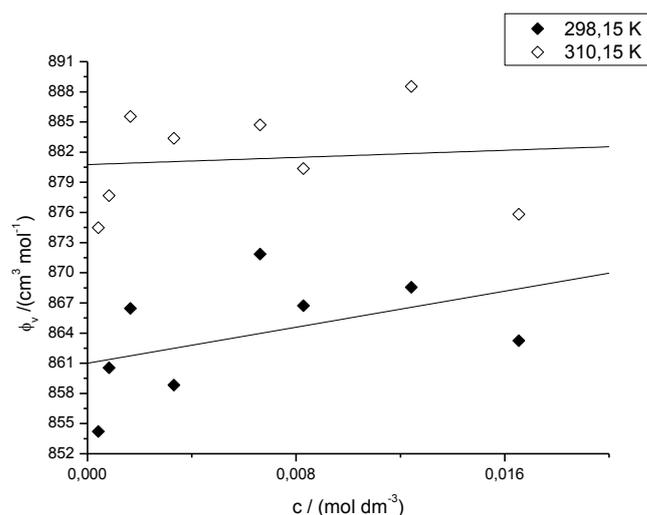


Figura 6.14. Volumen molar aparente de las disoluciones acuosas de hidroxipropil β -ciclodextrina a 298,15 y 310,15 K

Como puede verse, la HP- β -CD presenta valores elevados del volumen molar aparente, siendo incluso bastante superiores a los de la β -CD. Esta situación se mantiene, también, a concentración infinitesimal y puede ser consecuencia del hecho de tener grupos hidroxipropilo situados en el exterior de su estructura principal tronco-cónica.

Aunque, al igual que en el caso de la β -CD, se observa que la linealidad de ϕ_v con la concentración no está bien definida, se aprecia un comportamiento opuesto al que exhibe la β -CD, con un volumen molar aparente que presenta tendencia a aumentar con la concentración de la disolución. Tal comportamiento indicaría la existencia de una fuerte interacción soluto-soluto, que propiciaría la estabilización de estructuras dímeras de esta ciclodextrina, similares a las sugeridas en los casos de las ciclodextrinas no sustituidas [49-50].

6.5.3. Viscosidades

En la tabla 6.16 se presentan los valores experimentales de la viscosidad (junto con los de su desviación estándar) correspondientes a las disoluciones estudiadas de HP- β -CD en agua, a las temperaturas de 298,15 y 310,15 K.

Como era de esperar, estos valores de la viscosidad aumentan, de manera importante, con el aumento de la concentración de HP- β -CD en la disolución, observándose que, de forma análoga a lo que sucedía con la β -CD, dicho incremento se intensifica, aunque en este caso lo hace de una manera mucho más acusada, a la temperatura de 310,15 K. Por otra parte,

el aumento de temperatura provoca el esperado descenso de la viscosidad de las disoluciones, que es menos intenso a medida que aumenta la concentración de la HP- β -CD.

Tabla 6.16. Viscosidad de las disoluciones acuosas de hidroxipropil- β -ciclodextrina a 298,15 y 310,15 K.

$10^3 m$ /(mol·kg ⁻¹)	η /cP	$10^3 \sigma$ (a)	η /cP	$10^3 \sigma$ (a)
T=298,15 K			T=310,15 K	
0,414638	0,8912	1,0	0,6930	1,2
0,826814	0,8920	0,5	0,6945	0,8
1,64707	0,8936	0,5	0,6974	0,7
3,31054	0,8969	0,7	0,7033	0,8
6,62107	0,9034	2,8	0,7152	0,6
8,27634	0,9066	1,0	0,7211	0,9
12,4145	0,9148	1,0	0,7359	0,6
16,5363	0,9228	0,4	0,7507	0,4

(a) σ representa la desviación estándar de todas las medidas realizadas

El análisis de la dependencia de la viscosidad con la concentración de las disoluciones de HP- β -CD se realizó haciendo uso de la ecuación de Einstein (ecuación (6.4.1)).

En la Figura 6.15 se representa la variación de la viscosidad relativa, frente a la concentración, para las diferentes disoluciones acuosas de HP- β -CD estudiadas. Asimismo, en la tabla 6.17 se muestran los valores de los coeficientes B y D de la ecuación (6.4.1), encontrados para el ajuste de los datos experimentales, mediante el método de mínimos cuadrados, así como los valores obtenidos para el coeficiente de correlación, r^2 , del ajuste.

Como en el caso de la β -CD, los valores encontrados para el coeficiente D son extremadamente pequeños (y con incertidumbres superiores al propio valor de este coeficiente) y no se han tenido en cuenta en el posterior análisis de resultados. Asimismo, los valores obtenidos para el coeficiente B son, también para este soluto, grandes y positivos, lo que indica que la HP- β -CD posee una capacidad formadora (“*structure-making*”) de la estructura del agua [31], al igual que sucede con otras ciclodextrinas [50]. La relación entre B

y el volumen molar parcial del soluto refleja resultados de 2,6 y 5,9, a 298,15 y 310, 15 K, valores elevados e indicativos de la existencia de una capa de hidratación alrededor de la molécula de ciclodextrina en disolución acuosa y evidencia de su carácter “*structure-making*”.

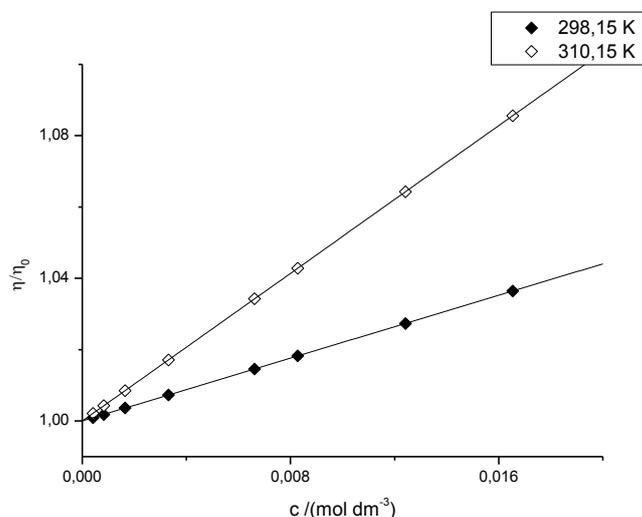


Figura 6.15. Variación de la viscosidad relativa de las disoluciones de hidroxipropil-β-ciclodextrina con la concentración

Tabla 6.17: Valores de los coeficientes B y D obtenidos para las disoluciones acuosas de hidroxipropil-β-ciclodextrina a diferentes temperaturas

Temperatura / (K)	B / ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$)	D / ($\text{dm}^6 \cdot \text{mol}^{-2}$)	r^2
298,15	$2,20 (\pm 2 \cdot 10^{-13})$	$- 3,1 \cdot 10^{-12} (\pm 1 \cdot 10^{-11})$	0,999
310,15	$5,19 (\pm 8 \cdot 10^{-13})$	$- 4,0 \cdot 10^{-12} (\pm 5 \cdot 10^{-11})$	0,999

No obstante lo anteriormente señalado, también para esta ciclodextrina la variación del coeficiente B con la temperatura, dB/dT , presenta un valor positivo y, en esta ocasión, muy elevado ($\approx 0,25$) lo que, de acuerdo con la clasificación de Nightingale [30], es indicativo de que este soluto tiene carácter rompedor (“*structure-breaking*”) de la estructura del agua.

Tal afirmación vendría apoyada por el hecho de la variación positiva del volumen molar aparente, ϕ_V , con el aumento de la concentración, señalado en el apartado anterior, producido, principalmente, por una mayor presencia de moléculas de agua en la esfera de hidratación de la ciclodextrina. Si se tiene en cuenta que la HP-β-CD presenta, respecto de la forma β, la sustitución de algún grupo hidroxilo del exterior de la molécula por grupos hidroxipropilo y que dicha sustitución tiene el efecto no solo de aumentar la solubilidad de la

ciclodextrina (que en el caso de la forma β es extremadamente baja, debido a la rigidez de su estructura heptagonal anillar), sino también de tornarla más hidrofílica, hay que concluir que esta ciclodextrina sustituida tiene una mayor capacidad para establecer uniones con las moléculas del agua circundante, para lo cual podría ser necesario romper la estructura del disolvente.

6.5.4. Coeficientes de difusión

En la tabla 6.18 se presentan, para cada disolución de flujo utilizada, los valores medios obtenidos para el coeficiente de difusión, D , para las diferentes disoluciones acuosas de HP- β -CD estudiadas [12] a 298,15 K y 310,15 K, medidos usando el método de dispersión de Taylor. Como en ocasiones anteriores, se obtuvo un mínimo de 4 perfiles de inyección diferentes, para cada disolución de flujo, c . Por ello, también se presentan en la tabla los valores correspondientes a la desviación estándar, S_D , del valor medio de D obtenido. Los valores así encontrados presentaron una muy buena reproducibilidad, con una incertidumbre entre el 1 y el 2%.

Tabla 6.18. Coeficientes de difusión de disoluciones acuosas de hidroxipropil- β -ciclodextrina, medidos con la técnica de Taylor, a 298,15 K y 310,15 K [12].

c /(mol·dm ⁻³)	Δc /(mol·dm ⁻³)	$D^a \pm S_D^b$ /(10 ⁻⁹ m ² ·s ⁻¹) (298,15 K) ^c	$D^a \pm S_D^b$ /(10 ⁻⁹ m ² ·s ⁻¹) (310,15 K)
0,002	0,002	0,319 ± 0,003	0,408 ± 0,006
0,004	0,004	0,316 ± 0,001	0,407 ± 0,003
0,005	0,004	0,314 ± 0,002	0,407 ± 0,003
0,008	0,004	0,310 ± 0,002	0,406 ± 0,002
0,010	0,008	0,307 ± 0,002	0,406 ± 0,004

^a Cada valor de D corresponde a una media de, al menos, 4 réplicas; ^b S_D representa la desviación estándar de la media; ^c referencia [11].

También en el caso de esta ciclodextrina sustituida, la disminución que experimenta su coeficiente de difusión con el aumento de la concentración es pequeño, siendo menor del 4% para la temperatura de 298,15 K e inapreciable (0,5%) a la temperatura de 310,15 K. Es decir, a ambas temperaturas, el efecto del aumento de viscosidad del medio provocado por una mayor presencia de soluto, parece verse ampliamente contrarrestado por una disminución de la estructura del disolvente provocada, posiblemente, por un efecto del soluto presente. Tal

situación se traduce en que la disminución en D sea mucho menos pronunciada de lo esperado bajo la sola consideración del efecto viscoso. Tal situación está más acentuada a la temperatura de 310,15 K, donde la disminución que debe producirse en la estructura del disolvente, tanto por el efecto térmico como por la acción de una posible mayor hidratación del soluto, compensa casi por completo el aumento de viscosidad del medio.

6.5.4.1. Influencia de la concentración sobre el coeficiente de difusión

De la aplicación de un ajuste lineal, por el método de mínimos cuadrados, del tipo $D = D^0 + a c$, a los datos de difusión de la HP- β -CD se obtuvo el valor correspondiente a su coeficiente de difusión en disolución acuosa, a concentración infinitesimal. En la Figura 6.16 se muestra esta dependencia y en la tabla 6.19 se recogen los valores de los parámetros del ajuste encontrados.

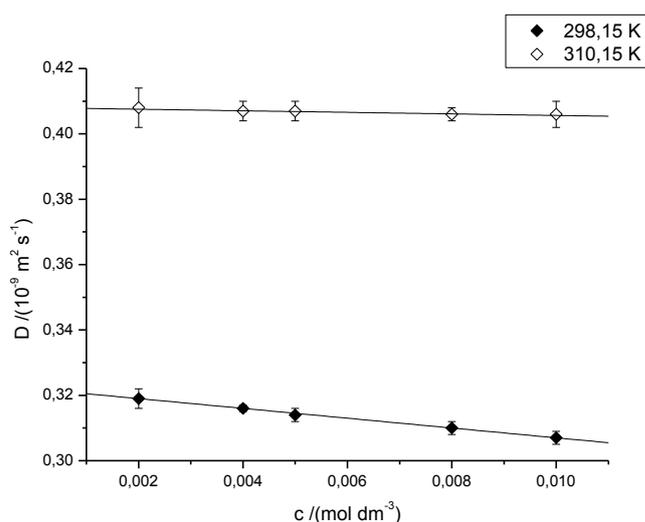


Figura 6.16: Variación con la concentración, del coeficiente de difusión de la hidroxipropil- β -ciclodextrina acuosa a diferentes temperaturas

Tabla 6.19. Parámetros del ajuste lineal de los coeficientes de difusión de HP- β -ciclodextrina con la concentración, a diferentes temperaturas

Temperatura / K	D^0 / (10 ⁻⁹ m ² ·s ⁻¹)	a / (dm ³ ·mol ⁻¹)	r^2
298,15	0,322	-1,50	0,999
310,15	0,408	-0,25	0,909

Los valores encontrados, $D^0 = 0,322 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ a 298,15 K y $D^0 = 0,408 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ a 310,15 K, están en buena concordancia con los esperados a tenor de los resultados anteriormente obtenidos para la β -CD. En efecto, por una parte se tiene que la HP- β -CD tiene mayor peso molecular, por lo que debe esperarse un valor de D para esta ciclodextrina sustituida inferior al de aquella; esto es, que ésta presente una menor movilidad. Por otra parte, puesto que las disoluciones acuosas de la ciclodextrina sustituida presentan una mayor viscosidad que las correspondientes a la ciclodextrina no sustituida, habrá una mayor resistencia a la difusión de la primera. Este efecto de aumento relativo de viscosidad, como se recordará, está mucho más acentuado a la temperatura de 310,15 K, lo que justifica el descenso tan pronunciado en el valor de D^0 encontrado (del orden de un 12%) a dicha temperatura. Este resultado parece venir a confirmar que debe haber una mayor presencia de moléculas de agua en la esfera de hidratación de la HP- β -CD a esta temperatura de 310,15 K, con el consiguiente aumento de volumen de la entidad cinética, que difundiría en un medio menos estructurado (por efecto de una mayor agitación térmica molecular) pero sin disponer en dicha estructura de los suficientes “huecos” del tamaño adecuado al volumen de la ciclodextrina sustituida e hidratada.

6.5.4.2. Influencia de la temperatura sobre el coeficiente de difusión

A través de la aplicación de la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación (6.1.2)), se estimaron los valores del radio hidrodinámico de la molécula de HP- β -CD acuosa, encontrando valores de $r(298,15 \text{ K}) = 0,76 \text{ nm}$ y $r(310,15 \text{ K}) = 0,80 \text{ nm}$, valores que son superiores a los obtenidos para la β -CD.

A partir de ellos, se calcularon los correspondientes a los volúmenes hidrodinámicos molares de estas sustancias en estos medios, obteniendo valores de $1115 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ a 298,15 K y de $1317 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ a 310,15 K. Como puede verse, estos valores son superiores a los calculados para la β -CD, en especial a la temperatura de 310,15 K, para la que las diferencias son muy importantes, en consonancia con la idea de la presencia de una mayor hidratación para estas moléculas en estas circunstancias.

6.6. Resumen

El estudio de las propiedades seleccionadas (densidad, viscosidad, y difusión), relativo a las disoluciones acuosas de β -CD y HP- β -CD, permitió verificar que estas dos ciclodextrinas

presentan un comportamiento diferente cuando se encuentran en estos medios acuosos, tal como cabría esperar en base a sus diferentes estructuras y pesos moleculares.

A ambas temperaturas se verificó que las disoluciones de HP- β -CD son más densas que las equivalentes de β -CD, presentando la primera de ellas, no obstante, un volumen molar parcial a concentración infinitesimal mucho más elevado; es decir, la aportación al volumen de la disolución que realiza un mol de HP- β -CD es mayor que la que realiza un mol de la β -CD. Este hecho, unido al signo positivo encontrado para la pendiente de la representación de ϕ_V con la concentración de HP- β -CD, sugiere que este soluto interacciona fuertemente con las moléculas de agua, incorporando un número relativamente importante de éstas a su esfera de hidratación.

En cuanto a las viscosidades, se comprobó que ambos compuestos presentan valores positivos y elevados del coeficiente B , tal como se esperaría para compuestos de elevado peso molecular. Esta circunstancia se ha relacionado con un carácter formador (“*structure making*”) de la estructura del agua. Dado que los valores de B encontrados para la HP- β -CD son superiores a los de β -CD, esto revela que la primera posee una mayor capacidad de interacción con el disolvente, lo que apoya la idea de una mayor hidratación de esta ciclodextrina sustituida. Para obtener confirmación respecto a esta hipótesis, se ha verificado el valor presentado por el cociente entre el valor del coeficiente B de la ecuación de Jones-Dole y el volumen molar aparente a concentración infinitesimal y se han obtenido valores similares para estos solutos a la temperatura estándar. A la temperatura fisiológica los valores de $B/\sqrt{V_2^0}$ encontrados para la HP- β -CD son superiores a los de β -CD.

No obstante lo anterior, el análisis de la variación dB/dT , arrojó valores positivos de este parámetro, en especial para la HP- β -CD. Tal resultado se identifica, habitualmente, con compuestos rompedores (“*structure breaking*”) de la estructura del agua, lo que está en oposición al resultado obtenido del análisis del coeficiente B . Esta contradicción ha de analizarse con prudencia. Por una parte, las teorías sobre carácter formador o rompedor de estructuras, están dirigidas hacia las disoluciones de electrólitos y las ciclodextrinas no lo son, aunque posean un momento dipolar permanente. Por otra parte, tal como postulan diversos especialistas en el estudio de las disoluciones de electrólitos, no existe una teoría definitiva que relacione de manera totalmente satisfactoria el coeficiente B de viscosidad y los efectos de los iones sobre la estructura del agua en la disolución.

Respecto a la difusión de estas especies en disolución acuosa se comprobó que los coeficientes de difusión siguen la tendencia ya observada en las otras propiedades estudiadas.

Es decir, la HP- β -CD es la que presenta un coeficiente de difusión más bajo, lo que es consistente, por una parte, con una mayor masa molecular y un mayor radio hidrodinámico y, por otra parte, con el hecho de que sus disoluciones son más viscosas, por lo que presentan una mayor resistencia al movimiento.

En cuanto al análisis de los valores encontrados para el coeficiente de difusión de ambas ciclodextrinas, se observa que éstos son pequeños y poco influenciados por el aumento de la concentración de la disolución, independientemente de cuál sea la temperatura que se considere. Este comportamiento sugiere que el gran tamaño de las moléculas de ambas ciclodextrinas y, en consecuencia, la necesidad de encontrar “huecos” en la estructura de la disolución que posean el tamaño adecuado, condiciona, principalmente, su difusión a través de la disolución, por encima de cualquiera otra circunstancia.

Los valores estimados para los radios hidrodinámicos, de acuerdo al modelo de Stokes-Einstein y los volúmenes hidrodinámicos calculados en base a aquellos, confirman un tamaño de la entidad cinética HP- β -CD-agua bastante superior al de la entidad β -CD-agua, en especial a la temperatura de 310,15 K, lo que refuerza la idea de una mayor hidratación de la ciclodextrina sustituida.

Referencias bibliográficas

- [1] Saltzman W. M., “*Drug Delivery- Engineering principles for drug therapy*”, Oxford University Press (2001).
- [2] Thomas G., “*Medicinal Chemistry: An introduction*”, 2nd Edition; Wiley-Interscience, (2007) 44-46.
- [3] Zhou H., “*Water insoluble drug formulation*”, CRC Press, chp. 5 (2008) 91-100.
- [4] Brewster M. E., Loftsson T., “*Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers*”, Adv. Drug Deliver. Rev., 59 (2007) 645–666.
- [5] Uekama K., Hirayama F., Irie T., “*Cyclodextrin Drug Carrier Systems*”, Chem. Rev., 98 (1998) 2045-2076.
- [6] Davis M. E., Brewster M. E., “*Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future*”, Nat. Rev. Drug Discov., 3 (2004) 1023-1035.
- [7] Loftsson T., Duchêne D., “*Cyclodextrins and their pharmaceutical applications*”, Int. J. Pharm., 329 (2007) 1–11.
- [8] Vyas A., Saraf S., “*Cyclodextrin based novel drug delivery systems*”, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem., 62 (2008) 23–42.
- [9] Li J., Loh X. J., “*Cyclodextrin-based supramolecular architectures: Syntheses, structures, and applications for drug and gene delivery*”, Adv. Drug Deliver. Rev., 60 (2008) 1000–1017.
- [10] Paduano L., Sartorio R., Vitagliano V., Costantino L., “*Diffusion properties of cyclodextrins in aqueous solution at 25° C*”, J. Solution Chem., 19 (1990) 31-39.
- [11] Ribeiro A. C. F., Leaist D. G., Lobo V. M. M.; Estes M. A., Valente A. J. M., Santos C. I. A. V.; Cabral A. M. T. D. P. V., Veiga F. J. B., “*Binary mutual diffusion coefficients of aqueous solutions of β -cyclodextrin at temperatures from 298.15 K to 312.15 K*”, J. Chem. Eng. Data, 51 (2006) 1368-1371.
- [12] Ribeiro A. C. F., Valente A. J. M., Santos C. I. A. V., Prazeres P. M. R. A., Lobo V. M. M., Burrows H. D., Estes M. A., Cabral A. M. T. D. P. V., Veiga F. J. B., “*Binary mutual diffusion coefficients of aqueous solutions of α -cyclodextrin, 2-hydroxypropyl- α -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin at temperatures from 298.15 to 312.15 K*”, J. Chem. Eng. Data, 52 (2007) 586-590.

- [13] Leaist D. G., Hui L., “*Intradiffusion coefficients and integral mutual diffusion coefficients of dilute associating solutes are identical. Caffeine in water*”, J. Phys. Chem., 94 (1990) 8741-8744.
- [14] Cesaro A., Russo E., Crescenzi V., “*Thermodynamics of caffeine aqueous solutions*”, J. Phys. Chem., 80 (1976) 335-339.
- [15] Sinha B., Roy P. K., Sarkar B. K., Brahman D., Roy M. N., “*Apparent molar volumes and viscosity B-coefficients of caffeine in aqueous thorium nitrate solutions at T = (298.15, 308.15 and 318.15) K*”, J. Chem. Therm., 42 (2010) 380-386.
- [16] Ribeiro A. C. F., Barros M. C. F., Lobo V. M. M., Quintanilla G., Estesó M. A., “*Diffusion coefficients of the ternary system calcium chloride -caffeine-water at 25 °C and 37 °C*”, J. Chem. Eng. Data, 55 (2) (2010) 897-900.
- [17] Ribeiro A. C. F., Simões S. M. N., Lobo V. M. M., Cabral A. M. T. D. P. V., Veiga F. J. B., Estesó M. A., “*Diffusion coefficients of copper chloride plus theophylline plus water at temperatures of (298 and 310) K*”, J. Chem. Eng. Data, 55 (6) (2010) 2192-2194.
- [18] Stevens G., “*Diuretics: Chemistry and Pharmacology*”, Academic Press, New York (1963).
- [19] Masson D. O., “*Solute molecular volumes in relation to solvation and ionization*”, Phil. Mag., 8 (7) (1929) 218-235.
- [20] Spiro M., Grandoso D. M., Price W. E., “*Protonation constant of caffeine in aqueous solution*”, J. Chem. Soc. Faraday Trans. I, 85 (12) (1989) 4259-4267.
- [21] Falk M., Gil M., Iza N. “*Self-association of caffeine in aqueous solution: an FT-IR study*”, Can. J. Chem., 68 (1990) 1293-1299.
- [22] Franks F., Smith H. T., “*Volumetric properties of alcohols in dilute aqueous solutions*”, Trans. Faraday Soc., 64 (1968) 2962-2972.
- [23] Franks F., Smith H. T., “*Precision densities of dilute aqueous solutions of the isomeric butanols*”, J. Chem. Eng. Data, 13 (1968) 538-541.
- [24] Franks F., Desnoyers J. E., in “*Water Science Review*”, Eds. Cambridge Univ. Press, (1985) 171-232.
- [25] Frank H. S., Evans M. W., “*Free volume and entropy in condensed systems. III. Entropy in binary liquid mixtures; partial molal entropy in dilute solutions; structure and thermodynamics in aqueous electrolytes*”, J. Chem. Phys., 13 (1945) 507-532.

- [26] Keronei P. K., “*Intermolecular Interactions in Aqueous Binary Mixtures of Non-electrolytes*”. Thesis, University of Auckland, New Zealand, (1995).
- [27] Franks F., Reid D. S., en “*Water: A Comprehensive Treatise*”, Vol. 2. Franks F., Ed. Plenum Press, New York (1973) 330-374.
- [28] Jones G., Dole M., “*The viscosity of aqueous solutions of strong electrolytes with special reference to barium chloride*”, J. Am. Chem. Soc., 51 (1929) 2950–2964.
- [29] Price W. E., Trickett K. A., Harris K. R., “*Association of caffeine in aqueous solution. Effects on caffeine intradiffusion*”, J. Chem. Soc. Faraday Trans. I, 85 (1989) 3281-3288.
- [30] Nightingale E. R., en “*Chemical Physics of electrolyte solutions*”, Conway B. E., Barradas R. G., Eds., Wiley, New York, (1966) 87.
- [31] Marcus Y., “*Effect of ions on the structure of water: Structure making and breaking*”, Chem. Rev., 109 (2009) 1346-1370.
- [32] Zhao H., “*Viscosity B-coefficients and standard partial molar volumes of amino acids, and their roles in interpreting the protein (enzyme) stabilization*”, Biophys. Chem., 122 (2006) 157–183.
- [33] Thompson P. T., Fisher B., Wood R. H., “*Viscosities of Solutions of Electrolytes and Non-Electrolytes in Ethylene Carbonate at 40° C*”, J. Sol. Chem., 11 (1) (1982) 1-15.
- [34] Einstein A., “*On the movement of small particles suspended in a stationary liquid demanded by the molecular kinetic theory of heat*”, Ann. Phys., 17 (1905) 549-560.
- [35] Einstein A., “*On the theory of the brownian movement.*”, Ann. Phys., 19 (1906) 371-381.
- [36] Einstein A., “*A new determination of molecular dimensions.*”, Ann. Phys., 19 (1906) 289-306; Corrections Ann.d.Phys., 34 (1911) 591-592 .
- [37] Einstein A., “*Theoretical observations on the Brownian motion.*”, Zeit. Elektrochemie, 13 (1907) 41-42.
- [38] Einstein A., “*The elementary theory of the Brownian motion.*”, Zeit. .Elektrochemie, 14 (1908) 235-239.
- [39] Sutherland W., “*Dynamical theory of diffusion for non-electrolytes and the molecular mass of albumin*”, Phil. Mag., 9 (1905) 781-785.
- [40] Erdey-Gruz T., “*Transport phenomena in aqueous solutions*”, 2nd Ed. Adam Hilger. London (1974).

- [41] Swindells J. F., Coe J. R., Godfrey T. B., “*Absolute viscosity of water at 20°C*”, J. Res. Nat. Bur. Stand., 48 (1952) 1-31.
- [42] Coe J. R., Godfrey T. B., “*Viscosity of water*”, J. Appl. Phys., 15 (1944) 625- 626.
- [43] Weber W., “*Die temperatur abhängigheit der Viskosität der Wassers zwischen 0 and 40 C*”, Z. Angew. Phys., 7 (1955) 96 in “*CRC Handbook of Chemistry and Physics*”, 69th Edition, CRC Press (1988-1989).
- [44] Nishijo J., Yonetani I., Tagahara K., Suzuta Y., Iwamoto E., “*Influence of temperatura and ionization on self association of theophylline in aqueous solution. Studies by ¹-HRMN*”, Chem. Pharm. Bull., 34 (11) (1986) 4451-4456.
- [45] Bender M. L., Komiyama M., “*Cyclodextrin chemistry*”, Springer-Verlag, Berlin (1978).
- [46] Szejtli J., “*Cyclodextrins and their inclusion complexes*”, Akademiai Kiado, Budapest (1982).
- [47] Milioto S., Bakshi M. S., Crisantino R., De Lisi R., “*Thermodynamic properties of water- β -cyclodextrin-dodecylsurfactant ternary systems*”, J. Sol. Chem., 24 (2) (1995) 103-120.
- [48] Redlich O., “*Molar volumes of solute IV*”, J. Phys. Chem., 44 (5) (1940) 619-629.
- [49] Stezowski J. J., Jogun K. H., Eckle E., Bartels K., “*Dimeric β -cyclodextrin complexes may mimic membrane diffusion transport*”, Nature, 274 (1978) 617-619.
- [50] Miyajima K., Sawada M., Nakagaki M., “*Viscosity B-coefficients, apparent molar volumes, and activity coefficients for α - and γ -cyclodextrins in aqueous solutions*”, Bull. Chem. Soc. Jpn., 56 (1983) 3556-3560.
- [51] Thomas D. G., “*Transport characteristics of suspension: VIII. A note on the viscosity of newtonian suspensions of uniform spherical particles*”, J. Colloid Sci., 20 (1965) 267-277.
- [52] Donald H., Jenkins B., Marcus Y., “*Viscosity B-coefficients of ions in solution*”, Chem. Rev., 95 (8) (1995) 2695-2724.
- [53] Castronuovo G., Niccoli M., “*The influence of cosolvents on hydrophilic and hydrophobic interactions. Calorimetric studies of parent and alkylated cyclomaltooligosaccharides in concentrated aqueous solutions of ethanol or urea*”, Carbohydrate Research, 343 (16) (2008) 2771–2775.
- [54] Glasstone S., Laidler K. J., Eyring H., “*Theory of Rate Processes*”, McGraw-Hill, New York, (1941) Chp. 9.
- [55] Longworth. L. G., “*Temperature dependence of diffusion in aqueous solutions*”, J. Phys. Chem., 58 (1954) 770-773.

- [56] Evans D. F., Tominaga T., Chan C., “*Diffusion of symmetrical and spherical solutes in protic, aprotic and hydrocarbon solvents*”, J. Sol. Chem., 8 (1979) 461-478.

Capítulo 7

Influencia de las ciclodextrinas en las propiedades fisicoquímicas de las metilxantinas en disolución acuosa

La complejación de fármacos con solutos macromoleculares, con el objeto de obtener su eficacia terapéutica óptima, es un tema que ha sido ampliamente investigado. Sin embargo, aunque es bien conocido que, en general, el uso de ciclodextrinas para llevar a efecto dicha complejación permite modificar las propiedades físico-químicas de un fármaco, proporcionando el aumento de su solubilidad y biodisponibilidad, muy pocos estudios realizados hasta el momento han tratado de caracterizar de qué manera ocurre ese cambio. Dado que las metilxantinas, que son objeto de este estudio de Tesis Doctoral, la cafeína y la teofilina, poseen una baja solubilidad en agua, es importante saber de qué manera ocurre la modulación de las propiedades de sus disoluciones acuosas en presencia de las ciclodextrinas y así determinar si éstas podrán tener interés para el desarrollo de un sistema de liberación controlada de estos fármacos.

El objetivo buscado a través de la obtención de los datos experimentales que se presentan en este capítulo, es estudiar el efecto de la adición de β -ciclodextrina (β -CD) y de hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) sobre las propiedades de las disoluciones acuosas de cafeína y teofilina. La formación de complejos entre las ciclodextrinas y las metilxantinas ha sido estudiada utilizando diferentes técnicas experimentales [1-7]. Sin embargo, estos estudios se han realizado a temperaturas distintas de la fisiológica, por lo que sigue faltando información respecto al comportamiento de estos sistemas a esa temperatura, que es de fundamental importancia debido, principalmente, a las muchas aplicaciones farmacéuticas de estos compuestos. En la tabla 7.1 se presenta una recopilación de valores de las constantes de equilibrio para complejos de inclusión 1:1 (ciclodextrina/molécula huésped) recogidas en la literatura científica.

Observando la tabla 7.1 se aprecia fácilmente, en primer lugar, que los diferentes datos obtenidos por los distintos autores para estas constantes de estabilidad, en bastantes ocasiones son contradictorios. En efecto, dependiendo del método experimental utilizado y del medio acuoso empleado, los valores reportados para estas constantes de estabilidad son bastante diferentes entre sí. Como una posible justificación a estas marcadas discrepancias, puede esgrimirse el hecho de que las condiciones de medida en cada caso son, también, bastante diferentes. Y así, mientras que un ensayo de solubilidad se realiza en disolución saturada del fármaco, obteniéndose una variación de la solubilidad de este último frente a la adición de la ciclodextrina, las medidas espectroscópicas se realizan en disoluciones poco concentradas. Es, quizás, por estas circunstancias que los resultados obtenidos presentan discrepancias tan marcadas.

Tabla 7.1: Datos publicados acerca de las constantes de estabilidad de complejos de cafeína y teofilina con ciclodextrinas (CD).

Complejo	Log K	Entorno experimental		Método	Referencia
		T/K	Medio acuoso		
β -CD-cafeína	2,23	293	Tampón Britton-Robinson	Fluorimetría	1
	1,48	298	Agua	Calorimetría Solubilidad	2, 3
HP- β -CD-cafeína	2,60	293	Tampón Britton-Robinson	Fluorimetría	1
	2,85	303	Tampón fosfato (pH=7,4)	Solubilidad	4
	2,46	298	-	Fluorescencia	5
	-	298	Agua	UV + Ensayos Solubilidad	3
β -CD-teofilina	0,21	293	Agua	Solubilidad	6
	2,11	293	Tampón Britton-Robinson	Fluorimetría	1
	0,26	298	Agua	Solubilidad	7
HP- β -CD-teofilina	2,37	293	Tampón Britton-Robinson	Fluorimetría	1
	-	298	Agua	Solubilidad	7

Es un hecho aceptado que, en disolución acuosa, las moléculas de ciclodextrina forman complejos de inclusión, en los que las moléculas de agua situadas en el interior de la cavidad central hidrofóbica se sustituyen por una molécula huésped (o por una parte de dicha molécula) que posee carácter hidrofóbico, como es el caso de una molécula de un fármaco.

Por otra parte, se acepta también que los grupos hidroxilo situados en la superficie exterior de la molécula de ciclodextrina poseen capacidad para formar enlaces, bien con otras moléculas o bien con la propia molécula de ciclodextrina. Loftsson *et al.* [8, 9] han propuesto que, en disoluciones acuosas saturadas, pueden coexistir complejos ciclodextrina/molécula huésped de inclusión y de no inclusión, para explicar por qué el valor de la constante de equilibrio de formación de estos complejos es, en ocasiones, dependiente de la concentración y por qué su valor numérico es, con frecuencia, también dependiente del método aplicado. Sobre la base de las consideraciones anteriores se puede encontrar justificación a las enormes discrepancias que aparecen entre los diferentes datos que se presentan en la tabla 7.1.

De la observación de la tabla 7.1 se desprende, también, que la mayor parte de las investigaciones realizadas acerca de la formación de complejos de inclusión de ciclodextrinas con estas metilxantinas (cafeína y teofilina), se ha realizado a la temperatura estándar (298,15 K), siendo muy pocas las medidas realizadas a temperaturas diferentes. Esta misma tendencia aparece cuando se observan los datos recogidos de la bibliografía acerca de otros sistemas ciclodextrina/fármaco estudiados. Aunque es de esperar que a una temperatura más elevada las interacciones entre las moléculas sean más débiles y eso se refleje en las constantes de estabilidad de los complejos, es importante conocer y constatar si, no obstante, a la temperatura fisiológica ocurre formación de complejos y cuál es la influencia del entorno experimental (temperatura, disolvente, presencia de otros compuestos en la disolución) en esta formación de complejos. Además, es igualmente importante conocer si la variación de la temperatura produce el mismo efecto sobre la asociación cuando se manejan diferentes ciclodextrinas.

En ese sentido, en este trabajo de Tesis Doctoral se aborda este tema utilizando técnicas menos habituales a las hasta ahora usadas, recurriendo a analizar la variación de algunas propiedades termodinámicas y de transporte de disoluciones acuosas que incluyen estas sustancias para, a partir de dicha variación, explicar las posibles interacciones que ocurren entre las ciclodextrinas y las moléculas de fármaco. Las propiedades seleccionadas han sido: densidad, volumen molar aparente, viscosidad y difusión mutua. Las medidas se han realizado sobre disoluciones acuosas de las metilxantinas, cafeína y teofilina (en un rango de concentraciones de la metilxantina comprendido entre 0,5 y 10 mM), en presencia de β -CD y HP- β -CD (a una concentración siempre constante de cada una de estas ciclodextrinas). Las medidas se llevaron a efecto a las temperaturas de 298,15 y 310,15 K.

7.1. Caracterización de las interacciones entre las ciclodextrinas y la cafeína en disolución acuosa

Como se ha indicado en un capítulo precedente de esta Memoria de Tesis Doctoral, la caracterización de las interacciones entre solutos en disolución acuosa, a nivel molecular, se puede llevar a efecto con buena precisión, a través del análisis de propiedades tales como el volumen molar parcial aparente. De hecho, a través de esta propiedad termodinámica, se puede obtener una información muy valiosa sobre las interacciones que tienen lugar tanto entre solutos en disolución, como entre un soluto y el disolvente, al tiempo que analizar cómo se alteran las interacciones de un soluto con el disolvente cuando se cambian las características físico-químicas de dicho disolvente.

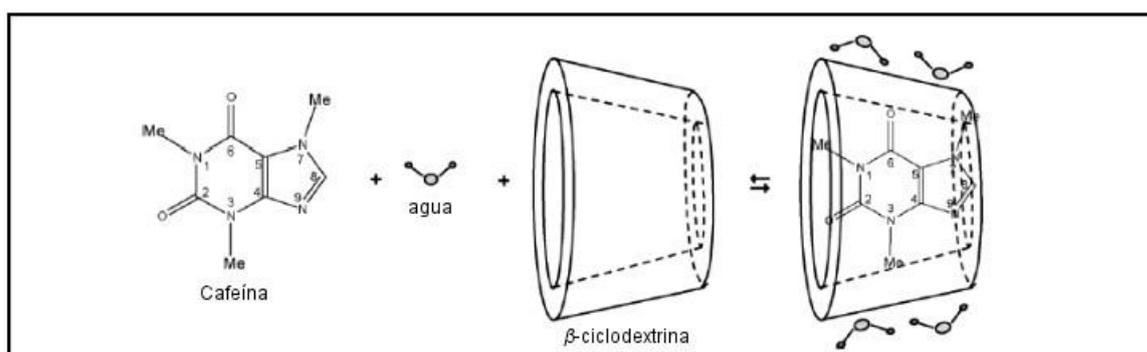
Pero también a través del estudio y análisis de propiedades de transporte, tales como la viscosidad y el coeficiente de difusión, es posible obtener una buena perspectiva del tipo de interacciones que ocurren en la disolución acuosa y de cómo éstas van cambiando en función de las variaciones inducidas en la disolución.

Asumiendo que se puede formar un complejo del tipo 1:1 entre una molécula de ciclodextrina y una molécula de cafeína y que dicha formación es el resultado de una interacción que se puede representar a través del esquema de la figura 7.1, el proceso de asociación viene dado por



donde CD representa a la ciclodextrina, Caf a la cafeína y K es la correspondiente constante de equilibrio.

Figura 7.1. Representación esquemática de la posible interacción entre una molécula de cafeína y una molécula de β -ciclodextrina (β -CD) en medio acuoso [10]



La cuantificación del orden de esta asociación, sea o no de inclusión, puede realizarse a través de la obtención de los valores de estas constantes de equilibrio de asociación, que dan origen a la formación del complejo, y del análisis de la variación de estos valores en función de los cambios en las características del medio en el que se produce la formación de dicha estructura compleja. Asimismo, dado que la formación de complejos en la disolución acuosa, a consecuencia de la asociación de moléculas de los solutos, se refleja en las propiedades fisicoquímicas de la disolución, el análisis de los cambios que ocurren en los valores de estas propiedades fisicoquímicas constituye un camino alternativo para la pretendida cuantificación del fenómeno de formación del complejo que se pretende estudiar.

7.1.1. Volúmenes molares aparentes

En un sistema multicomponente, los valores de sus propiedades fisicoquímicas vienen determinadas por los de las propiedades molares parciales aparentes de cada uno de los componentes de la mezcla. Así, en un sistema compuesto por una mezcla de componentes, y de acuerdo al modelo aplicado por Terekhova *et al.* [11-12] a sistemas similares, y anteriormente descrito en el capítulo 2, para un modelo de complejo 1:1 formado entre la ciclodextrina y la cafeína, el volumen molar aparente, ϕ_V , que se determina experimentalmente para la disolución, puede ser expresado en función de los volúmenes de todas las especies libres y asociadas presentes en el sistema, según la ecuación (2.2.7) del capítulo 2

$$\phi_V = \frac{\phi_{V,f} + K\phi_{V,c}m}{1 + Km}$$

donde $\phi_{V,f}$ y $\phi_{V,c}$ son, respectivamente, los volúmenes molares aparentes de las especies libres y totalmente asociadas, K la constante del equilibrio de complejación y m la concentración total de la especie. Las contribuciones correspondientes a la protonación y a la ionización de las moléculas de cafeína no se han tenido en cuenta para dicho volumen.

Con el fin de poder realizar la estimación de los valores de la constante de equilibrio, K , a partir de los volúmenes molares aparentes de las especies en disolución acuosa, se llevaron a cabo medidas de la densidad de disoluciones acuosas de cafeína en presencia de una concentración constante de la ciclodextrina. El cálculo de los correspondientes volúmenes molares aparentes se realizó mediante la ecuación (2.1.8) (capítulo 2), considerando como un disolvente mixto a la mezcla agua + ciclodextrina. Los valores de este parámetro

proporcionan información respecto a las interacciones entre soluto y disolvente. En las tablas 7.2 y 7.3 se presentan, respectivamente, los resultados correspondientes a la cafeína en presencia de β -CD y de HP- β -CD, en condiciones experimentales análogas. Los valores encontrados para la desviación estándar de las medidas de densidad son inferiores, en todos los casos, a $4,5 \times 10^{-6}$, por lo que la incertidumbre asociada al cálculo de los volúmenes molares aparentes es siempre inferior al 4%.

Tabla 7.2. Densidades, ρ , y volúmenes molares aparentes, ϕ_V , para las disoluciones acuosas de cafeína en presencia de β -ciclodextrina, a 298,15 K y 310,15 K

		T= 298,15 K		T= 310,15 K	
$10^3 m_{\beta\text{-CD}}$	$10^3 m_{\text{cafeína}}$	ρ	ϕ_V	ρ	ϕ_V
/(mol kg ⁻¹)	/(mol kg ⁻¹)	/(g cm ⁻³)	/(cm ³ mol ⁻¹)	/(g cm ⁻³)	/(cm ³ mol ⁻¹)
0,465996	5,05840	0,997272	150,3 ₄	0,993547	168,1 ₃
0,465996	1,01168	0,997298	146,44	0,993576	152,58
0,465996	4,04672	0,997457	143,14	0,993738	144,19
0,465996	8,06119	0,997657	143,88	0,993928	145,80
0,465996	10,1168	0,997780	141,92	0,994027	145,99
0,931992	5,05840	0,997471	147,01	0,993743	162,82
0,931992	1,01168	0,997498	144,72	0,993772	150,15
0,931992	4,04672	0,997659	141,99	0,993950	139,61
0,931992	8,09343	0,997878	141,17	0,994152	142,18
0,931992	10,1168	0,998000	139,69	0,994258	142,13
3,70056	5,05840	0,998655	141,49	0,994898	150,64
3,70056	1,01168	0,998689	135,16	0,994926	145,15
3,70056	4,04672	0,998878	132,55	0,995103	138,32
3,70056	8,09343	0,999119	133,67	0,995317	140,05
3,70056	10,1168	0,999228	134,94	0,995435	139,27
7,26405	5,05840	1,00018 ₀	131,58	0,996380	142,71
7,26405	1,01168	1,00021 ₀	133,15	0,996409	140,25
7,26405	4,04672	1,00040 ₁	131,73	0,996589	136,45
7,26405	8,09343	1,00063 ₅	133,93	0,996802	139,14
7,26405	10,1168	1,00077 ₂	132,38	0,996928	137,68
9,18286	5,05840	1,00100 ₃	121,77	0,997179	137,70
9,18286	1,01168	1,00103 ₉	122,17	0,997211	134,07
9,18286	4,04672	1,00123 ₈	126,93	0,997400	132,61
9,18286	8,09343	1,00148 ₅	129,99	0,997641	133,77
9,18286	10,1168	1,00160 ₉	130,47	0,997760	134,05

Tabla 7.3. Densidades, ρ , y volúmenes molares aparentes, ϕ_V , para las disoluciones acuosas de cafeína en presencia de hidroxipropil- β -ciclodextrina, a 298,15 K y 310,15 K

		T= 298,15 K		T= 310,15 K	
$10^3 m_{\text{MHP-}\beta\text{-CD}}$	$10^3 m_{\text{cafeína}}$	ρ	ϕ_V	ρ	ϕ_V
/(mol kg ⁻¹)	/(mol kg ⁻¹)	/(g cm ⁻³)	/(cm ³ mol ⁻¹)	/(g cm ⁻³)	/(cm ³ mol ⁻¹)
0,417997	0,505840	0,997297	137,16	0,993559	160,48
0,417997	1,01168	0,997319	144,27	0,993586	150,52
0,417997	4,04672	0,997472	143,97	0,993737	146,39
0,417997	8,09343	0,997675	144,13	0,993938	145,72
0,417997	10,1168	0,997772	144,60	0,994030	146,43
0,835994	0,505840	0,997509	141,60	0,993768	155,93
0,835994	1,01168	0,997534	143,90	0,993791	152,98
0,835994	4,04672	0,997681	145,35	0,993941	147,06
0,835994	8,09343	0,997880	145,23	0,994134	147,09
0,835994	1,01168	0,997989	144,25	0,994249	145,20
3,34398	0,505840	0,998782	143,79	0,995012	152,67
3,34398	1,01168	0,998803	147,41	0,995038	148,64
3,34398	4,04672	0,998951	145,98	0,995183	147,33
3,34398	8,09343	0,999144	146,36	0,995378	146,85
3,34398	1,01168	0,999255	144,91	0,995492	145,13
6,68795	0,505840	1,00047 ₈	145,71	0,996671	149,53
6,68795	1,01168	1,00050 ₂	146,79	0,996697	145,91
6,68795	4,04672	1,00064 ₆	146,65	0,996844	146,11
6,68795	8,09343	1,00083 ₈	146,66	0,997042	145,81
6,68795	1,01168	1,00095 ₀	145,04	0,997147	145,12
8,35994	0,505840	1,00132 ₅	150,31	0,997502	144,59
8,35994	1,01168	1,00135 ₁	146,49	0,997528	143,80
8,35994	4,04672	1,00149 ₃	146,97	0,997677	144,83
8,35994	8,09343	1,00168 ₈	146,42	0,997875	145,17
8,35994	1,01168	1,00179 ₇	145,17	0,997979	144,76

Para la cafeína en presencia de ambas ciclodextrinas, los valores que se han encontrado para ϕ_V son positivos y elevados y, en general, superiores a los que la cafeína pura presenta en disolución acuosa, a excepción de las mezclas ternarias de cafeína con β -CD a las concentraciones más elevadas, principalmente para la concentración de β -CD 10 mM. Respecto a los cambios con la temperatura, se observa que el aumento de la temperatura incrementa los valores de los volúmenes molares aparentes, aunque ese incremento ocurre de

manera distinta dependiendo de la naturaleza de la ciclodextrina presente en la disolución, lo que indica la existencia de tipos de interacciones diferentes, en disolución acuosa.

Este comportamiento puede justificarse teniendo en cuenta que las moléculas de ciclodextrina, debido a su cavidad hidrofóbica, ofrecen a la molécula huésped (cafeína) un entorno adecuado para que se produzca interacción y se formen complejos de inclusión. Además de esto, hay que considerar también que el exterior de ambas ciclodextrinas es compatible con el agua y permite que ocurran interacciones cohesivas con ella por puentes de hidrógeno. Tales sucesos disminuyen la posibilidad de que se produzca la auto-asociación entre las moléculas de cafeína y potencian el predominio de las interacciones entre ésta y el co-disolvente (la ciclodextrina), conduciendo a una disminución del volumen neto de la disolución.

Este efecto se acentúa con la mayor presencia de ciclodextrina en el medio. Cuando aumenta la temperatura, los huecos en el entorno ordenado del disolvente aumentan su tamaño, dando como resultado un mejor ajuste de los complejos estructurados de los solutos en el seno del disolvente y, en consecuencia, produciendo una disminución relativa de la contribución predominantemente hidrofóbica cafeína-ciclodextrina en beneficio de la interacción hidrofílica cafeína-agua, con el consiguiente aumento significativo del volumen molar aparente de la cafeína con la temperatura.

La aplicación de la ecuación (2.1.10) (capítulo 2) permite obtener, además, los valores de estos volúmenes molares aparentes (volúmenes molares parciales) a concentración infinitesimal, ϕ_V^0 . Estos valores se presentan en la tabla 7.4. De la comparación entre estos valores, a concentración infinitesimal, en agua + ciclodextrina y los correspondientes a los que la cafeína presenta en agua, se calculan los valores correspondientes a sus volúmenes molares parciales de transferencia [13], según la ecuación (2.2.3) (capítulo 2), aplicada al caso estudiado

$$\Delta\phi_V^0 = [\phi_V^0(CD_{acuosa}) - \phi_V^0(agua)] \quad (7.1.2)$$

En la tabla 7.4 se presentan los valores calculados para estos volúmenes molares parciales de la transferencia de la cafeína desde agua hasta el disolvente mixto con presencia de las diferentes ciclodextrinas estudiadas, a 298,15 K y 310,15 K. Dado que a concentración infinitesimal no tienen lugar interacciones entre las moléculas de los solutos, los volúmenes de transferencia observados son el resultado, tan solo, de las interacciones existentes entre moléculas de soluto y moléculas del disolvente.

Tabla 7.4. Volúmenes molares parciales a concentración infinitesimal, ϕ_V^0 , y volúmenes molares parciales de transferencia, $\Delta\phi_V^0$, para disoluciones acuosas de cafeína en presencia de ciclodextrinas, a 298,15 K y 310,15 K.

$10^3 m_{\beta-CD}$ /(mol kg ⁻¹)	ϕ_V^0 /(cm ³ mol ⁻¹)	$\Delta\phi_V^0$ /(cm ³ mol ⁻¹)	$10^3 m_{HP-\beta-CD}$ /(mol kg ⁻¹)	ϕ_V^0 /(cm ³ mol ⁻¹)	$\Delta\phi_V^0$ /(cm ³ mol ⁻¹)
T = 298,15 K					
0,000000	143,5 (± 0,6)				
0,465996	150,4 (± 1,8)	6,95	0,417997	139,1 (± 2,8)	-4,40
0,931992	148,0 (± 0,8)	4,51	0,835994	142,2 (± 1,3)	-1,30
3,70056	139,5 (± 3,1)	-3,98	3,34398	145,5 (± 1,6)	2,04
7,26405	131,9 (± 1,6)	-11,60	6,68795	146,6 (± 0,8)	3,07
9,18286	118,9 (± 0,5)	-24,62	8,35994	149,7 (± 1,5)	6,21
T = 310,15 K					
0,000000	148,5 (± 0,6)				
0,465996	165,3 (± 7,1)	16,83	0,417997	158,9 (± 4,2)	10,44
0,931992	161,1 (± 6,5)	12,60	0,835994	157,4 (± 1,7)	8,92
3,70056	150,5 (± 3,2)	2,02	3,34398	152,6 (± 1,5)	4,16
7,26405	142,3 (± 2,0)	-6,18	6,68795	148,8 (± 1,4)	0,30
9,18286	136,4 (± 1,8)	-12,04	8,35994	144,0 (± 0,4)	-4,46

Los valores que aparecen entre paréntesis corresponden a las desviaciones estándar

Se observa que en presencia de $\beta-CD$ los valores de $\Delta\phi_V^0$ son positivos a bajas concentraciones de la ciclodextrina y que estos valores van decreciendo con el aumento de la concentración de la ciclodextrina hasta tornarse negativos, a ambas temperaturas. Por el contrario, en presencia de $HP-\beta-CD$, este mismo comportamiento solo se presenta en la temperatura mayor (310,15 K), observándose que a 298,15 K los valores de $\Delta\phi_V^0$ exhiben un comportamiento opuesto.

Como ya se indicó con anterioridad, la disminución de volumen de la disolución como consecuencia, principalmente, de la formación de los complejos de inclusión cafeína-ciclodextrina, se acentúa a medida que aumenta la presencia de ésta última, lo que hace que los valores de $\Delta\phi_V^0$ lleguen a tornarse negativos con el aumento en el medio de la concentración de la ciclodextrina.

El comportamiento opuesto que se observa, a 298,15 K, para la cafeína en presencia de HP- β -CD, indica que el efecto de disminución del volumen de la disolución como consecuencia, principalmente, de la formación de complejos de inclusión comentada en el párrafo anterior, no es suficiente para contrarrestar el pronunciado aumento de volumen derivado de la gran afinidad de la HP- β -CD hacia las moléculas de agua (analizado en el capítulo precedente). En consecuencia, el aumento de la concentración de esta ciclodextrina en el medio, contribuye a que el desequilibrio se acentúe con el consiguiente aumento progresivo del volumen de la disolución y, por ende, del volumen molar aparente de la cafeína en la mezcla agua + HP- β -CD. El aumento de temperatura hasta los 310,15 K, como se vio entonces, produce un efecto amortiguador importante en el aumento del volumen de la disolución, a consecuencia de la hidratación de la HP- β -CD, provocando que comience a prevalecer el efecto de disminución de volumen derivado de la formación del complejo de inclusión y, consecuentemente, que se observe una disminución del volumen molar aparente de la cafeína en esta mezcla, con la concentración del co-disolvente (HP- β -CD).

Los cambios de volumen que sufre un soluto cuando es transferido desde el agua a un disolvente mixto, pueden explicarse recurriendo al modelo de superposición de esferas de hidratación desarrollado por Friedman y Krishnan [14]. Según este modelo, la superposición de las esferas de hidratación de dos solutos presentes en una disolución produce un efecto de destrucción parcial de estas esferas de hidratación. Cuando se superponen las esferas de hidratación de dos especies iónicas, esta destrucción parcial de las esferas da como resultado un aumento neto del volumen de la disolución. Por el contrario, cuando se produce el solapamiento de esferas de hidratación de dos grupos hidrófobos, o bien de un grupo hidrófobo y un grupo iónico, la destrucción que se produce en las esferas de hidratación de los solutos lleva a una disminución neta del volumen de la disolución.

Si se analiza el tipo de interacciones que pueden ocurrir entre las moléculas de cafeína y las moléculas de ciclodextrina en disolución acuosa, éstas se pueden clasificar en los cuatro grupos siguientes [15]:

- 1- Interacciones de tipo hidrofílico-iónico, que se producen entre los grupos OH superficiales de la molécula de ciclodextrina y grupos de la molécula de cafeína (C=O ó N) sobre los que reside una cierta densidad de carga eléctrica;
- 2- Interacciones de tipo hidrofílico-hidrofílico, que se originan entre los grupos OH superficiales de la molécula de ciclodextrina y el grupo C=O de la molécula de cafeína, por medio de puentes de hidrógeno;

3- Interacciones de tipo hidrofílico-hidrofóbico, que aparecen entre grupos OH de la superficie de la molécula de ciclodextrina y los grupos apolares ($-\text{CH}_3$) de la molécula de cafeína;

4- Interacciones de tipo hidrofóbico-hidrofóbico, que tienen lugar entre grupos apolares de la molécula de ciclodextrina ($-\text{CH}_2-$) y grupos apolares ($-\text{CH}_3$) de la molécula de cafeína;

Las interacciones del tipo 1 provocan un aumento del volumen de transferencia como consecuencia de la superposición de la esfera de hidratación de la parte iónica de la cafeína (grupos CO^- y N^+) y de un grupo hidrofílico OH de la ciclodextrina, que lleva, por una parte, a una disminución en la tendencia desorganizadora de esta zona con estructura tipo ión y, por otra parte, a una disminución del efecto de electrostricción sobre las moléculas de agua, causada por esta zona iónica. La interacción del tipo 2 también produce un aumento del volumen de transferencia, puesto que la formación de los puentes de hidrógeno provoca un importante efecto estructurador del disolvente que predomina sobre el posible de destrucción parcial de las esferas de hidratación de los grupos involucrados. Por el contrario, las interacciones de los tipos 3 y 4 llevan a una disminución en el volumen de transferencia, como resultado de la superposición de sus esferas de hidratación.

Los volúmenes cada vez más negativos que se observan en la tabla 7.4, sugieren que en estas disoluciones pseudo-binarias (soluto + disolvente mixto agua-ciclodextrina) las interacciones del tipo 3, hidrofílico-hidrofóbico, y/o las del tipo 4, producidas entre grupos hidrofóbicos del soluto y del co-disolvente, predominan sobre las del tipo 1, hidrofílico-iónico, y/o del tipo 2, entre grupos hidrofílicos. Únicamente en el caso de la cafeína en presencia de HP- β -CD, a 298,15 K, parece existir un predominio de las interacciones del tipo 1 y 2, ya que con el aumento de la concentración de la ciclodextrina en la disolución, el volumen de la disolución se va tornando cada vez más positivo.

De hecho, se cree que la contribución más importante en el proceso de complejación con las ciclodextrinas [16] procede de la penetración de la porción hidrofóbica de la molécula huésped en la cavidad de la molécula de la ciclodextrina y, en una menor medida, de la deshidratación del compuesto. Puesto que la cavidad de la ciclodextrina es altamente hidrofóbica, la complejación ocurre a consecuencia de una combinación de ambos efectos. Las interacciones por puentes de hidrogeno, de tener lugar, pueden constituir un tercer factor que contribuye a la estabilización de estos complejos. Hay aún otros dos factores que pueden contribuir, también, a la formación de complejos: la liberación de las moléculas de agua incluidas inicialmente en la cavidad de la ciclodextrina y los cambios conformacionales

que pueden ocurrir con posterioridad al proceso de la complejación.

Todos estos tipos de interacciones influyen en el volumen molar de los compuestos en disolución acuosa y, puesto que los cambios que se derivan de ellas pueden cuantificarse, pueden obtenerse los valores de las constantes de asociación para estos sistemas moleculares.

La resolución analítica de la ecuación (2.2.7), mediante el método de mínimos cuadrados, permite obtener ϕ_V para cada uno de los componentes del sistema, así como determinar los valores de la constante K y de $\phi_{V,c}$, el volumen molar aparente de la especie compleja. Los valores encontrados para estos parámetros están recogidos en la Tabla 7.5, junto con los volúmenes molares parciales de transferencia.

Tabla 7.5. Propiedades termodinámicas del proceso de complejación de las ciclodextrinas con cafeína a 298,15 y 310,15 K.

	K /(kg·mol ⁻¹)	$\phi_{V,c\text{Caf}}$ /(cm ³ ·mol ⁻¹)	$\Delta\phi_{V,c\text{Caf}}$ /(cm ³ ·mol ⁻¹)	$\phi_{V,c\text{CD}}$ /(cm ³ ·mol ⁻¹)	$\Delta\phi_{V,c\text{CD}}$ /(cm ³ ·mol ⁻¹)
298,15 K					
$\beta\text{-CD}$	47,89	123,0 (± 3,1)	-19,50	668,2 (± 7,3)	-38,07
HP- $\beta\text{-CD}$	187,9	145,3 (± 0,1)	2,77	875,1 (± 1,8)	6,71
310,15 K					
$\beta\text{-CD}$	25,15	130,4 (± 2,8)	-16,40	655,5 (± 3,8)	-62,57
HP- $\beta\text{-CD}$	--	144,7 (± 0,4)	-1,98	882,3 (± 0,1)	0,84

Los valores que aparecen entre paréntesis corresponden a las desviaciones estándar

Si se tiene presente que en el proceso de formación del complejo, las variaciones de volumen que se producen pueden expresarse de acuerdo a la expresión:

$$\Delta\phi_{V,c} = \phi_{V,c} - \phi_{V,f} \quad (7.1.3)$$

puede concluirse, de la observación de los valores recogidos en la tabla 7.5, que existe una buena concordancia entre los valores que, a partir de ellos, se deducen para $\phi_{V,f}$, obtenidos mediante este procedimiento de ajuste, los datos correspondientes a los sistemas binarios, anteriormente medidos en este trabajo de Tesis Doctoral (tabla 7.4) y los publicados en la bibliografía.

El examen de la tabla 7.5 pone de manifiesto que los valores así encontrados para las

constantes de estabilidad de los complejos de la cafeína con estas ciclodextrinas no difieren sensiblemente de los valores que están recogidos en la literatura para la temperatura de 298,15 K (tabla 7.1) y que han sido obtenidos en condiciones análogas. Por otra parte, puesto que en el caso de la cafeína en presencia de HP- β -CD, los valores encontrados para la constante de estabilidad en este trabajo de Tesis Doctoral, han sido determinados en condiciones de pH diferentes a los de los otros autores, hay que señalar que este factor no parece que influya de forma significativa en el valor de la constante de estabilidad. Como es bien conocido, el valor del pH de los diferentes fluidos biológicos no es siempre el mismo (así, por ejemplo, mientras que el estómago presenta un pH \approx 2, en la sangre el pH es próximo a 7,4), por lo que si se tiene esto en cuenta, se puede concluir que los resultados de la tabla 7.5 son una buena aproximación a los que deben corresponder a las diferentes condiciones fisiológicas.

El incremento de la temperatura conduce, como cabía esperar, a una disminución en el valor de la constante de estabilidad de la asociación cafeína-ciclodextrina, si bien únicamente este extremo se ha podido comprobar para la β -CD, puesto que en el caso de la HP- β -CD no se han observado cambios de volumen que indiquen que pueda estar ocurriendo asociación entre los solutos o bien que, en el caso de que sí esté ocurriendo dicha asociación, ésta se produce tan débilmente que no es posible cuantificarla.

Como se ha indicado con anterioridad, el proceso de formación del complejo da origen a variaciones de volumen que pueden cuantificarse mediante la expresión (7.1.3). Estas variaciones de volumen, $\Delta\phi_{V,c}$, pueden ser positivas o negativas, según que el valor correspondiente al volumen aparente del complejo formado, $\phi_{V,c}$, sea mayor o menor, respectivamente, que el valor que presenta la especie libre, $\phi_{V,f}$. Por consiguiente, el signo de $\Delta\phi_{V,c}$ va a depender del predominio de una contribución sobre la otra.

Si analizamos los valores de $\Delta\phi_{V,c}$ que aparecen en la tabla 7.5 para el caso del complejo β -CD-cafeína, se observa que a ambas temperaturas ensayadas éstos son siempre negativos, tanto en relación a la cafeína como a la β -CD. Estos resultados indican que la formación del complejo va acompañada de una disminución de volumen respecto del que poseen las moléculas libres de ambas especies. Su interpretación pasa por considerar la reorganización de las moléculas del disolvente (agua) en la estructura general de la disolución, mientras tiene lugar la formación del complejo. Por una parte, se tiene que las moléculas de agua situadas en el interior de la cavidad de la ciclodextrina son sustituidas, total o parcialmente, por la

molécula huésped, lo que genera un cambio de volumen positivo [17-19]; esto es, un aumento del volumen de la disolución. Adicionalmente, la formación del complejo va acompañada de una destrucción parcial de la esfera de hidratación del soluto (cafeína), para poder penetrar en el interior de la cavidad de la ciclodextrina, seguida de un proceso de reestructuración de estas moléculas en el seno del agua. Esto da lugar a una disminución en el volumen de la disolución [14] que puede verse incrementada, aún más, por la formación de enlaces por puentes de hidrógeno [20]. Es evidente, a la vista del signo de $\Delta\phi_{v,c}$, que el efecto de disminución de volumen predomina sobre el aumento provocado por la salida de las moléculas de agua situadas en el interior de la cavidad de la ciclodextrina.

La cafeína en presencia de HP- β -CD exhibe un comportamiento diferente. En efecto, las variaciones de volumen que acompañan a la formación de estructuras complejas de HP- β -CD-cafeína son pequeñas y de signo positivo a 298,15 K, si bien el aumento de la temperatura (hasta 310,15 K) torna dicho signo en negativo. Este hecho lleva a concluir, de una parte, que la formación del complejo conlleva cambios netos de volumen poco apreciables, probablemente como consecuencia de la no prevalencia clara de las interacciones hidrofílicas e iónicas, conducentes al aumento de volumen de la disolución, sobre las interacciones de carácter predominantemente hidrofóbico, que conducen a la disminución de éste. Por otra parte, hay que tener presente que la posible presencia, en torno a la cavidad del macrociclo, de grupos hidroxipropil en vez de grupos hidroxilo, debe alterar la afinidad de la macromolécula por la cafeína, lo que se debe reflejar en el valor encontrado para el cambio de volumen de la disolución. Todo lo anterior lleva a concluir que la asociación entre la ciclodextrina y la cafeína no se produce únicamente como consecuencia de las interacciones de ésta con la cavidad de la ciclodextrina.

La presencia del signo positivo en la variación de volumen por complejación, indica que hay un predominio de las interacciones de tipo hidrofílico (tipos 1 y 2, señaladas en un párrafo anterior de este apartado). En ese sentido, Aicart *et al.* [5] han realizado simulaciones de los complejos de inclusión para este sistema, usando el programa Hiperchem v.5.1 de mecánica molecular, obteniendo valores para los correspondientes parámetros geométricos que evidencian que la unidad estructural del anillo de purina de la cafeína permanece en la entrada de la cavidad de la ciclodextrina, dejando por lo tanto aseguibles, al medio exterior, tanto los grupos metilo como los C=O, siendo estos últimos los responsables del establecimiento de interacciones hidrofílicas que llevarían a justificar el aumento de volumen observado. El aumento de temperatura (hasta 310,15 K) contrarrestaría parcialmente este

efecto de aumento de volumen, al verse desfavorecida la estructuración del medio como consecuencia del movimiento térmico.

7.1.2. Viscosidad

El estudio de la variación de la viscosidad de estos sistemas ternarios en función tanto de la composición de la disolución como de la temperatura, se ha planteado siguiendo el mismo patrón utilizado en el estudio de la densidad y de los volúmenes molares aparentes que están recogidos en el apartado anterior, consistente en considerar la mezcla agua + ciclodextrina como un disolvente mixto. Para ello, las medidas de viscosidad se realizaron sobre disoluciones acuosas de cafeína, con presencia de una concentración constante de la ciclodextrina correspondiente, analizando los cambios en la viscosidad de esas disoluciones que, consecuentemente, son atribuibles únicamente a la cafeína disuelta en el disolvente mixto y no a la composición de dicho disolvente. Posteriormente, se ha considerado el cambio de estos valores de viscosidad con relación a los obtenidos en medio acuoso, para evaluar los parámetros de transferencia desde el agua al disolvente mixto agua + ciclodextrina. Los valores de viscosidad medidos, a 298,15 K y 310,15 K, se presentan en las tablas 7.6 y 7.7. En todos los casos, la desviación estándar de estas medidas de viscosidad fue inferior a $3,7 \times 10^{-4}$.

El análisis de estos valores experimentales se realizó mediante su ajuste a la ecuación de Jones-Dole [21] (ecuación (3.1.1), capítulo 3), obteniendo los valores del parámetro A (que está relacionado con las interacciones de largo alcance soluto-soluto) y del B (que está relacionado con las interacciones de corto alcance soluto-disolvente), los cuales facilitan una valiosa información acerca de las interacciones entre soluto y disolvente que tienen lugar en el medio disuelto. En este caso, el coeficiente D de la ecuación (7.10) tampoco se ha tenido en cuenta, ya que el estudio se ha realizado, también, en el rango de concentraciones diluidas.

Tabla 7.6. Viscosidad de las disoluciones acuosas de cafeína en presencia de β -ciclodextrina, a 298,15 K y 310,15 K.

$10^3 m_{\beta\text{-CD}}$ /(mol·kg ⁻¹)	$10^3 m_{\text{cafeína}}$ /(mol·kg ⁻¹)	T = 298,15 K	T = 310,15 K
		η /cP	η /cP
0,465996	5,05840	0,8914	0,6927
0,465996	1,01168	0,8915	0,6928
0,465996	4,04672	0,8929	0,6935
0,465996	8,06119	0,8944	0,6944
0,465996	1,01168	0,8951	0,6948
0,931992	5,05840	0,8926	0,6936
0,931992	1,01168	0,8932	0,6937
0,931992	4,04672	0,8954	0,6946
0,931992	8,06119	0,8975	0,6958
0,931992	1,01168	0,8985	0,6965
3,70056	5,05840	0,8973	0,6994
3,70056	1,01168	0,8979	0,6996
3,70056	4,04672	0,9011	0,7006
3,70056	8,06119	0,9041	0,7019
3,70056	1,01168	0,9051	0,7027
7,26405	5,05840	0,9033	0,7070
7,26405	1,01168	0,9040	0,7071
7,26405	4,04672	0,9078	0,7080
7,26405	8,06119	0,9113	0,7095
7,26405	1,01168	0,9124	0,7102
9,18286	5,05840	0,9067	0,7110
9,18286	1,01168	0,9075	0,7111
9,18286	4,04672	0,9122	0,7122
9,18286	8,06119	0,9169	0,7136
9,18286	1,01168	0,9185	0,7144

Los valores obtenidos para estos coeficientes A y B de la ecuación de Jones-Dole, correspondientes a las disoluciones acuosas de cafeína en presencia de las dos ciclodextrinas utilizadas, se presentan en la tabla 7.8, para las temperaturas ensayadas de 298,15 y 310,15 K. Junto con estos valores, se presentan, además, los valores en agua pura encontrados para estos mismos coeficientes y que ya fueron comentados en el capítulo precedente relativo a los sistemas binarios.

Tabla 7.7. Viscosidad de las disoluciones acuosas de cafeína en presencia de hidroxipropil- β -ciclodextrina, a 298,15 K y 310,15 K.

		T = 298,15 K	T = 310,15 K
$10^3 m_{\text{HP-}\beta\text{-CD}}$	$10^3 m_{\text{cafeína}}$	η	η
/ (mol·kg ⁻¹)	/ (mol·kg ⁻¹)	/cP	/cP
0,835994	1,01168	0,8929	0,6952
0,835994	4,04672	0,8954	0,6966
0,835994	8,09343	0,8973	0,6984
0,835994	1,01168	0,8982	0,6990
3,34398	1,01168	0,8988	0,7049
3,34398	4,04672	0,9026	0,7082
3,34398	8,09343	0,9060	0,7119
3,34398	1,01168	0,9068	0,7130
6,68795	1,01168	0,9060	0,7174
6,68795	4,04672	0,9117	0,7223
6,68795	8,09343	0,9162	0,7267
6,68795	1,01168	0,9172	0,7279
8,35994	1,01168	0,9108	0,7235
8,35994	4,04672	0,9189	0,7293
8,35994	8,09343	0,9254	0,7342
8,35994	1,01168	0,9265	0,7359

Como puede apreciarse de la observación de la tabla 7.8, los valores obtenidos para el coeficiente A , a 298,15 K, aunque pequeños, no son despreciables, lo que indica la existencia de una interacción débil soluto-soluto como consecuencia de la presencia de la ciclodextrina en el medio. Si se analizan con mayor detenimiento estos valores del coeficiente A , puede apreciarse que mientras sus valores permanecen relativamente constantes en presencia de la β -CD (a partir de una cierta concentración de ésta), en presencia de HP- β -CD estos valores crecen, de forma relativamente importante, a medida que lo hace la presencia de la ciclodextrina en el medio. Una posible explicación a este comportamiento puede hallarse recurriendo a la posible formación adicional de complejos no de inclusión, cafeína-HP- β -CD, propiciada por la presencia de los grupos externos hidroxipropil que posee esta ciclodextrina. El aumento de temperatura, hasta 310,15 K, debe tender a contrarrestar esta interacción soluto-soluto, como consecuencia del movimiento térmico.

En efecto, en el caso de la β -CD los valores del coeficiente A se tornan despreciables; sin embargo, para la HP- β -CD éstos mantienen sus valores, aunque en una menor cuantía, crecientes con la concentración de la ciclodextrina presente.

Tabla 7.8: Coeficientes A y B de viscosidad de la ecuación de Jones-Dole y coeficiente de viscosidad de transferencia, ΔB , para las disoluciones acuosas de cafeína en presencia de ciclodextrinas, a 298,15 y 310,15 K.

$10^3 m_{\beta\text{-CD}}$ /(mol·dm ⁻³)	$A /$ (dm ^{3/2} ·mol ^{-1/2})	$B /$ (dm ³ ·mol ⁻¹)	$\Delta B /$ (dm ³ ·mol ⁻¹)	$10^3 m_{\text{HP-}\beta\text{-CD}}$ (mol·dm ⁻³)	$A /$ (dm ^{3/2} ·mol ^{-1/2})	$B /$ (dm ³ ·mol ⁻¹)	$\Delta B /$ (dm ³ ·mol ⁻¹)
T = 298,15 K							
0,000000	-0,004 ₂	0,310 ₃					
0,465996	0,001	0,429	0,119	0,417997			
0,931992	0,030	0,438	0,127	0,835994	0,027	0,428	0,118
3,70056	0,033	0,638	0,328	3,34398	0,062	0,499	0,188
7,26405	0,034	0,775	0,464	6,68795	0,093	0,629	0,319
9,18286	0,035	1,07 ₉	0,768	8,35994	0,151	0,741	0,431
T = 310,15 K							
0,000000	-0,003 ₇	1,03 ₈					
0,465996	0,004	0,296	-0,742	0,417997			
0,931992	-0,001	0,440	-0,598	0,835994	0,018	0,470	-0,568
3,70056	-0,003	0,507	-0,531	3,34398	0,044	0,937	-0,101
7,26405	-0,003	0,500	-0,538	6,68795	0,081	0,976	-0,062
9,18286	-0,003	0,525	-0,513	8,35994	0,085	1,19 ₁	0,153

En cuanto a los valores del coeficiente de B para la cafeína, de la tabla 7.8, hay que señalar que en todos los sistemas estudiados son positivos y aumentan con el aumento de la concentración de la ciclodextrina en disolución. De ello hay que concluir la existencia de fuertes interacciones soluto-disolvente-codisolvente que son tanto más importantes, cuanto mayor es el contenido de ciclodextrina en la disolución. Si se acepta que el coeficiente B “informa” acerca de las interacciones que tienen lugar entre las moléculas del soluto y las del disolvente (en este caso, de un disolvente mixto), que dan como resultado que haya una mayor (*structure making*) o menor (*structure breaking*) estructuración de la disolución [22], hay que concluir, a la vista de los valores de la tabla 7.8, que la cafeína se comporta en ambos disolventes mixtos, agua + ciclodextrina, como un electrólito formador de estructura (*structure*

making), a ambas temperaturas. Además, como se ha señalado anteriormente, que cuanto mayor es la presencia de ciclodextrina en el medio, más se acrecienta dicho carácter formador de estructura. Esto significa que las disoluciones están más estructuradas (hay mayor número de enlaces entre las moléculas presentes) a medida que hay mayor proporción de la ciclodextrina en la disolución.

Observando los valores recogidos en la tabla 7.8, resulta necesario hacer algunos breves comentarios en relación con algunas particularidades detectadas. En primer lugar, se aprecia que en el caso de la β -CD, el aumento de temperatura conduce a valores de B menores (para la misma composición del disolvente mixto agua + ciclodextrina) que aunque crecen con el aumento de la cantidad de ciclodextrina presente en el medio, lo hacen con una menor intensidad. Es decir, presenta un valor negativo para su coeficiente de temperatura, $dB/dT < 0$, que se hace cada vez más negativo a medida que aumenta la concentración de ciclodextrina presente. De acuerdo con las ideas de Marcus [23], este valor negativo para el coeficiente de temperatura constituye una característica típica de un soluto formador de estructura (*structure making*), puesto que el aumento de temperatura contribuye a que haya una menor estructuración del disolvente, como consecuencia del movimiento térmico.

Por el contrario, en el caso de la HP- β -CD, el comportamiento del coeficiente B es muy diferente al observado en presencia de la otra ciclodextrina. En efecto, a la temperatura de 298,15 K el crecimiento que experimenta el valor del parámetro B con el aumento de la cantidad de ciclodextrina presente, es algo menor para la HP- β -CD que para la β -CD. Esto significa que el carácter formador de la estructura del disolvente (*structure making*) que presenta la cafeína, es menor en estas disoluciones con presencia de HP- β -CD. Tal circunstancia podría deberse al hecho de que esta ciclodextrina está mucho más hidratada (lo que implica un medio mucho más estructurado), por lo que el margen de estructuración, como consecuencia de la presencia de la cafeína, es por consiguiente menor. Pero, además de lo anterior, se observa que el aumento de temperatura, desde 298,15 hasta 310,15 K, comporta un aumento en los valores encontrados para el coeficiente B de viscosidad, esto es, el coeficiente de temperatura es ahora positivo, $dB/dT > 0$ y, además, es tanto más positivo cuanto mayor es la concentración de ciclodextrina presente en el medio. De acuerdo con Nightingale [24], este valor positivo, considerado conjuntamente con el valor también positivo que presenta el coeficiente B , podría ser indicativo de que la cafeína posee una cierta capacidad anómala formadora de estructura (*structure-making*), con aparición de fuertes interacciones soluto-disolvente-codisolvente motivadas por la menor estructuración del disolvente al aumentar la temperatura.

Todo lo antedicho refuerza la consideración, ya esbozada con anterioridad, de que la presencia creciente de las ciclodextrinas en el medio disuelto, propicia un incremento en la formación de complejos cafeína-ciclodextrina (que pueden ser de inclusión o de no inclusión), que contribuye a una mayor estructuración del medio.

Se han determinado, asimismo, los valores del coeficiente de viscosidad de transferencia, ΔB , desde el agua hasta los medios mixtos agua + ciclodextrina, para las diferentes disoluciones estudiadas, de acuerdo a la ecuación [13]

$$\Delta B = B_{\text{agua-CD}} - B_{\text{agua}} \quad (7.1.4)$$

Estos valores se muestran, también, en la tabla 7.8.

Como puede verse, los valores de ΔB son positivos a 298,15 K en ambas mezclas agua + ciclodextrina, presentando valores crecientes a medida que aumenta la cantidad de codisolvente presente, si bien dicho crecimiento es más acentuado en el caso de la β -CD. Tal situación indica que el valor del coeficiente B de viscosidad y, en consecuencia, el carácter formador de estructura (*structure-making*) de la cafeína se acentúa con la presencia de la ciclodextrina en el medio, especialmente con la β -CD.

Cuando la temperatura se cambia a 310,15 K, el signo de ΔB cambia a negativo, aunque la tendencia a aumentar su valor (hacerse menos negativo) con la mayor presencia de la ciclodextrina en la disolución, se mantiene. Es decir, la presencia inicial de la ciclodextrina en la disolución, provoca una caída brusca del carácter formador de estructura (*structure-making*) que presenta la cafeína en medio acuoso, a esta temperatura (el signo de este parámetro se torna negativo), pero las sucesivas adiciones de la ciclodextrina hacen que dicho carácter formador de la estructura del disolvente que posee la cafeína en medio acuoso, se vaya recuperando de manera progresiva. A esta temperatura, esta recuperación es mucho más patente en presencia de HP- β -CD, para la que el signo de ΔB se vuelve finalmente positivo cuando la concentración de la ciclodextrina es suficientemente elevada.

En las figuras 7.2 y 7.3 se pueden observar las tendencias anteriormente comentadas acerca de los coeficientes de viscosidad de transferencia, ΔB , de la cafeína desde agua hasta las diferentes disoluciones acuosas de las ciclodextrinas estudiadas, a 298,15 K y 310,15 K. Asimismo, y a efectos comparativos, se representan, además, los volúmenes molares parciales de transferencia, $\Delta\phi_V^0$, obtenidos para estas disoluciones.

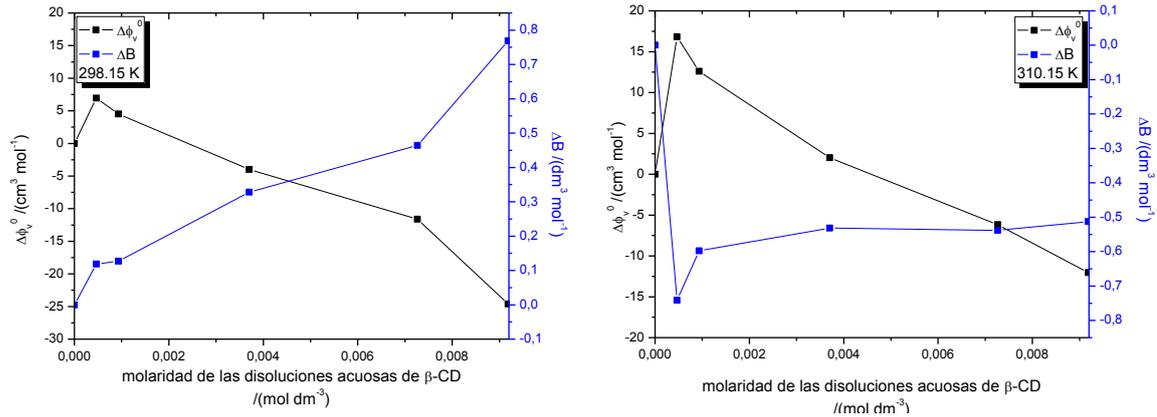


Figura 7.2. Volúmenes molares parciales de transferencia, $\Delta\phi_v^0$, (—■—) y coeficientes de viscosidad de transferencia, ΔB , (—■—) de la cafeína desde el agua hasta diferentes disoluciones acuosas de β -ciclodextrina, a 298,15 K y 310,15 K

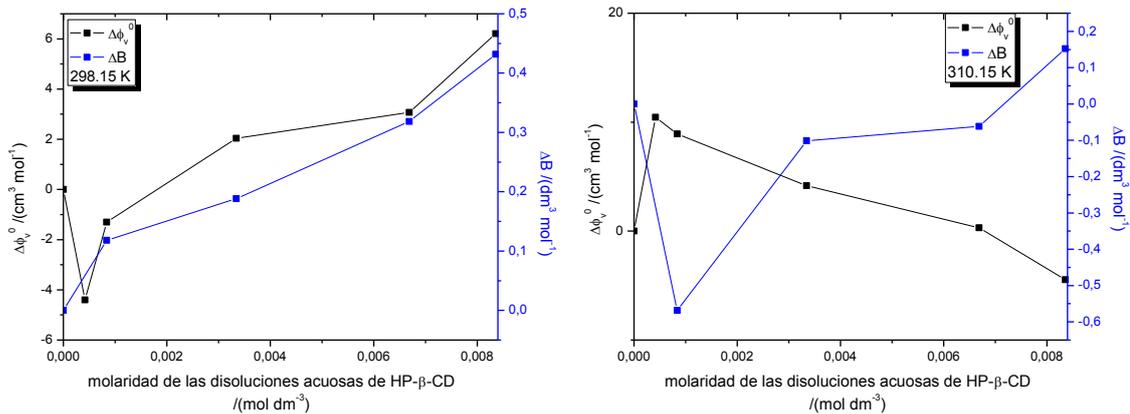


Figura 7.3. Volúmenes molares parciales de transferencia $\Delta\phi_v^0$, (—■—) y coeficientes de viscosidad de transferencia, ΔB , (—■—) de la cafeína desde el agua hasta diferentes disoluciones acuosas de hidroxipropil- β -ciclodextrina, a 298,15 K y 310,15 K

En resumen, la presencia de moléculas de la ciclodextrina en la disolución ofrece a la cafeína un ambiente adecuado para la formación de complejos (que pueden ser o no ser de inclusión) cafeína-ciclodextrina y la interacción entre estas moléculas es predominante sobre la auto-asociación de las moléculas de cafeína. El aumento de la temperatura debilita estas interacciones.

7.1.3. Difusión

El proceso de absorción de un fármaco comprende varias etapas, bien diferenciadas: la penetración del fármaco en el organismo a través de diversas vías de administración, cada una de ellas con una tipología diferente; el proceso de transporte a través de este organismo hasta alcanzar el lugar de su actuación, cuyo mecanismo viene condicionado por las características asociadas a los factores que condicionan cada vía de entrada; y, finalmente, el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la pretendida absorción. Cualquier desplazamiento que realice una molécula de fármaco en el interior del organismo exige su paso a través de alguna membrana biológica y ello influye tanto en los mecanismos de distribución y en los de absorción de estas moléculas, como en los de eliminación de los productos no deseados. La difusión constituye una de las principales formas de movimiento entre las células por parte de las diferentes sustancias y, además, es una de las principales vías para que los fármacos crucen las membranas celulares, por lo que su estudio resulta de gran interés y, consecuentemente, se le ha dedicado atención en este trabajo de Tesis Doctoral. Después de estudiada la difusión simple (o difusión pasiva) de los fármacos en disolución acuosa, en esta parte del trabajo el interés se ha centrado en conocer de qué forma la presencia creciente de moléculas de ciclodextrina influye en este proceso de difusión, así como qué influencia ejerce la temperatura en dicho proceso.

El estudio de las propiedades de difusión de sistemas ternarios conteniendo moléculas de ciclodextrina y moléculas de otra sustancia que pueda actuar como huésped de aquellas, resulta de gran interés dada la posibilidad de obtener, bajo ciertas suposiciones razonables, valores para la constante de equilibrio del proceso de inclusión de las moléculas huésped en el interior de la cavidad de las moléculas de ciclodextrina, a partir del conocimiento de los cuatro coeficientes de difusión experimentales. Mediante el empleo de modelos teóricos, es posible hacer una estimación del valor de K así como del coeficiente de difusión de la especie complejada. En ese sentido, se realizaron medidas [25-27] para obtener los coeficientes de difusión mutua de disoluciones acuosas de cafeína en presencia de β -CD y de HP- β -CD, para diferentes relaciones de concentración entre ambas sustancias y a las temperaturas estándar (298,15 K) y fisiológica (310,15 K).

7.1.3.1. Influencia de la presencia de β -ciclodextrina sobre la difusión de la cafeína

Los valores medios para los coeficientes de difusión: D_{11} , D_{12} , D_{21} y D_{22} , obtenidos en el sistema ternario β -CD (1) + cafeína (2) + agua [25, 27], a 298,15 K y 310,15 K, se presentan en la tabla 7.9 (incertidumbre: 1 - 2 %).

Tabla 7.9. Coeficientes de difusión ternaria, D_{11} , D_{12} , D_{21} y D_{22} , para el sistema β -ciclodextrina (1) + cafeína (2) + agua a 298,15 y 310,15 K

C_1^a	C_2^a	$D_{11} \pm S_D^b$ /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	$D_{12} \pm S_D^b$ /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	$D_{21} \pm S_D^b$ /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	$D_{22} \pm S_D^b$ /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{12}/D_{22}^c	D_{21}/D_{11}^d
T=298,15 K							
0,002	0,002	0,323 ± 0,017	-0,008 ± 0,003	0,016 ± 0,008	0,735 ± 0,022	-0,011	0,048
0,004	0,004	0,319 ± 0,016	-0,009 ± 0,003	0,015 ± 0,007	0,728 ± 0,019	-0,012	0,047
0,005	0,005	0,318 ± 0,017	-0,011 ± 0,003	0,014 ± 0,005	0,725 ± 0,017	-0,015	0,043
0,008	0,008	0,315 ± 0,007	-0,010 ± 0,003	0,014 ± 0,003	0,715 ± 0,015	-0,014	0,044
0,000	0,010	0,322 ± 0,004	0,002 ± 0,001	0,064 ± 0,010	0,721 ± 0,011	0,003	0,199
0,010	0,000	0,321 ± 0,004	-0,040 ± 0,001	-0,004 ± 0,004	0,746 ± 0,025	-0,054	-0,013
0,010	0,002	0,315 ± 0,007	-0,033 ± 0,003	-0,051 ± 0,012	0,703 ± 0,022	-0,047	-0,162
0,010	0,005	0,313 ± 0,006	-0,039 ± 0,005	-0,001 ± 0,011	0,699 ± 0,017	-0,056	-0,003
0,010	0,010	0,313 ± 0,007	-0,014 ± 0,003	0,013 ± 0,002	0,695 ± 0,013	-0,020	0,041
T=310,15 K							
0,002	0,002	0,443 ± 0,007	-0,017 ± 0,012	0,031 ± 0,008	1,009 ± 0,016	-0,017	0,070
0,005	0,005	0,441 ± 0,007	0,006 ± 0,035	0,051 ± 0,033	0,958 ± 0,011	0,007	0,116
0,010	0,002	0,429 ± 0,008	-0,005 ± 0,021	0,012 ± 0,017	0,999 ± 0,022	-0,005	0,028
0,010	0,005	0,428 ± 0,013	-0,008 ± 0,024	0,037 ± 0,020	0,937 ± 0,015	-0,009	0,085
0,010	0,010	0,424 ± 0,008	0,020 ± 0,011	0,054 ± 0,031	0,868 ± 0,012	0,023	0,127

^(a) Unidades: (mol dm⁻³); ^(b) S_D representa la desviación estándar de todas las medidas realizadas;

^(c) D_{12}/D_{22} representa el número de moles de β -CD transportados por 1 mol de cafeína;

^(d) D_{21}/D_{11} representa el número de moles de cafeína transportados por 1 mol de β -CD.

Los coeficientes principales, D_{11} y D_{22} , proporcionan información acerca de los flujos molares de los componentes de la disolución β -CD (1) y cafeína (2), originados a consecuencia de su propio gradiente de concentración entre dos zonas de la disolución. En general, estos coeficientes presentan valores inferiores a los obtenidos para los coeficientes de difusión binarios de la β -CD y de la cafeína puros en disolución acuosa (con desviaciones por debajo del 3% en ambas temperaturas), medidos previamente mediante la misma técnica

experimental (tablas 6.13 y 6.4, respectivamente, del capítulo 6). Sin embargo, a las composiciones ensayadas en este estudio, se comprueba que la adición de cafeína produce pequeños cambios en el coeficiente de difusión principal, D_{11} , para la β -CD, mientras que la adición de cantidades de esta última sustancia provoca cambios mucho mayores en el coeficiente de difusión de la cafeína, D_{22} . A la vista de estos resultados, se podría considerar que algunas moléculas de cafeína, presentes en la disolución, podrían estar formando, eventualmente, complejos de inclusión en el interior de la β -CD, como resultado de las interacciones atractivas que tendrían lugar entre estas moléculas y la superficie interior del cono truncado de las moléculas de β -CD, tal y como puede deducirse a partir de los anteriores resultados experimentales y de los valores de las constantes de formación recogidas en la bibliografía (tabla 7.1). En consecuencia, estas moléculas de cafeína tendrían una menor movilidad y podrían ser las responsables de los decrecimientos relativamente grandes que se observan en D_{22} . Este efecto está menos acentuado (hay un menor decrecimiento en el valor de D_{11}) cuando se considera la influencia de la cafeína en el transporte de la β -CD, lo que podría deberse a la similitud que existiría entre las movilidades de la β -CD libre y de los eventuales agregados de β -CD y cafeína.

En la situación de concentración infinitesimal, los valores límite de los coeficientes de difusión secundarios D_{12} y D_{21} deberán ser iguales a cero, dentro del error experimental. Sin embargo, a cualquier otra concentración, los valores de estos coeficientes de difusión secundarios, D_{21} , presentarán valores diferentes a cero, que pueden ser utilizados para comprender la influencia de los solutos macromoleculares sobre la difusión de los componentes de la disolución. En el caso presente, el gradiente de concentración de la β -CD produce un “*co-transporte*” acoplado de cafeína. Teniendo en cuenta que el cociente D_{21}/D_{11} proporciona el número de moles de cafeína “*co-transportados*” por 1 mol de β -CD, como consecuencia del gradiente de concentración de la ciclodextrina, se puede considerar que, a las composiciones utilizadas, un mol de β -CD difundente, “*co-transporta*”, continuamente, alrededor de 0,05 moles de cafeína y, además, que este valor aumenta hasta alcanzar el de 0,13 moles, cuando aumenta la temperatura hasta los 310,15 K. A través de los valores del cociente D_{12}/D_{22} , a la misma composición, se puede esperar que un mol de cafeína difundente, “*contra-transporte*” un máximo de 0,01 moles de β -CD a 298,15 K, si bien a 310,15 K no se observa una tendencia definida (los valores de D_{12} son pequeños y próximos al valor del error experimental).

7.1.3.2. Influencia de la hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre la difusión de la cafeína

Los valores medios de los coeficientes de difusión, D_{11} , D_{12} , D_{21} y D_{22} , para el sistema ternario HP- β -CD (1) + cafeína (2) + agua [26, 27], a 298,15 K y 310,15 K, se presentan en la tabla 7.10 (incertidumbre: 1 - 2 %).

Tabla 7.10. Coeficientes de difusión ternaria, D_{11} , D_{12} , D_{21} y D_{22} , para el sistema hidroxipropil- β -ciclodextrina (1) + cafeína (2) + agua a 298,15 y 310,15 K

C_1^a	C_2^a	$D_{11} \pm S_D^b$ /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	$D_{12} \pm S_D^b$ /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	$D_{21} \pm S_D^b$ /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	$D_{22} \pm S_D^b$ /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{12}/D_{22}^c	D_{21}/D_{11}^d
T=298,15 K							
0,000 ₅	0,000 ₅	0,305 ± 0,010	-0,003 ± 0,015	0,040 ± 0,025	0,744 ± 0,043	-0,004	0,131
0,001	0,001	0,300 ± 0,015	0,003 ± 0,014	0,050 ± 0,026	0,730 ± 0,033	0,004	0,167
0,002 ₅	0,005	0,316 ± 0,004	-0,004 ± 0,004	0,067 ± 0,013	0,676 ± 0,016	-0,006	0,212
0,005	0,002 ₅	0,292 ± 0,003	-0,003 ± 0,013	0,051 ± 0,015	0,690 ± 0,039	-0,017	0,184
0,005	0,005	0,293 ± 0,006	-0,011 ± 0,006	0,054 ± 0,024	0,665 ± 0,013	-0,004	0,175
0,000	0,010	0,322 ± 0,004	-0,002 ± 0,003	0,031 ± 0,003	0,738 ± 0,003	-0,003	0,097
0,010	0,000	0,321 ± 0,003	0,020 ± 0,003	0,004 ± 0,003	0,600 ± 0,003	0,033	0,014
0,010	0,002	0,289 ± 0,006	-0,042 ± 0,023	0,024 ± 0,015	0,665 ± 0,012	-0,063	0,083
0,010	0,005	0,288 ± 0,008	-0,040 ± 0,016	0,043 ± 0,011	0,646 ± 0,013	-0,069	0,148
0,010	0,010	0,283 ± 0,009	-0,021 ± 0,016	0,103 ± 0,022	0,640 ± 0,036	-0,033	0,160
T=310,15 K							
0,002	0,002	0,407 ± 0,015	-0,038 ± 0,047	0,070 ± 0,061	0,997 ± 0,029	-0,038	0,172
0,005	0,005	0,406 ± 0,006	0,057 ± 0,035	0,080 ± 0,033	0,883 ± 0,013	0,065	0,197
0,010	0,002	0,403 ± 0,009	0,077 ± 0,040	0,031 ± 0,033	0,875 ± 0,011	0,088	0,077
0,010	0,005	0,403 ± 0,004	0,061 ± 0,023	0,033 ± 0,013	0,852 ± 0,018	0,072	0,081
0,010	0,010	0,401 ± 0,013	0,024 ± 0,014	0,113 ± 0,031	0,811 ± 0,012	0,030	0,282

^(a) Unidades: (mol dm⁻³); ^(b) S_D representa la desviación estándar de todas las medidas realizadas;

^(c) D_{12}/D_{22} representa el número de moles de HP- β -CD transportados por 1 mol de cafeína;

^(d) D_{21}/D_{11} representa el número de moles de cafeína transportados por 1 mol de HP- β -CD.

Para la difusión de la cafeína en presencia de HP- β -CD, derivado de la β -CD de naturaleza hidrofílica, se puede apreciar fácilmente que los efectos anteriormente mencionados son ahora diferentes. En el rango de concentraciones estudiado, se verifica que a 298,15 K los coeficientes de difusión principales sufren un descenso de entre un 5 y un 8% respecto a los correspondientes valores de los sistemas binarios. A 310,15 K, se observa que

no hay una influencia apreciable en el coeficiente de difusión principal de la HP- β -CD, D_{11} , por efecto de la presencia ni de la cafeína, ni tampoco de los gradientes de concentración de ambas especies. Por el contrario, los valores de D_{22} son mucho menores que los correspondientes al coeficiente de difusión binario previamente medido en este trabajo de Tesis Doctoral (desviación entre un 3 y un 15 %) e, incluso, son mucho menores (entre un 3 y un 12%) que en presencia de β -CD. En este último caso, para una determinada concentración de HP- β -CD, la disminución es más pronunciada con el aumento de la cafeína en la disolución. También en este caso es posible encontrar evidencias de que bastantes moléculas de cafeína y HP- β -CD pueden existir en disolución formando complejos, con o sin inclusión, y que esta interacción se produce más ampliamente que en el caso de la β -CD. Además, si se observan los coeficientes de difusión secundarios, D_{12} y D_{21} , se puede observar un aumento no despreciable en sus valores, dentro de la precisión de este método, en relación con los obtenidos para el sistema β -CD + cafeína. En este caso, ambos solutos generan flujos acoplados del otro componente en disolución y, en el rango de composiciones empleado, un mol de HP- β -CD difundente, “*co-transporta*” hasta 0,2 moles de cafeína, cantidad que aumenta hasta los 0,28 moles, a la temperatura de 310,15 K. Un mol de cafeína difundente, a 298,15 K, puede “*contra-transportar*” alrededor de 0,03 moles de HP- β -CD y a 310,15 K, “*co-transporta*” hasta un máximo de 0,09 moles de HP- β -CD, en el sentido de su gradiente de concentración.

7.1.3.3. Estimación de las constantes de asociación

Los datos encontrados para estos coeficientes de difusión, primarios y secundarios, pueden utilizarse, además de para los análisis cualitativos anteriormente realizados acerca de la influencia de la presencia de un soluto sobre el proceso de difusión del otro soluto en la disolución, para dar soporte a modelos que permiten estimar valores de las constantes de asociación de las posibles estructuras complejas que pueden formarse en estos medios disueltos: Por ello, en este trabajo de Tesis Doctoral se han utilizado dichos valores para obtener los de la constante de asociación de los complejos cafeína-ciclodextrina mencionados con anterioridad y cuya supuesta presencia en el medio se ha deducido a partir de los valores obtenidos para las diferentes propiedades termodinámicas y de transporte estudiadas.

El modelo teórico que se ha utilizado para realizar dicha estimación ha sido propuesto por Paduano *et al.* [28-31]. Su fundamento teórico y las ecuaciones que permiten

correlacionar los coeficientes de difusión con las constantes de equilibrio, se han descrito en el capítulo 4.

En las tablas 7.11 y 7.12 se presentan los valores estimados para las constantes de estabilidad K , calculadas a partir de los coeficientes de difusión experimentales y mediante el uso de las ecuaciones teóricas anteriormente indicadas, considerando que las especies (ciclodextrina y cafeína) pueden formar un complejo del tipo 1:1. El error en el cálculo de las constantes de asociación y del coeficiente de difusión de la especie compleja es del mismo orden de magnitud del experimental que acompaña las medidas.

Tabla 7.11: Valores de la constante de asociación K y de los coeficientes de difusión de las especies en equilibrio, D_{11}^* , D_{22}^* , y D_{33}^* estimados para las disoluciones acuosas de cafeína en presencia de β -ciclodextrina, a 298,15 y 310,15 K.

c_2 /(mol·dm ⁻³)	D_{11}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{22}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{33}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	K /(dm ³ ·mol ⁻¹)
T=298,15 K				
0,002		0,737		
0,005	0,317	0,724	0,305 (± 0,016)	43 (± 5,6)
0,010		0,69		
T=310,15 K				
0,002		0,999		
0,005	0,436	0,949	0,430 (± 0,018)	23 (± 2,1)
0,010		0,915		

Nota: los datos presentados son únicamente en presencia de una concentración constante de β -CD 10 mM

Los valores de las constantes de estabilidad obtenidos por la aplicación de este modelo teórico de Paduano *et al.* [28-31] son muy próximos a los que se encuentran publicados en la literatura científica para estos sistemas y están en buena concordancia con los anteriormente estimados usando las medidas volumétricas. De hecho, la analogía que existe entre los valores de la constante de asociación estimada a través de las medidas de los volúmenes molares aparentes y la constante de asociación estimada mediante las medidas de difusión es notable, para ambos sistemas acuosos, incluso teniendo en cuenta que el modelo empleado en la estimación de constantes de asociación, a partir de las medidas de difusión, no tiene en cuenta los coeficientes de difusión secundarios, D_{ij}^* . Este puede ser el motivo por el cual las estimaciones de K realizadas mediante aplicación de este último método conducen a valores menores.

Tabla 7.12: Valores de la constante de asociación K y de los coeficientes de difusión de las especies en equilibrio, D_{11}^* , D_{22}^* , y D_{33}^* estimados para las disoluciones acuosas de cafeína en presencia de hidroxipropil- β -ciclodextrina, a 298,15 y 310,15 K.

c_2 /(mol·dm ⁻³)	D_{11}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{22}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{33}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	K /(dm ³ ·mol ⁻¹)
T=298,15 K				
0,002		0,735		
0,005	0,307	0,723	0,300 (\pm 0,013)	85 (\pm 8,6)
0,010		0,688		
T=310,15 K				
0,002		0,979		
0,005	0,406	0,930	0,395 (\pm 0,018)	20 (\pm 1,0)
0,010		0,896		

Nota: los datos presentados son únicamente en presencia de una concentración constante de HP- β -CD 10 mM

Los valores obtenidos para el coeficiente de difusión de la especie asociada, D_{33}^* , son muy próximos a los de la ciclodextrina, D_{11}^* , para ambas ciclodextrinas, lo que pone de evidencia que la molécula de cafeína está total o parcialmente incluida en la cavidad de la ciclodextrina y, por lo tanto, las dimensiones de las especies difundentes, ciclodextrina ó complejo ciclodextrina-cafeína, son muy similares. A través de las medidas de difusión ha sido posible estimar el valor de K para la HP- β -CD-Caf a 310,15 K, aunque el valor de D_{33}^* encontrado se desvía del correspondiente a la ciclodextrina libre, lo que podría ser indicativo de que el valor estimado para K puede deberse a interacciones externas entre las moléculas de cafeína y de ciclodextrina y no a la inclusión de las primeras en la cavidad de las últimas.

7.1.4. Resumen

Las disoluciones acuosas de cafeína en presencia de ciclodextrinas se han estudiado mediante técnicas volumétricas, viscosimétricas y de medida de los coeficientes de difusión.

Se ha comprobado, a partir del análisis de los valores de estas propiedades de las disoluciones acuosas bajo estudio, que ocurren interacciones entre los solutos: la cafeína y las ciclodextrinas. Usando modelos teóricos para ajustar los datos experimentales, ha sido posible estimar la magnitud de esas interacciones y estimar valores de la constante de asociación, bajo la consideración de que la mezcla agua + ciclodextrina es un disolvente mixto y de que tiene lugar la formación de especies complejas cafeína-ciclodextrina del tipo 1:1.

A partir de los volúmenes molares aparentes obtenidos, se han determinado finalmente los valores de estas constantes de equilibrio de asociación cafeína-ciclodextrina. Se ha comprobado que, a la temperatura de 298,15 K, la presencia de HP- β -CD conduce a valores de la constante de estabilidad más elevados que los que se obtienen en presencia de β -CD. A la temperatura fisiológica, 310,15 K, en presencia de β -CD estas constantes de formación de complejos son, lógicamente, inferiores. En presencia de HP- β -CD, a la temperatura de 310,15 K, no se ha encontrado una evidencia clara de que llegue a ocurrir asociación, hecho éste que resulta de suma importancia si se tienen en cuenta las posibles aplicaciones farmacológicas de estos solutos.

Asimismo, las medidas de viscosidad realizadas han puesto de manifiesto el carácter formador de estructura (*structure making*) de la cafeína en estos medios. Es decir, han confirmado la existencia de importantes interacciones cafeína-ciclodextrina-agua. En el caso de la HP- β -CD pueden llegar a formarse, además, complejos de no inclusión cafeína-ciclodextrina, incluso a la temperatura fisiológica.

Los datos de coeficientes de difusión mutua determinados han permitido estimar valores de las constantes de asociación de los complejos cafeína-ciclodextrina. Los valores así encontrados han venido a reforzar los obtenidos a partir de las medidas de volúmenes parciales aparentes. Además, se ha estimado que, en el caso de la β -CD, la molécula de cafeína está total o parcialmente incluida en la cavidad de la ciclodextrina y que en el caso de la HP- β -CD, la cafeína podría interaccionar, también, con la parte exterior de esta ciclodextrina.

7.2. Caracterización de las interacciones entre las ciclodextrinas y la teofilina en disolución acuosa

La interpretación de la interacción molecular que tiene lugar entre la teofilina y diferentes ciclodextrinas sigue generando desacuerdos y controversias. En ese sentido, en los diversos estudios que se encuentran disponibles en la bibliografía sobre teofilina en presencia de β -CD, en los que se examina la influencia de esta ciclodextrina sobre las propiedades de la teofilina [1, 6-7, 32-33], todos sus autores están de acuerdo en que se produce asociación, entre las moléculas de ambos compuestos, pero no terminan de llegar a un compromiso acerca del valor de la constante de estabilidad de esta asociación, así como tampoco en cuanto a cuál es la relación en que cada componente participa en la formación de los complejos resultantes. Así, mientras que Ammar *et al.* [33] proponen que se forma un complejo de estequiometría 2:1, la gran mayoría de autores asume que la complejación ocurre con estequiometría 1:1. Si se tiene en cuenta la similitud existente entre las estructuras de la cafeína y de la teofilina, puede aceptarse que el tipo de interacciones que se dan en ambos casos, deberán ser muy similares.

Dado que las magnitudes fisicoquímicas estudiadas en este trabajo de Tesis Doctoral no facilitan información concluyente sobre que esté ocurriendo la asociación de las moléculas ni tampoco, en caso de producirse ésta, sobre cuál sería la estequiometría del complejo formado, se ha seguido el criterio establecido por la mayoría de los autores y se ha considerado, en un primer momento, que entre la teofilina y la β -CD ó la HP- β -CD se produce asociación y, además, que los complejos formados ocurren en la proporción 1:1. Es decir, que el proceso de asociación que tiene lugar se puede describir mediante



donde CD representa a la ciclodextrina correspondiente; $Teof$, a la teofilina y K es la constante del equilibrio.

Tal como ya se indicó en una sección anterior de esta memoria, los valores de esta constante de equilibrio de asociación pueden obtenerse y su variación analizarse, a través del estudio de los cambios observados en los valores de diversas propiedades fisicoquímicas del sistema teofilina + ciclodextrina correspondiente, en el que tiene lugar la formación de los complejos que se pretende estudiar.

7.2.1. Volúmenes molares aparentes

En la tabla 7.13 se exponen los valores experimentales de densidad obtenidos para las disoluciones acuosas de teofilina en presencia de β -CD. Se realizaron varios conjuntos de medidas en las que la concentración de la ciclodextrina se mantuvo constante y se varió la de la teofilina presente. Como puede apreciarse, la densidad de las disoluciones crece de manera monótona con el aumento de la concentración de teofilina en el medio, con independencia de la cantidad de β -CD presente y a ambas temperaturas ensayadas; esto es, las líneas de densidad frente a la concentración de teofilina, para cada concentración de β -CD y a ambas temperaturas, son paralelas entre sí. Asimismo, a partir de estos valores de densidad y aplicando la ecuación (2.1.7) (capítulo 2) se obtuvieron los valores correspondientes a los volúmenes molares aparentes de la teofilina, ϕ_v , considerando la mezcla agua + β -CD como un disolvente mixto. Estos valores de volúmenes aparentes se encuentran recogidos en la tabla 7.13.

La desviación estándar que acompaña a estas medidas de densidad es inferior, en todos los casos, a $4,6 \times 10^{-6}$. En consecuencia, la incertidumbre asociada al cálculo de los volúmenes molares aparentes es siempre inferior al 4%.

En la tabla 7.14 se presentan los resultados correspondientes a la densidad y a los volúmenes molares aparentes de la teofilina en presencia de HP- β -CD en condiciones análogas a las del anterior sistema ternario. Del análisis de estos datos se desprende que el comportamiento de la densidad de estas disoluciones es idéntico con independencia de la ciclodextrina presente en el medio, aunque los valores absolutos encontrados en la mezcla con HP- β -CD son algo superiores a los medidos en presencia de β -CD.

Para la teofilina en estas disoluciones acuosas ternarias (en las que se ha considerado a la mezcla agua + ciclodextrina como un disolvente mixto) se han obtenido valores de ϕ_v positivos y elevados, aunque siempre inferiores a los que se encuentran para la teofilina disuelta en agua pura (disolución binaria). Es destacable la tendencia que se observa en estos valores de ϕ_v a disminuir cuando la concentración de ciclodextrina es constante, pero la concentración de teofilina presente aumenta, si bien dicha tendencia se va amortiguando a medida que esta concentración de ciclodextrina va siendo más alta; incluso, cuando esta concentración de ciclodextrina es bastante elevada, ϕ_v tiende a adoptar un valor constante e independiente de la concentración de teofilina presente.

Tabla 7.13. Densidades, ρ , y volúmenes molares aparentes, ϕ_V , para las disoluciones acuosas de teofilina en presencia de β -ciclodextrina, a 298,15 K y 310,15 K

		T= 298,15 K		T= 310,15 K	
$10^3 m_{\beta-CD}$	$10^3 m_{teofilina}$	ρ	ϕ_V	ρ	ϕ_V
/(mol kg ⁻¹)	/(mol kg ⁻¹)	/(g cm ⁻³)	/(cm ³ mol ⁻¹)	/(g cm ⁻³)	/(cm ³ mol ⁻¹)
0,438541	0,508594	0,997261	136,08	0,993544	137,49
0,441887	1,01682	0,997288	132,05	0,993573	130,75
0,439680	4,04695	0,997460	125,58	0,993740	126,84
0,439680	8,09389	0,997678	125,95	0,993950	127,81
0,439680	10,1174	0,997794	125,37	0,994063	127,14
0,884839	0,513092	0,997451	130,97	0,993730	131,84
0,882710	1,01559	0,997481	125,44	0,993759	126,69
0,878307	4,04210	0,997664	121,23	0,993932	124,36
0,878307	8,08421	0,997890	122,81	0,994143	126,35
0,878307	10,1053	0,998024	121,04	0,994268	124,75
3,51816	0,509203	0,998583	124,52	0,994831	127,73
3,54503	1,01804	0,998618	118,50	0,994862	123,63
3,52730	4,05180	0,998816	115,70	0,995027	125,31
3,52730	8,10361	0,999057	118,21	0,995260	124,13
3,52730	10,1295	0,999199	116,59	0,995383	123,19
7,03631	0,509203	1,00008 ₉	120,53	0,996295	125,86
7,05461	1,01295	1,00012 ₂	117,93	0,996326	122,61
7,05461	4,05180	1,00032 ₂	115,23	0,996497	123,67
7,05461	8,10361	1,00057 ₂	116,77	0,996717	124,86
7,05461	10,1295	1,00069 ₇	117,05	0,996842	123,59
8,83948	0,511755	1,00084 ₃	117,49	0,997031	118,08
8,81826	1,01295	1,00087 ₇	114,51	0,997057	122,92
8,81826	4,05180	1,00108 ₀	113,54	0,997237	121,71
8,81826	8,10361	1,00132 ₉	116,13	0,997464	122,89
8,81826	10,1295	1,00145 ₄	116,56	0,997577	123,26

En cuanto a los cambios con la temperatura, se observa que el aumento de dicha temperatura incrementa los valores de los volúmenes molares aparentes de la teofilina cuando está en presencia de β -CD; por el contrario, cuando la teofilina se encuentra en presencia de HP- β -CD, el comportamiento es el opuesto y se observa un descenso en estos valores molares aparentes.

Tabla 7.14. Densidades, ρ , y volúmenes molares aparentes, ϕ_v , para las disoluciones acuosas de teofilina en presencia de hidroxipropil- β -ciclodextrina, a 298,15 K y 310,15 K

		T= 298,15 K		T= 310,15 K	
$10^3 m_{\beta\text{-CD}}$	$10^3 m_{\text{teofilina}}$	ρ	ϕ_v	ρ	ϕ_v
/(mol kg ⁻¹)	/(mol kg ⁻¹)	/(g cm ⁻³)	/(cm ³ mol ⁻¹)	/(g cm ⁻³)	/(cm ³ mol ⁻¹)
0,419669	0,505612	0,997293	136,69	0,993566	134,04
0,419669	1,00320	0,997323	128,62	0,993599	123,73
0,419669	4,01280	0,997495	124,47	0,993771	123,61
0,419669	8,02560	0,997716	124,88	0,993989	124,89
0,419669	10,0320	0,997834	124,20	0,994118	123,05
0,839338	0,505612	0,997510	130,29	0,993777	126,69
0,839338	1,00320	0,997537	127,30	0,993809	121,87
0,839338	4,01280	0,997714	123,08	0,993982	122,65
0,839338	8,02560	0,997948	122,52	0,994217	122,33
0,839338	10,0320	0,998064	122,47	0,994330	122,72
3,35735	0,505612	0,998789	127,99	0,995026	124,62
3,35735	1,00320	0,998822	121,19	0,995060	118,55
3,35735	4,01280	0,999001	120,79	0,995238	120,46
3,35735	8,02560	0,999226	122,44	0,995492	118,84
3,35735	10,0320	0,999341	122,58	0,995594	120,93
6,71470	0,505612	1,00049 ₅	126,03	0,996691	122,34
6,71470	1,00320	1,00052 ₈	119,60	0,996725	117,03
6,71470	4,01280	1,00071 ₂	119,12	0,996915	117,13
6,71470	8,02560	1,00094 ₁	121,14	0,997166	117,42
6,71470	10,0320	1,00106 ₃	120,66	0,997266	120,01
8,39338	0,505612	1,00134 ₉	123,22	0,997523	121,70
8,39338	1,00320	1,00138 ₂	117,80	0,997558	115,85
8,39338	4,01280	1,00156 ₁	120,04	0,997738	119,35
8,39338	8,02560	1,00179 ₈	120,51	0,997994	117,81
8,39338	10,0320	1,00190 ₅	121,68	0,998109	118,83

La justificación a este comportamiento hay que buscarla, al igual que en el caso de la cafeína en estos mismos medios mixtos, en el hecho de que la cavidad hidrofóbica de estas ciclodextrinas constituye un entorno muy adecuado para que tenga lugar la formación de complejos de inclusión teofilina-ciclodextrina, lo que potencia el predominio de las interacciones entre ambas sustancias a medida que su concentración es mayor en el medio, con el resultado de una disminución en el volumen de la disolución. El aumento de la

temperatura hace que también lo haga el tamaño de los huecos presentes en la estructura del disolvente acuoso, facilitando así el acomodo de estos complejos teofilina-ciclodextrina en el medio estructurado y la aparición de una componente de interacción de carácter hidrofílico que produce un aumento en la estructura del medio y, consiguientemente, un aumento de volumen, que tiende a contrarrestar la caída en el volumen molar aparente derivada de la formación de los mencionados complejos de inclusión.

Aplicando la ecuación (2.1.10) (capítulo 2) se han obtenido los valores del volumen aparente a concentración infinitesimal, ϕ_v^0 , para la teofilina en presencia de las diferentes ciclodextrinas, a 298,15 K y 310,15 K, valores que se encuentran recogidos en la tabla 7.15. Asimismo, mediante la ecuación (7.1.2) se han calculado los valores de los volúmenes molares parciales de transferencia, $\Delta\phi_v^0$, cuya variación frente a la composición del disolvente mixto, permite visualizar el cambio que ocurre en las interacciones entre las moléculas de soluto y de disolvente. Estos valores de $\Delta\phi_v^0$ están también recogidos en la referida tabla 7.15.

Se observa que los valores de $\Delta\phi_v^0$ son siempre negativos y crecientes, en valor absoluto, con el aumento de la concentración de las ciclodextrinas, a ambas temperaturas estudiadas, aunque a la temperatura superior dicho aumento del valor negativo con el aumento de la concentración de ciclodextrina presente, tiende a amortiguarse. El efecto es más acentuado para la teofilina en presencia de HP- β -CD. Esto viene a indicar que, con independencia de la temperatura, la presencia de la ciclodextrina en el medio provoca la disminución del volumen de la disolución y que esta disminución es cada vez más importante a medida que hay presente mayor cantidad de la ciclodextrina. Puesto que estos valores corresponden a la situación de concentración infinitesimal, esta disminución del volumen de la disolución tiene que ser debida, únicamente, a las interacciones que se producen entre las moléculas del soluto (teofilina) y del disolvente (agua y, principalmente, la ciclodextrina).

Tabla 7.15. Volúmenes molares parciales a concentración infinitesimal, ϕ_V^0 , y volúmenes molares parciales de transferencia, $\Delta\phi_V^0$, para disoluciones acuosas de teofilina en presencia de ciclodextrinas, a 298,15 K y 310,15 K.

$10^3 m_{\beta-CD}$ /(mol kg ⁻¹)	ϕ_V^0 /(cm ³ mol ⁻¹)	$\Delta\phi_V^0$ /(cm ³ mol ⁻¹)	$10^3 m_{HP-\beta-CD}$ /(mol kg ⁻¹)	ϕ_V^0 /(cm ³ mol ⁻¹)	$\Delta\phi_V^0$ /(cm ³ mol ⁻¹)
T = 298,15 K					
0.000000	143.2 (± 0.7)				
0.439680	136.8 (± 2.4)	-6.33	0.419669	135.6 (± 3.5)	-7.57
0.878307	130.4 (± 2.7)	-12.75	0.839330	130.9 (± 1.5)	-12.21
3.52730	122.9 (± 2.9)	-20.25	3.35735	125.3 (± 3.0)	-17.86
7.05460	119.9 (± 1.7)	-23.40	6.71470	123.5 (± 2.9)	-19.67
8.81826	115.5 (± 1.8)	-27.62	8.39338	120.4 (± 2.3)	-22.77
T = 310,15 K					
0.000000	145.9 (± 0.9)				
0.439680	136.5 (± 2.5)	-9.48	0.419669	131.0 (± 4.2)	-14.90
0.878307	130.6 (± 2.5)	-15.34	0.839338	125.1 (± 1.9)	-20.84
3.52730	126.9 (± 1.6)	-17.04	3.35735	122.4 (± 2.6)	-23.52
7.05460	124.4 (± 1.4)	-21.51	6.71470	119.8 (± 2.6)	-26.10
8.81826	119.2 (± 1.8)	-26.76	8.39338	119.4 (± 2.4)	-26.55

Los valores que aparecen entre paréntesis corresponden a las desviaciones estándar

Si tenemos en cuenta la analogía entre las estructuras de la cafeína y de la teofilina, podemos considerar que los tipos de interacciones establecidos en el modelo de Friedman y Krishnan [14], contemplados en el apartado (7.1.1), para explicar los cambios de volumen que acompañan a la transferencia de la cafeína desde agua hasta agua + ciclodextrina, son también aplicables en este caso de transferencia de la teofilina.

Como ya ha sido comentado con anterioridad en otros pasajes de esta Memoria de Tesis Doctoral, esta disminución del volumen de la disolución se debe, principalmente, a la formación de complejos de inclusión teofilina-ciclodextrina. El hecho de que $\Delta\phi_V^0$ sea cada vez más negativo a medida que aumenta la cantidad de ciclodextrina en el medio disuelto, es una indicación de que la disminución que experimenta el volumen de la disolución es cada vez mayor y que es la presencia de la ciclodextrina la que causa tal disminución. En consecuencia, a medida que crece la concentración de ciclodextrina en el medio, lo hace

también la cantidad de estructuras complejas de inclusión teofilina-ciclodextrina. Esto es, las interacciones del tipo hidrofílico–hidrofóbico ó entre grupos hidrofóbicos predominan sobre las del tipo hidrofílico-iónico y/ó entre grupos hidrofílicos. Además de lo anterior, dado que las variaciones de volumen determinadas en ambos medios mixtos son prácticamente de la misma magnitud, hay que colegir que la inclusión no parece depender de la sustitución de los grupos hidroxilo por los grupos hidroxipropil.

Acudiendo al modelo anteriormente utilizado para el caso de la cafeína (ecuación (2.2.7), capítulo 2) y cuantificando los cambios que ocurren en la disolución, en términos de las variaciones que se observan en los volúmenes, es posible obtener los valores de K y de $\phi_{V,c}$, volumen molar aparente de la especie compleja. Tales valores se encuentran recogidos en la Tabla 7.16 junto con los valores correspondientes a los volúmenes de transferencia, de la teofilina y de la ciclodextrina, desde la disolución en agua, a la disolución mixta. De la observación de los valores recogidos en la tabla 7.16, puede concluirse que existe un buen acuerdo entre los valores de $\phi_{V,f}$ obtenido mediante este procedimiento de ajuste, los datos correspondientes a los sistemas binarios (disolvente agua pura) anteriormente medidos y los publicados en la literatura científica.

Tabla 7.16. Propiedades termodinámicas del proceso de complejación de las ciclodextrinas con teofilina a 298,15 y 310,15 K.

	K /(kg·mol ⁻¹)	$\phi_{V,cTeof}$ /(cm ³ ·mol ⁻¹)	$\Delta\phi_{V,cTeof}$ /(cm ³ ·mol ⁻¹)	$\phi_{V,cCD}$ /(cm ³ ·mol ⁻¹)	$\Delta\phi_{V,cCD}$ /(cm ³ ·mol ⁻¹)
298,15 K					
β -CD	30,53	115,6 (± 0,5)	-24,87	596 (± 43)	-109,82
HP- β -CD	78,71	121,3 (± 0,5)	-19,17	813 (± 18)	-51,22
310,15 K					
β -CD	16,56	122,9 (± 0,3)	-20,31	569 (± 78)	-149,38
HP- β -CD	48,47	119,7 (± 0,6)	-23,56	788 (± 66)	-93,64

A partir de los datos de la tabla 7.15 es posible afirmar que ocurre asociación entre las moléculas de teofilina y las moléculas de las ciclodextrinas en disolución acuosa. Los valores obtenidos para las constantes de estabilidad que cuantifican esta asociación son muy diferentes a los que, en condiciones análogas, están recogidos en la literatura. En efecto, mientras que a partir de medidas calorimétricas se ha concluido la no existencia de este tipo

de estructuras asociadas ($K_{\text{HP-}\beta\text{-CD-Teof}} \approx 0$) o, en todo caso, la existencia de una muy débil asociación ($K_{\beta\text{-CD-Teof}} \approx 2 \text{ kg mol}^{-1}$) entre la teofilina y las ciclodextrinas, los valores obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral indican claramente todo lo contrario. Y de nuevo, las constantes de estabilidad encontradas en presencia de la HP- β -CD son más elevadas que las halladas para las disoluciones con presencia de β -CD. Es decir, el proceso de inclusión de las moléculas de teofilina en la cavidad de las moléculas de HP- β -CD que ocurre en disolución acuosa, es sensible a las diferencias estructurales de las ciclodextrinas, esto es, a la sustitución parcial de grupos hidroxilo por grupos hidroxipropil, alrededor de la cavidad de los macrociclos.

Lo que resulta claramente evidente es que el proceso de asociación que tiene lugar, genera una disminución del volumen de transferencia tanto en la ciclodextrina como en la teofilina cuyo valor posee, en general, un sentido inverso al valor de la constante de asociación. Es decir, mayores valores para las constantes de estabilidad significan menores variaciones de volumen en el proceso de formación del complejo.

El aumento de temperatura produce, como en el caso de la cafeína, la lógica disminución en el valor de la constante de estabilidad de estas estructuras de asociación teofilina-ciclodextrinas, para ambas ciclodextrinas estudiadas.

Si analizamos los valores de $\Delta\phi_{V,c}$ de la tabla 7.16, correspondientes a los complejos formados teofilina-ciclodextrina, se observa que para ambas ciclodextrinas estos valores son siempre negativos, tanto en relación a la teofilina como a la ciclodextrina, para las dos temperaturas ensayadas. Esto implica que la formación de estos complejos ocasiona una disminución de volumen, en relación al que tienen las moléculas libres de estas sustancias. Esto hay que interpretarlo considerando, de una parte, el aumento de volumen de la disolución como consecuencia de la sustitución de las moléculas de agua situadas inicialmente en la cavidad de la ciclodextrina, por una molécula huésped [17-19]. Pero, además, hay que considerar que la formación del complejo de inclusión requiere la previa destrucción parcial de la esfera de hidratación de la molécula de teofilina, lo que da origen a una disminución del volumen de la disolución [14], disminución que puede ser mayor si va acompañada de la formación de enlaces por puentes de hidrógeno [20]. Puesto que el signo final de $\Delta\phi_{V,c}$ es negativo, resulta evidente que el efecto de disminución de volumen debe predominar, especialmente en el caso de la β -CD en el que los valores encontrados para $\Delta\phi_{V,c}$ son mayores. Esto significa que la asociación entre la teofilina y la ciclodextrina correspondiente, depende de la estructura de la ciclodextrina. Lo que es equivalente a afirmar

que la formación de los complejos de inclusión teofilina-ciclodextrina no es una cuestión relacionada únicamente con las interacciones que pueden producirse entre aquella y la cavidad de la ciclodextrina.

El aumento de la temperatura incrementa notablemente los valores absolutos (negativos) de $\Delta\phi_{V,c}$, hecho éste que debe relacionarse con un mayor efecto de rotura de la estructura de la disolución a consecuencia de la componente térmica.

7.2.2. Viscosidad

El estudio de la viscosidad de las disoluciones conteniendo teofilina se ha realizado siguiendo el mismo formato utilizado para el caso de la cafeína. Es decir, se ha considerado a la mezcla agua + ciclodextrina como un disolvente mixto. En consecuencia, la concentración de la ciclodextrina se ha mantenido siempre constante, con el fin de analizar los cambios originados al variar la concentración de teofilina en el medio. De ese modo, estos cambios de la viscosidad de las disoluciones son atribuibles, únicamente, a la cantidad de teofilina presente en el medio, para cada composición relativa del disolvente mixto. Posteriormente, se ha considerado el cambio de estos valores de viscosidad con relación a los que se obtuvieron en medio acuoso, para evaluar los parámetros de transferencia desde el agua al disolvente mixto agua + ciclodextrina. Siguiendo este patrón, se obtuvo información acerca del tipo de interacciones que ocurren en la disolución, buscando comprender cómo la composición del medio induce cambios en las interacciones entre el soluto y el disolvente en la disolución.

Se midió la viscosidad de las disoluciones de teofilina en diversas mezclas agua + ciclodextrina en las que la concentración de ésta última se mantuvo constante. En las tablas 7.17 y 7.18 se presentan los resultados experimentales obtenidos para las viscosidades de estas disoluciones de teofilina en las mezclas agua + ciclodextrina estudiadas, a 298,15 K y 310,15 K. En todos los casos ensayados, la desviación estándar de las medidas de viscosidad fue inferior a $4,2 \times 10^{-4}$.

Tabla 7.17. Viscosidad de las disoluciones acuosas de teofilina en presencia de β -ciclodextrina, a 298,15 K y 310,15 K.

$10^3 m_{\beta\text{-CD}}$ /(mol·kg ⁻¹)	$10^3 m_{\text{teofilina}}$ /(mol·kg ⁻¹)	T = 298,15 K	T = 310,15 K
		η /cP	η /cP
0,884839	1,01559	0,8925	0,6934
0,882710	2,03430	0,8929	0,6935
0,878307	4,04210	0,8940	0,6940
0,878307	6,01180	0,8953	0,6945
0,878307	8,08421	0,8963	0,6952
0,878307	10,1053	0,8977	0,6959
3,51816	1,01804	0,8971	0,6991
3,54503	1,98094	0,8982	0,6994
3,52730	4,05180	0,8998	0,6999
3,52730	5,99503	0,9011	0,7005
3,52730	8,10361	0,9026	0,7013
3,52730	10,1295	0,9039	0,7023
7,03631	1,01295	0,9034	0,7065
7,05461	2,08815	0,9046	0,7067
7,05461	4,05180	0,9067	0,7072
7,05461	5,99743	0,9083	0,7078
7,05461	8,10361	0,9104	0,7087
7,05461	10,1295	0,9119	0,7097
8,83948	1,01295	0,9071	0,7102
8,81826	1,98190	0,9088	0,7103
8,81826	4,05180	0,9116	0,7107
8,81826	6,02899	0,9140	0,7116
8,81826	8,10360	0,9162	0,7124
8,81826	10,1295	0,9178	0,7132

Estos valores experimentales se ajustaron a la ecuación de Jones-Dole [21] (ecuación (3.1.1) del capítulo 3) y se obtuvieron los correspondientes a los parámetros A y B . Al igual que como se procedió en el caso de la cafeína, el coeficiente D de esta ecuación (7.10) no se tuvo en cuenta, ya que el estudio se realizó en el rango de concentraciones diluidas. Los valores obtenidos para estos coeficientes A y B se presentan en la tabla 7.19, para las temperaturas de 298,15 y 310,15 K. En dicha tabla se presentan, además, los valores que se encontraron en agua pura para estos mismos coeficientes; valores que ya fueron analizados en el capítulo relativo al estudio de los sistemas binarios.

Tabla 7.18. Viscosidad de las disoluciones acuosas de teofilina en presencia de hidroxipropil- β -ciclodextrina, a 298,15 K y 310,15 K.

		T = 298,15 K	T = 310,15 K
$10^3 m_{\text{HP-}\beta\text{-CD}}$	$10^3 m_{\text{teofilina}}$	η	η
/ (mol·kg ⁻¹)	/ (mol·kg ⁻¹)	/cP	/cP
0,839338	1,00320	0,8930	0,6954
0,839338	4,01280	0,8958	0,6976
0,839338	8,02560	0,8982	0,6998
0,839338	10,0320	0,8991	0,7004
3,35735	1,00320	0,8989	0,7050
3,35735	4,01280	0,9036	0,7089
3,35735	8,02560	0,9078	0,7124
3,35735	10,0320	0,9092	0,7137
6,71470	1,00320	0,9061	0,7175
6,71470	4,01280	0,9122	0,7223
6,71470	8,02560	0,9174	0,7271
6,71470	10,0320	0,9187	0,7283
8,39338	1,00320	0,9104	0,7240
8,39338	4,01280	0,9181	0,7302
8,39338	8,02560	0,9249	0,7357
8,39338	10,0320	0,9261	0,7374

Se determinaron, igualmente, los valores correspondientes a los coeficientes de viscosidad de transferencia para la teofilina, ΔB , desde el agua hasta las diferentes mezclas agua + ciclodextrina estudiadas, aplicando para ello la ecuación (7.1.4). Estos valores se presentan, también, en la tabla 7.19, a las temperaturas de 298,15 y 310,15 K.

De la observación de los valores de la tabla 7.19 puede señalarse que, a ambas temperaturas, el coeficiente A presenta valores que son relativamente pequeños, pero no nulos. Puesto que este parámetro está relacionado con las interacciones de largo alcance que tienen lugar entre las moléculas de los solutos presentes, tal circunstancia indica que en estos medios tienen lugar interacciones débiles soluto-soluto. Un análisis más pormenorizado de los valores encontrados para el parámetro A , pone de manifiesto que, en presencia de HP- β -CD, estos valores de A crecen, de manera importante a la temperatura inferior ensayada de 298,15 K y más moderadamente a la temperatura de 310,15 K, a medida que aumenta la cantidad presente de la ciclodextrina. Sin embargo, cuando se trata de la β -CD, dicho aumento, moderado, se observa únicamente a 298,15 K, permaneciendo A en valores

relativamente constantes con el aumento de la cantidad de la ciclodextrina presente, cuando la temperatura aumenta hasta los 310,15 K.

Tabla 7.19: Coeficientes A y B de viscosidad y coeficiente de viscosidad de transferencia, ΔB , para las disoluciones acuosas de teofilina en presencia de ciclodextrinas, a 298,15 y 310,15 K.

$10^3 m_{\beta-CD}$ /(mol·dm ⁻³)	$A /$ (dm ^{3/2} ·mol ^{-1/2})	$B /$ (dm ³ ·mol ⁻¹)	$\Delta B /$ (dm ³ ·mol ⁻¹)	$10^3 m_{HP-\beta-CD}$ (mol·dm ⁻³)	$A /$ (dm ^{3/2} ·mol ^{-1/2})	$B /$ (dm ³ ·mol ⁻¹)	$\Delta B /$ (dm ³ ·mol ⁻¹)
T = 298,15 K							
0,000000	-0,012	0,3094	0	0,000000			0
0,878307	-0,005	0,689	0,380	0,839338	0,003	0,535	0,226
3,52730	0,014	0,707	0,398	3,35735	0,059	0,800	0,491
7,05460	0,018	0,894	0,585	6,71470	0,087	0,862	0,553
8,81826	0,049	0,923	0,613	8,39338	0,127	0,935	0,626
T = 310,15 K							
0,000000	-0,021	1,028	0	0,000000			0
0,878307	-0,019	0,538	-0,490	0,839338	0,043	0,545	-0,483
3,52730	-0,017	0,626	-0,402	3,35735	0,054	0,942	-0,086
7,05460	-0,020	0,647	-0,382	6,71470	0,073	1,11	0,082
8,81826	-0,023	0,652	-0,376	8,39338	0,098	1,28	0,256

Como ya se comentó al analizar los resultados obtenidos para la cafeína, una posible explicación a este comportamiento puede obtenerse considerando la posible formación de complejos no de inclusión, teofilina-HP- β -CD, inducida por la presencia de los grupos hidroxipropil de esta ciclodextrina. Cuando la temperatura aumenta hasta los 310,15 K, estas interacciones soluto-soluto deben verse debilitadas por el movimiento térmico.

En el caso de la teofilina, los valores encontrados para el coeficiente de B son positivos y aumentan, a ambas temperaturas estudiadas, cuando lo hace la concentración de la ciclodextrina en la disolución, especialmente con la HP- β -CD. Si se tiene en cuenta que este parámetro informa acerca de las interacciones de corto alcance entre las moléculas del soluto y las del disolvente, hay que concluir que a medida que se incrementa la presencia de la ciclodextrina en el medio, las interacciones soluto-disolvente-ciclodextrina van creciendo en importancia. Ya que estas interacciones son las causantes de que haya una mayor estructuración de la disolución (carácter *structure making* del soluto) [22], se concluye que la

teofilina posee, en ambos disolventes mixtos agua + ciclodextrina y a ambas temperaturas estudiadas, un carácter formador de estructura (*structure making*), que es más acentuado en presencia de la HP- β -CD. Además de ello, a medida que hay mayor presencia de ciclodextrina en el medio, este carácter formador de estructura se acrecienta, lo que se traduce en que las disoluciones están más estructuradas (hay mayor número de enlaces entre las moléculas presentes) a medida que hay más cantidad de ciclodextrina en el medio.

Tal comportamiento es análogo al mostrado por la cafeína en estos medios conteniendo las ciclodextrinas. No obstante, hay que destacar varios hechos de cierta importancia. En presencia de β -CD y a 298,15 K, los valores del coeficiente B que se obtienen para la teofilina son muy superiores a los encontrados para la cafeína ($B_{teof} \gg B_{caf}$, aproximadamente un 50% mayores), a la misma concentración de la ciclodextrina. Esto significa que, a esta temperatura más baja, el carácter formador de estructura (*structure making*) de la teofilina es muy superior al que exhibe la cafeína. Sin embargo, a medida que la concentración de la β -CD en el medio crece, se observa que los valores de este coeficiente B tienden a equilibrarse ($B_{teof} \approx B_{caf}$) y con él, el carácter formador de estructura de ambas teofilina y cafeína. La situación es diferente a la temperatura mayor estudiada (310,15 K). En efecto, aunque los valores de B encontrados para la teofilina son superiores a los obtenidos para la cafeína ($B_{teof} > B_{caf}$), a igualdad de concentración de β -CD, no lo son tanto (en torno al 20% superiores) aunque van haciéndose cada vez relativamente mayores a medida que aumenta la concentración de β -CD en el medio. Esto es, el carácter formador de estructura de la teofilina va acentuándose cada vez más, con el aumento de β -CD presente.

En presencia de la HP- β -CD, la situación es muy similar. A ambas temperaturas los valores encontrados para B de la teofilina son superiores a los hallados para la cafeína ($B_{teof} > B_{caf}$), a igualdad de concentración de HP- β -CD, aunque a 310,15 K las diferencias son algo menores (en torno a un 8-10% menores).

Por otra parte, al igual que se observó con la cafeína, el aumento de temperatura desde 298,15 hasta 310,15 K provoca una disminución en los valores de B_{teof} , para la misma composición del disolvente mixto agua + ciclodextrina, cuando ésta es la β -CD, y conlleva a un aumento de los valores de este parámetro, B_{teof} , cuando se trata de la HP- β -CD. En consecuencia, $dB/dT < 0$ en presencia de β -CD y $dB/dT > 0$ en presencia de HP- β -CD; en ambos casos, el valor absoluto del coeficiente de temperatura crece con la concentración de ciclodextrina presente en la disolución. De acuerdo con los señalado por Marcus [23] y Nightingale [24] tal comportamiento se corresponde con el característico de un soluto

formador de estructura (*structure making*) y formador de estructura “anómalo” (si se considera conjuntamente este valor positivo de dB/dT , con el valor del coeficiente B , también positivo), en presencia de β -CD y HP- β -CD, respectivamente, con presencia de intensas interacciones soluto-disolvente-codisolvente, tal como ya se discutió con anterioridad, al analizar el comportamiento de la cafeína en estos medios mixtos agua + ciclodextrina.

En resumen, al igual que se concluyó al analizar el comportamiento de la cafeína en presencia de estas ciclodextrinas, hay que señalar que también la teofilina disuelta en estos medios con presencia de estas ciclodextrinas, propicia la formación de complejos teofilina-ciclodextrina (que pueden ser, o no, de inclusión), que contribuye a que el medio incremente su estructuración.

También se han calculado los coeficientes de viscosidad de transferencia, ΔB , de la teofilina desde su disolución en agua pura hasta las mezclas agua + ciclodextrina, a las concentraciones estudiadas, usando para ello la ecuación (7.1.4) [13]. Los valores calculados se presentan en la tabla 7.19. Se observa que, al igual que en el caso de la cafeína, estos valores de ΔB son positivos a 298,15 K, en ambas mezclas agua + ciclodextrina, pero son negativos a la temperatura de 310,15 K. También en presencia de ambas ciclodextrinas, los valores de ΔB crecen a medida que hay mayor cantidad de ciclodextrina presente aunque, con la teofilina, este crecimiento muestra una mayor intensidad cuando en el medio hay HP- β -CD, indicando que el carácter formador de estructura (*structure-making*) de la teofilina es mayor en presencia de la HP- β -CD que en presencia de la β -CD.

Cuando la temperatura se eleva hasta 310,15 K, no cambia únicamente el signo de ΔB , que se hace negativo, sino que también cambia la tendencia de su magnitud que evoluciona hacia valores menos negativos (llegando a alcanzar valores positivos en el caso de las concentraciones más altas de la HP- β -CD) con el aumento de la ciclodextrina en la disolución. Esto significa que, a esta temperatura de 310,15 K, inicialmente la presencia de la ciclodextrina en la disolución provoca una caída muy pronunciada en el carácter formador de estructura (*structure-making*) que presenta la teofilina en medio acuoso (signo negativo para este parámetro). Pero a medida que hay más cantidad de la ciclodextrina en la disolución, dicho carácter formador de la estructura del disolvente se va recuperando progresivamente. Al igual que sucede en el caso de la cafeína, la recuperación del carácter formador de estructura de la teofilina, es más evidente con la HP- β -CD que con la β -CD.

En las figuras 7.4 y 7.5 se presentan las líneas de tendencia de los coeficientes de

transferencia de la teofilina, ΔB , desde el agua hasta las diferentes disoluciones mixtas agua + ciclodextrina, a 298,15 K y 310,15 K, así como las líneas de tendencia de los volúmenes molares parciales de transferencia, $\Delta\phi_V^0$, obtenidos para estas mismas disoluciones, a fin de que puedan realizarse las pertinentes comparaciones.

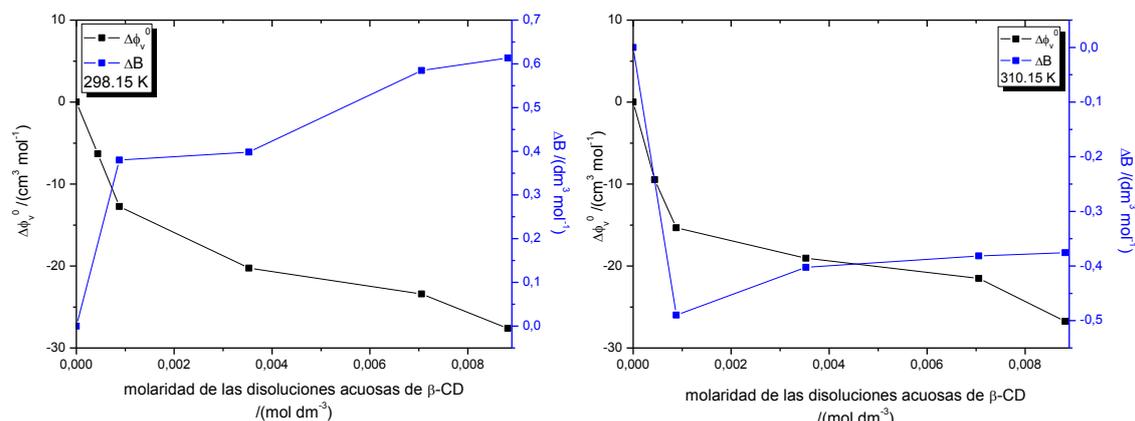


Figura 7.4. Volúmenes molares parciales de transferencia, $\Delta\phi_V^0$ (—■—) y coeficientes de viscosidad de transferencia, ΔB , (—■—) de la teofilina desde el agua hasta diferentes disoluciones acuosas de β -ciclodextrina, a 298,15 K y 310,15 K

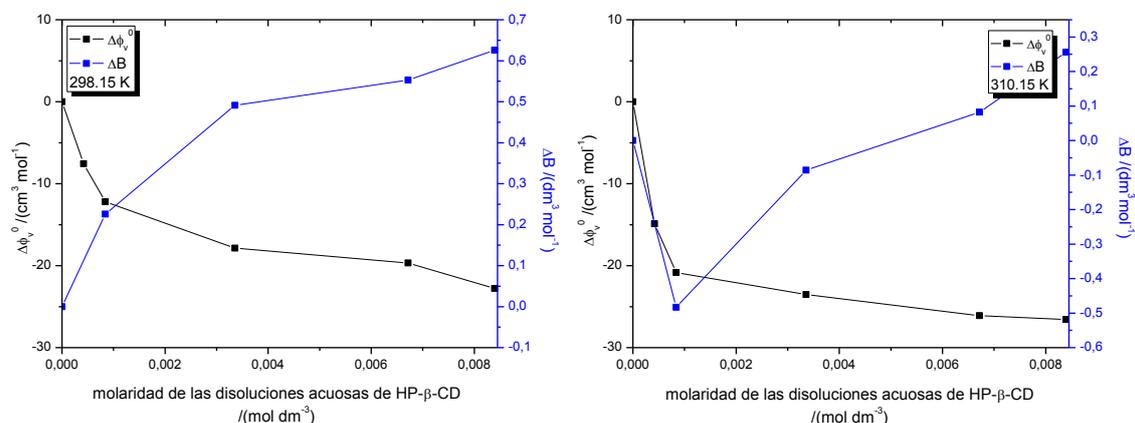


Figura 7.5. Volúmenes molares parciales de transferencia $\Delta\phi_V^0$, (—■—) y coeficientes de viscosidad de transferencia, ΔB , (—■—) de la teofilina desde el agua hasta diferentes disoluciones acuosas de hidroxipropil- β -ciclodextrina, a 298,15 K y 310,15 K

Al igual que en el caso de la cafeína, los resultados obtenidos para el coeficiente de viscosidad de transferencia, ΔB , refuerzan el análisis de los volúmenes molares aparentes de

la teofilina en estas disoluciones acuosas con presencia de moléculas de ciclodextrinas y los datos del coeficiente B de viscosidad obtenidos. Es decir, todos estos datos evidencian que la presencia de las ciclodextrinas en las disoluciones de teofilina, promueven la aparición de interacciones entre las moléculas de la ciclodextrina y las de la teofilina. Estas interacciones, incluso, predominan sobre las que tienen lugar entre las propias moléculas de teofilina, especialmente a la temperatura de 298,15 K. Cuando la temperatura se eleva a 310,15 K esas interacciones se debilitan.

7.2.3. Difusión

Para comprender de qué forma la difusión de la teofilina se ve afectada por la presencia de solutos macromoleculares en la disolución, se llevaron adelante estudios de los sistemas acuosos teofilina- β -CD y teofilina-HP- β -CD, a las temperaturas de 298,15 y 310,15 K. Las medidas se realizaron en dos laboratorios independientes (en las Universidades de Coimbra y de Nápoles), aunque en ambos laboratorios la técnica de medida utilizada fue la misma: el método de dispersión de Taylor, con el objetivo de comprobar la reproducibilidad de los resultados. De estos estudios se obtuvieron los coeficientes que describen el proceso de difusión y, a partir de ellos, se estimaron valores de las constantes de asociación de estos sistemas.

7.2.3.1 Influencia de la presencia de β -ciclodextrina sobre la difusión de la teofilina

Los valores medios de los coeficientes de difusión D_{11} , D_{12} , D_{21} y D_{22} , para el sistema ternario β -CD (1)+ teofilina (2) + agua, a 298,15 K [34] y 310,15 K, se muestran en la tabla 7.20. En todos los casos, la incertidumbre que acompaña a estos valores es del 1-2 %.

Del análisis de estos datos experimentales se verifica que, en general, D_{11} y D_{22} presentan valores menores a los obtenidos para los correspondientes sistemas acuosos binarios, D_1 y D_2 , (tablas 6.13 y 6.8 del capítulo 6), con desviaciones que oscilan, respectivamente, entre el 2 y el 4% para la ciclodextrina y que pueden alcanza hasta un 18% para el caso de la teofilina a la temperatura más elevada.

Los coeficientes de difusión secundarios son, por lo general, negativos. Para las concentraciones de solutos más bajas (en especial de la ciclodextrina), éstos presentan valores que pueden considerarse cero, dentro del error experimental. Para las concentraciones más elevadas, llegan a alcanzar valores que sugieren la posibilidad de que pueda producirse la

inclusión de las moléculas de teofilina en el interior de la cavidad de la ciclodextrina.

Tabla 7.20. Coeficientes de difusión ternaria, D_{11} , D_{12} , D_{21} y D_{22} , para el sistema β -ciclodextrina (1) + teofilina (2) + agua a 298,15 y 310,15 K

C_1^a	C_2^a	$D_{11} \pm S_D^b$ /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	$D_{12} \pm S_D^b$ /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	$D_{21} \pm S_D^b$ /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	$D_{22} \pm S_D^b$ /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{12}/D_{22}^c	D_{21}/D_{11}^d
T=298,15 K							
0,002	0,002	0,321 ± 0,009	-0,003 ± 0,017	0,004 ± 0,005	0,721 ± 0,032	-0,005	0,012
0,002	0,005	0,322 ± 0,007	-0,006 ± 0,017	0,003 ± 0,017	0,709 ± 0,030	-0,008	0,009
0,002	0,010	0,319 ± 0,009	-0,005 ± 0,019	0,006 ± 0,008	0,680 ± 0,027	-0,007	0,019
0,005	0,005	0,316 ± 0,005	0,005 ± 0,023	-0,024 ± 0,040	0,683 ± 0,034	0,008	-0,075
0,000	0,010	0,323 ± 0,009	-0,001 ± 0,021	0,022 ± 0,006	0,722 ± 0,011	-0,002	0,068
0,010	0,000	0,315 ± 0,014	-0,085 ± 0,024	-0,001 ± 0,036	0,805 ± 0,011	-0,105	-0,005
0,010	0,002	0,310 ± 0,005	-0,039 ± 0,016	-0,029 ± 0,040	0,709 ± 0,021	-0,055	-0,093
0,010	0,005	0,305 ± 0,048	-0,033 ± 0,110	-0,053 ± 0,052	0,640 ± 0,077	-0,052	-0,174
0,010	0,010	0,309 ± 0,006	-0,016 ± 0,030	-0,063 ± 0,022	0,628 ± 0,017	-0,026	-0,202
T=310,15 K							
0,002	0,002	0,436 ± 0,008	0,005 ± 0,009	0,033 ± 0,006	0,991 ± 0,007	0,005	0,077
0,005	0,005	0,430 ± 0,012	0,020 ± 0,011	-0,065 ± 0,022	0,898 ± 0,001	0,023	-0,151
0,010	0,002	0,429 ± 0,009	0,040 ± 0,024	-0,060 ± 0,019	0,901 ± 0,005	0,044	-0,139
0,010	0,005	0,424 ± 0,009	0,032 ± 0,017	-0,038 ± 0,017	0,863 ± 0,008	0,037	-0,090
0,010	0,010	0,417 ± 0,006	0,022 ± 0,010	-0,048 ± 0,016	0,795 ± 0,002	0,028	-0,116

^(a) Unidades: (mol dm⁻³); ^(b) S_D representa la desviación estándar de todas las medidas realizadas;

^(c) D_{12}/D_{22} representa el número de moles de β -CD transportados por 1 mol de teofilina;

^(d) D_{21}/D_{11} representa el número de moles de teofilina transportados por 1 mol de β -CD.

Efectivamente, si se analizan los coeficientes secundarios D_{12} y D_{21} , se observa un aumento en sus valores, no despreciable, en presencia de β -CD 10 mM, a ambas temperaturas. Por otra parte, a partir de estos resultados se observa que, para las mezclas con β -CD 10 mM, la cantidad de teofilina “*contra-transportada*” (debido al signo negativo que presenta D_{21}/D_{11}) por cada mol de ciclodextrina que difunde, crece cuando lo hace la presencia de teofilina en el medio, llegando hasta los 0,2 moles de teofilina, a la temperatura de 298,15 K. Cuando incrementa la temperatura hasta los 310,15 K, esta cantidad se ve disminuida, sin que pueda apreciarse una tendencia de cambio definida. Para esas mismas disoluciones se observa, simultáneamente, que a 298,15 K la cantidad de β -CD “*contra-*

transportada” (signo negativo de D_{12}/D_{22}) por cada mol de teofilina que difunde, llega a ser de 0,1 moles y disminuye progresivamente con la mayor presencia de teofilina en el medio. El aumento de la temperatura hasta los 310,15 K, cambia el sentido del transporte “*acoplado*” de la β -CD. En efecto, el signo de D_{12}/D_{22} cambia a positivo, lo que indica un “*co-transporte*” de la ciclodextrina asociado al proceso de la difusión de la teofilina, cuya intensidad tiende a disminuir a medida que aumenta la concentración de teofilina en el medio.

7.2.3.2. Influencia de la hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre la difusión de la teofilina

Los valores medios de los coeficientes de difusión D_{11} , D_{12} , D_{21} y D_{22} para el sistema ternario HP- β -CD (1)+ teofilina (2) + agua, a 298,15 K [34] y 310,15 K, se muestran en la tabla 7.21. En todos los casos, la incertidumbre que acompaña a estos valores es del 1-2 %.

Para el caso de la teofilina en presencia de HP- β -CD se obtienen igualmente coeficientes de difusión principales, D_{11} y D_{22} , inferiores a sus correspondientes binarios, D_1 y D_2 , medidos en las mismas condiciones experimentales (tablas 6.18 y 6.8, del capítulo 6) con desviaciones que alcanzan, respectivamente, hasta el 4% para la ciclodextrina (D_{11} respecto de D_1) y que, del mismo modo que ocurría al analizar en un capítulo precedente la influencia de la presencia de la cafeína en estos medios, dichas desviaciones pueden ser mucho mayores (pudiendo llegar a alcanzar hasta el 25%) para el caso de la teofilina (D_{22} respecto de D_2), a la temperatura más elevada de 310,15 K.

Por otra parte, al comparar estos valores encontrados en presencia de HP- β -CD con los hallados en presencia de β -CD, se evidencian algunas diferencias significativas respecto a lo encontrado en el examen paralelo que se realizó para las disoluciones con presencia de cafeína. Y es que mientras los valores de D_{11} en presencia de HP- β -CD son, como en aquella ocasión, menores que sus correspondientes en presencia de β -CD, a ambas temperaturas, las disminuciones ahora encontradas son de mucha menor cuantía (diferencias entre un 2-5 %). Por el contrario, los valores de D_{22} presentan un comportamiento diferente. En efecto, a 298,15 K, cuando la concentración de HP- β -CD es baja, D_{22} presenta un valor que es superior (en torno al 5%) al encontrado en presencia de β -CD; pero al aumentar la cantidad de HP- β -CD presente, dicho valor de D_{22} se iguala e, incluso, se torna mucho menor que el obtenido en presencia de β -CD (entre un 10-16 % inferior). A 310,15 K, esta situación se mantiene aunque con diferencias que son menos pronunciadas (oscilaciones en torno al 3 - 7 %).

Tabla 7.21. Coeficientes de difusión ternaria, D_{11} , D_{12} , D_{21} y D_{22} , para el sistema hidroxipropil- β -ciclodextrina (1) + teofilina (2) + agua a 298,15 y 310,15 K

C_1^a	C_2^a	$D_{11} \pm S_D^b$ / 10^{-9} ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$D_{12} \pm S_D^b$ / 10^{-9} ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$D_{21} \pm S_D^b$ / 10^{-9} ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$D_{22} \pm S_D^b$ / 10^{-9} ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	D_{12}/D_{22}^c	D_{21}/D_{11}^d
T=298,15 K							
0,002	0,002	0,306 \pm 0,002	0,002 \pm 0,001	0,068 \pm 0,020	0,756 \pm 0,017	0,003	0,222
0,002	0,005	0,305 \pm 0,003	0,002 \pm 0,003	0,070 \pm 0,022	0,736 \pm 0,009	0,003	0,230
0,002	0,010	0,304 \pm 0,008	-0,002 \pm 0,001	0,042 \pm 0,016	0,713 \pm 0,005	-0,002	0,138
0,005	0,002	0,303 \pm 0,007	0,008 \pm 0,008	0,054 \pm 0,019	0,719 \pm 0,008	0,011	0,178
0,005	0,005	0,301 \pm 0,006	0,024 \pm 0,001	0,063 \pm 0,024	0,682 \pm 0,026	0,035	0,211
0,005	0,010	0,300 \pm 0,007	-0,010 \pm 0,002	0,020 \pm 0,028	0,641 \pm 0,020	-0,016	0,067
0,000	0,010	0,303 \pm 0,005	0,009 \pm 0,011	0,032 \pm 0,007	0,644 \pm 0,009	0,002	0,107
0,010	0,000	0,300 \pm 0,003	0,052 \pm 0,014	0,006 \pm 0,011	0,673 \pm 0,013	0,077	0,020
0,010	0,002	0,300 \pm 0,007	0,014 \pm 0,005	0,042 \pm 0,002	0,597 \pm 0,026	0,023	0,140
0,010	0,005	0,299 \pm 0,008	0,023 \pm 0,004	0,056 \pm 0,053	0,570 \pm 0,034	0,040	0,187
0,010	0,010	0,298 \pm 0,005	-0,029 \pm 0,019	-0,009 \pm 0,090	0,548 \pm 0,038	-0,053	-0,031
T=310,15 K							
0,002	0,002	0,411 \pm 0,004	-0,041 \pm 0,007	0,102 \pm 0,072	1,054 \pm 0,026	-0,039	0,248
0,005	0,005	0,408 \pm 0,005	-0,006 \pm 0,001	0,039 \pm 0,023	0,923 \pm 0,010	-0,006	0,095
0,010	0,002	0,406 \pm 0,006	-0,043 \pm 0,015	0,077 \pm 0,039	0,904 \pm 0,013	-0,047	0,189
0,010	0,005	0,406 \pm 0,004	-0,018 \pm 0,012	0,053 \pm 0,018	0,866 \pm 0,004	-0,021	0,130
0,010	0,010	0,406 \pm 0,008	-0,013 \pm 0,008	0,235 \pm 0,046	0,856 \pm 0,020	-0,015	0,578

^(a) Unidades: (mol dm^{-3}); ^(b) S_D representa la desviación estándar de todas las medidas realizadas;

^(c) D_{12}/D_{22} representa el número de moles de HP- β -CD transportados por 1 mol de teofilina;

^(d) D_{21}/D_{11} representa el número de moles de teofilina transportados por 1 mol de HP- β -CD.

Los valores de los coeficientes de difusión secundarios, D_{21} , que presentan por lo general valores diferentes de cero, dentro del error experimental que acompaña a su determinación, pueden ser utilizados para comprender la influencia de la ciclodextrina en la difusión de la teofilina. Es indudable que se observa un aumento relativamente significativo en los valores de D_{21} , principalmente en presencia de la concentración más elevada de HP- β -CD, y a ambas temperaturas. Eso significa que el gradiente de concentración de HP- β -CD produce un “*co-transporte*” acoplado de teofilina (signo positivo de D_{21}/D_{11}) de manera que, a las composiciones ensayadas, 1 mol de HP- β -CD que difunde “*co-transporta*” hasta 0,2 moles de teofilina, valor que alcanza los 0,6 moles cuando aumenta la temperatura. El flujo acoplado de ciclodextrina, provocado por el gradiente de teofilina es, por el contrario, muy pequeño

(no sobrepasa los 0,08 moles por cada mol de teofilina difundente), disminuyendo igualmente con el incremento de la temperatura y sin que parece pueda apreciarse un patrón de comportamiento claro para el mismo.

7.2.3.3. Estimación de las constantes de asociación

En las tablas 7.22 y 7.23 se presentan los valores estimados para las constantes de estabilidad K , calculados mediante la aplicación del modelo teórico propuesto por Paduano *et al.* [28-31] ya descrito anteriormente en este mismo capítulo, al considerar el análisis de los resultados en presencia de la cafeína. Dichos valores de K se determinaron a partir de los obtenidos para los coeficientes de difusión experimentales aquí presentados con anterioridad. Se ha mantenido la hipótesis de que las especies presentes (ciclodextrina y teofilina) pueden originar un complejo del tipo 1:1. También en este caso, el error que acompaña el cálculo de estas constantes de asociación, así como del coeficiente de difusión de la especie compleja, D_{33}^* , es del mismo orden de magnitud que el error experimental de las medidas.

Tabla 7.22: Valores de la constante de asociación K y de los coeficientes de difusión de las especies en equilibrio, D_{11}^* , D_{22}^* , y D_{33}^* estimados para las disoluciones acuosas de teofilina en presencia de β -ciclodextrina, a 298,15 y 310,15 K.

c_2 /(mol·dm ⁻³)	D_{11}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{22}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{33}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	K /(dm ³ ·mol ⁻¹)
T=298,15 K				
0,002		0,770		
0,005	0,317	0,748	0,300 (± 0,012)	28,5 (± 1,4)
0,010		0,720		
T=310,15 K				
0,002		1,064		
0,005	0,436	1,003	0,395 (± 0,027)	22 (± 2,3)
0,010		0,948		

Nota: los datos presentados son únicamente en presencia de una concentración constante de β -CD 10 mM

Para obtener la estimación de K_c a partir de este modelo teórico, D_{11}^* y D_{22}^* se consideraron iguales a los valores de los coeficientes de difusión binarios, D_1 (ciclodextrina) y D_2 (huésped) a la misma concentración, una vez efectuada la corrección por la viscosidad de la disolución, para dicha concentración. Los valores finalmente aceptados para D_{33}^* y K_c son

aquellos que ajustan mejor los datos obtenidos experimentalmente, dentro del error experimental que acompaña a estas determinaciones.

Tabla 7.23: Valores de la constante de asociación K y de los coeficientes de difusión de las especies en equilibrio, D_{11}^* , D_{22}^* , y D_{33}^* estimados para las disoluciones acuosas de teofilina en presencia de hidroxipropil- β -ciclodextrina, a 298,15 y 310,15 K.

c_2 /(mol·dm ⁻³)	D_{11}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{22}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{33}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	K /(dm ³ ·mol ⁻¹)
T=298,15 K				
0,002		0,769		
0,005	0,307	0,746	0,265 (± 0,013)	85 (± 8,6)
0,010		0,719		
T=310,15 K				
0,002		1,042		
0,005	0,406	0,982	0,385 (± 0,012)	39 (± 1,4)
0,010		0,929		

Nota: los datos presentados son únicamente en presencia de una concentración constante de HP- β -CD 10 mM

Los valores encontrados para las constantes de estabilidad, por la aplicación del modelo teórico de Paduano *et al.*, están en un relativo buen acuerdo con los estimados previamente haciendo uso de las medidas volumétricas. No obstante, de nuevo los valores obtenidos para K son inferiores a los previstos y discrepan de los que están recogidos en la literatura científica. La respuesta hay que buscarla, posiblemente, en las aproximaciones del modelo teórico utilizado para realizar el cálculo.

Ciertamente estos resultados experimentales evidencian un efecto significativo de la presencia de la HP- β -CD sobre la teofilina en disolución acuosa. Esto es, se puede identificar una disminución bastante acentuada de D_{33}^* , con respecto a D_{11}^* , mayor de la que sería de esperar si la molécula de teofilina estuviera total o parcialmente incluida en la cavidad de la ciclodextrina. Posiblemente, esto se deba a que tiene lugar asociación tanto en el interior como en el exterior de la cavidad de la ciclodextrina, participando más de una molécula de teofilina y ese es el motivo por el cual ambos D_{22} y D_{33}^* presentan valores que son bastante más pequeños de lo esperado. Es más, los cambios de volumen anteriormente encontrados para el proceso de asociación (relativamente grandes, sobre todo para la ciclodextrina) permiten suponer que no solo la cavidad debe encontrarse involucrada en esta asociación, sino que hay interacciones entre el exterior de la ciclodextrina y la teofilina, posiblemente de

las partes apolares de ambas moléculas. En definitiva, a través de los valores aquí encontrados para los coeficientes de difusión de la especie asociada, se podría asumir, incluso, que debe ocurrir una asociación entre 2 moléculas de teofilina y una molécula de la ciclodextrina.

7.2.4. Resumen

Se han estudiado disoluciones acuosas de teofilina en presencia de ciclodextrinas, aplicando técnicas volumétricas, viscosimétricas y de medida de los coeficientes de difusión.

A partir de las propiedades de las disoluciones acuosas estudiadas, se ha comprobado que se producen interacciones entre ambos solutos: la teofilina y la ciclodextrina presente. A través del ajuste de los datos experimentales obtenidos, a modelos teóricos, ha sido posible hacer una estimación de los valores para la constante de asociación, bajo la suposición de tratar la mezcla agua + ciclodextrina como un disolvente mixto y de que se forman complejos teofilina-ciclodextrina del tipo 1:1.

En base a los valores de los volúmenes molares aparentes, se ha comprobado que ocurre asociación entre la teofilina y ambas ciclodextrinas, a las dos temperaturas estudiadas. Además, que en presencia de HP- β -CD los valores de la constante de estabilidad son más elevados que en presencia de β -CD, a ambas temperaturas, aunque la constante de estabilidad, K , disminuye lógicamente al aumentar esta temperatura.

Las medidas de viscosidad han evidenciado el carácter formador de estructura (*structure making*) de la teofilina en estos medios, lo que es indicativo de la existencia de importantes interacciones teofilina-ciclodextrina-agua. En el caso de la HP- β -CD se forman complejos de no inclusión teofilina-ciclodextrina, a ambas temperaturas.

Además, hay que indicar que todos estos resultados, unidos a los obtenidos para la difusión mutua, han evidenciado la existencia simultánea de interacciones tanto dentro como fuera de la molécula de la ciclodextrina. Esto es, la asociación que ocurre en la disolución acuosa, especialmente en presencia de HP- β -CD, podría involucrar a dos moléculas de teofilina por cada molécula de ciclodextrina.

Asimismo, es importante comprobar que a la temperatura fisiológica, 310,15 K, se sigue produciendo asociación entre ambos solutos, la teofilina y la ciclodextrina, hecho éste que no ha sido tenido en consideración, hasta el momento presente.

Por último, si se tiene en cuenta que los cambios de volumen encontrados en este trabajo de Tesis Doctoral, para el proceso de complejación de la teofilina son razonablemente superiores a los encontrados para el de la cafeína y que, además, las constantes de estabilidad obtenidas son de un orden inferior, es razonable suponer que en disolución acuosa, el proceso de interacción de estas dos xantinas con las ciclodextrinas estudiadas es distinto.

Referencias bibliográficas

- [1] Wei Y. L., Ding L. H., Dong C., Niu W. P., Shuang S. M., “*Study on inclusion complex of cyclodextrin with methyl xanthine derivatives by fluorimetry*”, *Spectrochim. Acta, Part A*, 59 (2003) 2697-2703.
- [2] Terekhova I. V., Kulikov O. V., “*Calorimetric study of the molecular recognition of nucleic acid bases by β -cyclodextrin in aqueous solution*”, *Mendeleev Commun.*, 12 (2002) 245-246.
- [3] Terekhova I. V., Kumeev R. S., Alper G. A., “*The interaction of caffeine with substituted cyclodextrins in water*”, *Russ. J. Phys. Chem. A*, 81 (2007) 1071-1075.
- [4] Krishnamoorthy R., Mitra A. K., “*Complexation of weak acids and bases with cyclodextrins: Effects of substrate ionization on the estimation and interpretation of association constants*”, *Int. J. Pharm. Adv.*, 1 (3) (1996) 329-343.
- [5] Aicart E., Junquera E., “*Complex formation between purine derivatives and cyclodextrins: a fluorescence spectroscopy study*”, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 47 (2003) 161-165.
- [6] Pina M. E., Veiga F., “*The influence of diluent on the release of theophylline from hydrophilic matrix tablets*”, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 26 (10) (2000) 1125-1128.
- [7] Terekhova I. V., Volkova T. V., Perlovich G. L., “*Interactions of theophylline with cyclodextrins in water*”, *Mendeleev Commun.*, 17 (2007) 244-246.
- [8] Loftsson T., Magnúsdóttir A., Másson M., Sigurjónsdóttir J. F., “*Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs*”, *J. Pharm. Sci.*, 91 (2002) 2307-2316.
- [9] Loftsson T., Másson M., Brewster M. E., “*Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes*”, *J. Pharm. Sci.*, 93 (2004) 1091-1099.
- [10] Mejri M., BenSouissi A., Aroulmoji V., Rogé, B., “*Hydration and self-association of caffeine molecules in aqueous solution: Comparative effects of sucrose and β -cyclodextrin*”, *Spectrochimica Acta Part A*, 73 (2009) 6-10.
- [11] Terekhova I. V., De Lisi R., Lazzara G., Milioto S., Muratore N., “*Volume And Heat Capacity Studies To Evidence Interactions Between Cyclodextrins And Nicotinic Acid In Water*”, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 92 (1) (2008) 285-290.
- [12] Terekhova I. V., “*Volumetric and calorimetric study on complex formation of cyclodextrins with aminobenzoic acids*”, *Mendeleev Commun.*, 19 (2009) 110-112.

- [13] Zhao C., Ma P., Li J., “*Partial molar volumes and viscosity B-coefficients of arginine in aqueous glucose, sucrose and L-ascorbic acid solutions at $T = 298.15\text{ K}$* ”, J. Chem. Thermodynamics, 37 (2005) 37–42.
- [14] Friedman H. L., Krishnan C. V., en “*Water: A Comprehensive Treatise*”, Vol. 3, Franks F., Ed. Plenum Press, New York, (1973) Chp 1.
- [15] Bhat R., Kishore N., Ahluwalia J. C., “*Thermodynamic studies of transfer of some amino acids and peptides from water to aqueous glucose and sucrose solutions at 298.15 K* ”, J. Chem. Soc. Faraday Trans. I, 84 (1988) 2651-2665.
- [16] Rekharsky M. V., Inoue Y., “*Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins*”, Chem. Rev., 98 (1998) 1875-1917.
- [17] Wilson L. D., Verrall R. E., “*A Volumetric Study of Cyclodextrin- α,ω -Alkyl Dicarboxylate Anion Complexes in Aqueous Solutions*”, J. Phys. Chem. B, 104 (2000) 1880-1886.
- [18] Wilson L. D., Verrall R. E., “*A Volumetric Study of β - cyclodextrin /Hydrocarbon and β -Cyclodextrin/Fluorocarbon Surfactant Inclusion Complexes in Aqueous Solution*”, J. Phys. Chem. B, 101 (1997) 9270-9279.
- [19] Spildo K., Hoiland H., “*Complex Formation Between Alkane- α,ω -Diols and Cyclodextrins Studied by Partial Molar Volume and Compressibility Measurements*”, J. Sol. Chem., 31 (2002) 149-164.
- [20] Gianni P., Lepori L., “*Partial Molar Volumes of Ionic and Nonionic Organic Solutes in Water: A Simple Additivity Scheme Based on the Intrinsic Volume Approach*”, J. Sol. Chem., 29 (2000) 405-447.
- [21] Jones G., Dole M., “*The viscosity of aqueous solutions of strong electrolytes with special reference to barium chloride*”, J. Am. Chem. Soc., 51 (1929) 2950–2964.
- [22] Donald H., Jenkins B., Marcus Y., “*Viscosity B-coefficients of ions in solution*”, Chem. Rev., 95 (8) (1995) 2695-2724.
- [23] Marcus Y., “*Effect of ions on the structure of water: Structure making and breaking*”. Chem. Rev., 109 (2009) 1346-1370.
- [24] Nightingale E. R., en “*Chemical Physics of electrolyte solutions*”, Conway B.E., Barradas R.G., Eds. Wiley, New York, (1966) 87.

- [25] Ribeiro A. C. F., Santos C. I. A. V., Lobo V. M. M., Cabral A. M. T. D. P. V., Veiga F. J. B., Estesó M. A., “*Diffusion coefficients of the ternary system β -Cyclodextrin + caffeine + water at 298.15 K*”, J. Chem. Eng. Data, 54 (2009) 115–117.
- [26] Ribeiro A. C. F., Santos C. I. A. V., Lobo V. M. M., Cabral A. M. T. D. P. V., Veiga F. J. B., Estesó M. A., “*Interactions between 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and Caffeine as seen by Diffusion at 25°C*”, J. Chem. Thermodynamics, 41 (2009) 1324-1328.
- [27] Ribeiro A. C. F., Santos C. I. A. V., Lobo V. M. M., Estesó M. A., “*Diffusion of caffeine in different aqueous media at physiological temperature*”, to be published in “*Food and Nutritional Components in Focus*”, Royal Society of Chemistry (2012)
- [28] Vitagliano V., Sartorio R., “*Some aspects of diffusion in ternary systems*”, J. Phys. Chem., 74 (1970) 2949-2956.
- [29] Paduano L., Sartorio R., Vitagliano V., Castronuovo G., “*Calorimetric and diffusional behavior of the system alpha-cyclodextrin l-phenylalanine in aqueous-solution*”, Thermochem. Acta, 162 (1990) 155-161.
- [30] Paduano L., Sartorio R., Vitagliano V., Costantino L., “*Diffusion-coefficients in systems with inclusion-compounds .2. alpha-cyclodextrin-(dl)norleucine-water at 25°C.*”, Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 94 (7) (1990) 741-745.
- [31] Paduano L., Sartorio R., Vitagliano V., “*Diffusion Coefficients of the Ternary System α -Cyclodextrin–Sodium Benzenesulfonate–Water at 25 °C: The Effect of Chemical Equilibrium and Complex Formation on the Diffusion Coefficients of a Ternary System*”, J. Phys. Chem. B, 102 (1998) 5023-5028.
- [32] Horiuchi Y., Abe K., Hirayama F., Uekama K., “*Release control of theophylline by β -cyclodextrin derivatives: hybridizing effect of hydrophilic, hydrophobic and ionizable β -cyclodextrin complexes*”, J. Control. Release, 15 (2) (1991) 177–183.
- [33] Ammar H. O., Ghorab M., El-Nahhas S. A., Omar S. M., Ghorab M. M., “*Improvement of some pharmaceutical properties of drugs by cyclodextrin. complexation. 5. Theophylline*”, Pharmazie, 1(1) (1996) 42-46.
- [34] Santos C. I. A. V., Estesó M. A., Sartorio R., Ortona O., Sobral A. J. N., Arranja C. T., Lobo V. M. M., Ribeiro A. C. F., “*A Comparison between the Diffusion Properties of Theophylline/ β -Cyclodextrin and Theophylline/2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin in Aqueous Systems*”, J. Chem. Eng. Data, Article ASAP (2012).

Capítulo 8

Estabilidad de los complejos ciclodextrina - fármaco: Influencia de iones con relevancia en los procesos fisiológicos

La alteración de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas de un fármaco, producidas como consecuencia de su complejación con una molécula de ciclodextrina, posee un considerable e interesante potencial desde el punto de vista farmacéutico. La constante de estabilidad y la estequiometría de los complejos de inclusión, dependiendo de la concentración de ciclodextrina y de la molécula huésped bajo estudio, resultan de utilidad como indicadores para estimar tanto la estabilidad del complejo, como los cambios en las propiedades fisicoquímicas de la molécula huésped. Sin embargo, estos no son los únicos factores a tener en consideración en el diseño de formulaciones y en la elección de las vías de administración del fármaco. Es necesario considerar, además, el entorno biológico, *in vivo*, que rodea a estos complejos: dilución, temperatura, pH y los iones que forman parte de los fluidos biológicos.

En el capítulo anterior se analizaron los efectos de la concentración y la temperatura sobre la constante de estabilidad de los sistemas que contienen una ciclodextrina (β -CD o HP- β -CD) y una metilxantina (cafeína o teofilina). En el presente capítulo, se abordará el estudio de la influencia de la presencia de iones con actividad fisiológica relevante, sobre la estabilidad de las interacciones ciclodextrina-fármaco. Ciertamente, los iones presentes en los fluidos biológicos, tanto intra como extra celulares, pueden tener efectos significativos sobre las moléculas del fármaco, principalmente si pueden interactuar con él y, consiguientemente, influir en sus interacciones con la ciclodextrina.

En general, las sales pueden influir sobre los complejos de las ciclodextrinas de distintas maneras [1-3]. Pueden producir efectos de “*salting in*” o de “*salting out*”, que afectan a la

estructura de la disolución y desvían los equilibrios que estén ocurriendo en la disolución. Pueden, asimismo, contribuir a la estabilización de complejos ternarios de inclusión ciclodextrina/fármaco en la disolución, a través de la interacción de los iones con ambas moléculas participantes en el complejo. Además, los iones constituyentes de la sal pueden entrar en competición con las moléculas del fármaco para penetrar y quedar incluidos en la cavidad de la ciclodextrina, hecho éste que puede verse favorecido cuando están implicados aniones de elevado tamaño. Finalmente, los cationes pueden interactuar con moléculas del fármaco, si éste posee carga eléctrica, a través de interacciones entre pares iónicos, hecho que puede tener un papel importante en el mecanismo de formación de complejos.

Este trabajo se ha dirigido a analizar los efectos del cloruro potásico sobre la estabilidad de las interacciones que tienen lugar entre una ciclodextrina (β -CD o HP- β -CD) y una metilxantina (cafeína o teofilina). Antes de pasar a examinar los resultados obtenidos para disoluciones acuosas de cafeína y teofilina en presencia de ciclodextrinas y KCl, se analizará cada uno de los sistemas *per se*. En el capítulo anterior se obtuvieron las constantes de estabilidad para los complejos fármaco-ciclodextrina, seguidamente se considerará la influencia del potasio sobre los fármacos y sobre las ciclodextrinas, de forma individual, en disolución acuosa.

8.1. Efecto del KCl sobre las propiedades de las disoluciones acuosas de cafeína y de teofilina

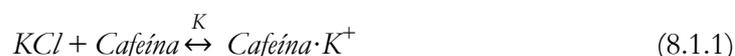
Se puede encontrar en la literatura científica alguna información respecto a la interacción y los efectos de iones¹ que tienen una participación importante en los procesos fisiológicos (K^+ , Na^+ , Cl^-), sobre la cafeína y la teofilina [4-5]. Estos estudios revelan que el ión potasio forma una unión a través del O6 y del N9 con la cafeína, así como del O6, del N9 y del N7 con la teofilina, derivándose como resultado de esta unión, valores de constantes de asociación de $5,08 \times 10^3$ para K_{K-Caf} y de $2,13 \times 10^3$ para K_{K-Teof} . Estos resultados son importantes si se consideran conjuntamente con los valores de las constantes de la asociación entre las ciclodextrinas, la cafeína y la teofilina, obtenidas anteriormente en este trabajo de Tesis Doctoral.

¹ En realidad, en el lugar de “iones potasio” se podría decir “sustancias conteniendo potasio” por una cuestión de coherencia termodinámica, es decir, podríamos preferir un lenguaje fenomenológico a un lenguaje basado en conceptos extra termodinámicos. Sin embargo, esta consideración tornaría el texto más extenso y posiblemente menos comprensible para algún lector.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que los estudios que han llevado a la obtención de los valores anteriormente señalados para estas constantes de asociación, usando técnicas de FT-IR y de espectroscopia de UV, se han realizado en presencia de concentraciones considerablemente superiores (hasta 40 mM) a las del potasio intracelular (3,5 a 5,0 mM) y, además, con la presencia de otros iones diferentes al potasio, que tuvieron que ser necesariamente introducidos para ajustar el pH del medio y que, muy probablemente, deben tener su influencia en el proceso de la asociación.

A través de medidas de los coeficientes de difusión de disoluciones acuosas de cafeína y de teofilina en presencia de cloruro de potasio, se puede hacer una estimación del valor de la constante de asociación de estos solutos, recurriendo para ello a modelos teóricos tales como, por ejemplo, el muy sencillo desarrollado por Leaist *et al.* [6-7], que correlaciona los coeficientes de difusión ternarios de los solutos con los valores, en el equilibrio, de los coeficientes de difusión y las concentraciones de las especies que difunden. Este modelo está ampliamente descrito en el capítulo 4 (ecuaciones (4.2.24) a (4.2.31)) de esta Memoria de Tesis Doctoral, por lo que a continuación tan solo se muestran las ecuaciones particularizadas para los sistemas concretos aquí estudiados.

Si se asume que las interacciones entre estos solutos ocurren en la proporción 1:1, en el caso en que esté presente la cafeína, el equilibrio vendría descrito por



Usando las ecuaciones (8.1.2) y (8.1.3) [6-7] y los datos experimentales obtenidos a través de las medidas de los coeficientes de difusión ternaria de trazas de KCl disueltas en disoluciones acuosas de cafeína, D_{11}^0 ($c_1/c_2 = 0$) así como de las medidas de los coeficientes de difusión ternaria de trazas de cafeína disuelta en disoluciones acuosas de KCl, D_{22}^0 ($c_1/c_2 = 0$), se pueden estimar la difusividad de la especie asociada y la constante de asociación correspondiente

$$D_{11}^0 \left(\frac{c_1}{c_2} = 0 \right) = 2D_{Cl} \frac{X_1 D_{\text{complejo}}^0 + (1-X_1) D_{K^+}^0}{D_{Cl} + (X_1) D_{\text{complejo}}^0 + (1-X_1) D_{K^+}^0} \quad (8.1.2)$$

$$D_{11}^0 \left(\frac{c_1}{c_2} = 0 \right) = X_2 D_{\text{complejo}}^0 + (1-X_2) D_{\text{Cafeína}}^0 \quad (8.1.3)$$

donde $D_{\text{Cafeína}}^0$ y D_{complejo}^0 representan los coeficientes de difusión, a concentración infinitesimal, de la cafeína y del complejo $\text{Cafeína} \cdot K^+$, respectivamente. El valor de $D_{\text{Cafeína}}^0$ se ha considerado que es igual al del coeficiente de difusión, a concentración infinitesimal, de la

cafeína en disolución acuosa.

En las ecuaciones (8.1.2) y (8.1.3), X_1 y X_2 representan la fracción de iones asociados, de potasio (X_1) y de cafeína (X_2), respectivamente, en cada composición utilizada. Esto es

$$X_1 = \frac{[Cafeína \cdot K^+]_{complejo}}{[K^+]_{libre} + [Cafeína \cdot K^+]_{complejo}} \quad (8.1.4)$$

y

$$X_2 = \frac{[Cafeína \cdot K^+]_{complejo}}{[Cafeína] + [Cafeína \cdot K^+]_{complejo}} \quad (8.1.5)$$

Hay que tener presente que cuando la difusión se produce en condiciones de trazas de cada componente, se tiene que $X_1 = X_2$, y la constante de asociación queda definida, entonces, por

$$K = \frac{X_1}{0.01(1-X_1)} = \frac{X_2}{0.01(1-X_2)} \quad (8.1.6)$$

Reorganizando adecuadamente las ecuaciones (8.1.2) a (8.1.6), se puede obtener, tal como se ha señalado con anterioridad, la constante de asociación del complejo y el coeficiente de difusión de la especie asociada.

El modelo es aplicable, igualmente, en el caso en que esté presente la teofilina en el medio, cambiando simplemente cafeína por teofilina en las ecuaciones (8.1.2) a (8.1.6).

No obstante, hay que tener presente que la simplicidad de este modelo conlleva la introducción de unas aproximaciones que, evidentemente, limitan los resultados obtenidos mediante su aplicación. Y así, este modelo no tiene en cuenta el cambio en el valor de la constante dieléctrica del medio como consecuencia de la presencia de solutos, así como tampoco considera los cambios en la hidratación de éstos [8], al tiempo que admite un valor unidad para todos los coeficientes de actividad de las especies presentes, al considerar que dicho modelo está siendo aplicado en el rango de las concentraciones diluidas y que, por último, las movibilidades tanto de las especies libres como de las asociadas no cambian cuando cambia la concentración.

Por otra parte, aproximaciones que este modelo involucra y que limitan su validez en cuanto a los resultados encontrados [8], pueden ser eliminadas, total o parcialmente, sin más que considerar la introducción de ciertas modificaciones simples tendentes a aumentar la validez y aplicabilidad a sistemas como los aquí analizados. Así, en el cálculo, se toma en consideración la aportación que la viscosidad de la disolución tiene en el valor del coeficiente

de difusión, es decir, los coeficientes de difusión de las especies se corrigen por efecto de la viscosidad de la disolución que se esté considerando.

Además, ambas especies, cafeína y teofilina, son electrólitos débiles cuya fracción protonada no se tiene en consideración; ya que ambas constantes de protonación: $K_a = 0,78$ (mol kg^{-1}) para la cafeína [9] y $K_a = 0,94$ (mol kg^{-1}) para la teofilina [10] son de un orden de magnitud relativamente pequeño, pero no despreciable, podrían ser tenidas en cuenta. Asimismo, podría tenerse en cuenta la asociación de las moléculas de las metilxantinas, ya que sus constantes de dimerización son conocidas, $K_D = 158$ ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$) para la cafeína y $K_D = 5,6$ ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$) para la teofilina [11] e introducir esta corrección en el modelo. La auto-asociación de la teofilina es bastante más pequeña que la de la cafeína, y, en el rango de concentraciones en el cual se ha trabajado (por debajo de 10 mM), es razonable asumir que la asociación de las moléculas de teofilina es despreciable y que la cafeína no se encuentra asociada en especies de orden superior al dímero. Así, al existir un equilibrio



las ecuaciones (8.1.3) y (8.1.5) deberían ser corregidas, sustituyendo $D_{\text{Cafeína}}^0$ por

$$D_M^0 Y + 2ZD_D^0, \quad (8.1.8)$$

donde D_M^0 y D_D^0 representan a los coeficientes de difusión, a concentración infinitesimal, de las entidades monómeras y dímeras de la cafeína y

$$Y = X_2^M \quad \text{y} \quad Z = \frac{X_2^D}{2} \quad (8.1.9)$$

donde X_2^M y X_2^D representan a las porciones de monómero y de dímero, en relación a la fracción de cafeína no asociada, $(1-X_2)$, asumiendo para ello que

$$X_2^M + X_2^D = 1 \quad (8.1.10)$$

Una vez hechas estas consideraciones, en los apartados que siguen se presenta un análisis de los resultados experimentales obtenidos para los coeficientes de difusión de ambas metilxantinas en presencia de KCl.

8.1.1. Efecto del cloruro potásico sobre las propiedades de la cafeína acuosa

Los valores de los coeficientes de difusión para el sistema ternario KCl (1) + cafeína (2) + agua, D_{11} , D_{12} , D_{21} y D_{22} , a 298,15 K y 310,15 K, se resumen en la Tabla 8.1. Estos resultados corresponden a los valores promedio de 6 experimentos realizados. En todos ellos se observó una buena reproducibilidad de los resultados, tal y como se advierte al observar las pequeñas desviaciones estándar encontradas, respecto de dicho valor medio, S_D . Los límites de error de estos resultados se aproximan al valor de la imprecisión del método de medida, por lo que incluyen una incertidumbre experimental del 1-3%.

Tabla 8.1. Coeficientes de difusión ternarios D_{11} , D_{12} , D_{21} y D_{22} , para la cafeína acuosa (2) en presencia de KCl (1), a 298,15 K y 310,15K

C_1^a	C_2^a	$D_{11} \pm S_D^b$ / 10^{-9} ($m^2 \cdot s^{-1}$)	$D_{12} \pm S_D^b$ / 10^{-9} ($m^2 \cdot s^{-1}$)	$D_{21} \pm S_D^b$ / 10^{-9} ($m^2 \cdot s^{-1}$)	$D_{22} \pm S_D^b$ / 10^{-9} ($m^2 \cdot s^{-1}$)	D_{12}/D_{22}^c	D_{21}/D_{11}^d
T=298,15 K							
0,010	0,000	1,871 \pm 0,015	-0,112 \pm 0,058	-0,007 \pm 0,028	0,759 \pm 0,017	-0,148	-0,004
0,000	0,010	1,859 \pm 0,019	0,000 \pm 0,007	-0,076 \pm 0,022	0,703 \pm 0,013	-0,001	-0,041
0,002	0,002	1,951 \pm 0,031	-0,165 \pm 0,081	-0,056 \pm 0,025	0,746 \pm 0,014	-0,221	-0,029
0,005	0,005	1,903 \pm 0,028	-0,120 \pm 0,042	-0,112 \pm 0,019	0,731 \pm 0,012	-0,164	-0,059
0,010	0,010	1,844 \pm 0,015	0,104 \pm 0,054	-0,282 \pm 0,096	0,688 \pm 0,031	0,151	-0,153
T=310,15 K							
0,010	0,000	2,420 \pm 0,001	0,231 \pm 0,026	-0,004 \pm 0,003	1,029 \pm 0,022	0,224	-0,002
0,000	0,010	2,386 \pm 0,003	-0,004 \pm 0,031	-0,019 \pm 0,006	0,984 \pm 0,015	-0,004	-0,008
0,002	0,002	2,420 \pm 0,022	-0,099 \pm 0,033	0,007 \pm 0,034	1,024 \pm 0,013	-0,097	0,003
0,005	0,005	2,390 \pm 0,013	0,005 \pm 0,018	-0,091 \pm 0,019	0,956 \pm 0,008	0,005	-0,038
0,010	0,010	2,370 \pm 0,009	0,064 \pm 0,005	-0,257 \pm 0,021	0,898 \pm 0,003	0,072	-0,109

(a) Unidades: ($mol \cdot dm^{-3}$); (b) S_D representa la desviación estándar de todas las medidas realizadas;

(c) D_{12}/D_{22} representa el número de moles de KCl transportados por 1 mol de cafeína;

(d) D_{21}/D_{11} representa el número de moles de cafeína transportados por 1 mol de KCl.

Al analizar la tabla 8.1 se comprueba, en primer lugar, que ambos coeficientes de difusión principales D_{11} para el cloruro de potasio y D_{22} para la cafeína, disminuyen su valor en presencia del otro soluto, a ambas temperaturas, 298,15 y 310,15 K, respecto del que presentan cuando se encuentran solos en la disolución (los del sistema binario KCl + agua están recogidos en la tabla 8.2; y los de la cafeína se obtuvieron al estudiar el correspondiente

sistema binario y están recogidos en la tabla 6.4, del capítulo 6). Estas diferencias son de, aproximadamente, un 4-5%.

Tabla 8.2. Coeficientes de difusión mutua de disoluciones acuosas de KCl a 298,15 y 310,15 K

c /(mol·dm ⁻³)	Δc /(mol·dm ⁻³)	D /(10 ⁻⁹ m ² ·s ⁻¹) ^a (298,15 K)	$D \pm S_D$ /(10 ⁻⁹ m ² ·s ⁻¹) ^b (310,15 K)
0,002	0,002	1,954	2,484 ± 0,001
0,004	0,004	1,940	2,482 ± 0,008
0,005	0,004	1,934	2,481 ± 0,009
0,008	0,004	1,922	2,476 ± 0,006
0,010	0,004	1,918	2,473 ± 0,006

^(a) estos resultados se han obtenido mediante la técnica de Taylor y la técnica conductimétrica [12-13];

^(b) S_D representa la desviación estándar de todas las medidas realizadas.

Una posible explicación a esta disminución observada en el coeficiente de difusión de la cafeína podría buscarse sobre la base de que tuviese lugar un proceso de auto-asociación. Es sabido que en disolución acuosa, las moléculas de cafeína se asocian entre sí, mayoritariamente mediante interacciones entre grupos hidrófobos, dada la ausencia de grupos donantes de H que posibiliten la formación de enlaces internos por puentes de hidrogeno. Sin embargo, estos puentes de hidrogeno sí pueden originarse entre la molécula de cafeína y el disolvente (agua), a través de los grupos polares carbonilo, situados en las posiciones 2 y 6 y del nitrógeno N9. Según Falk *et al.* [14], si las moléculas de cafeína están libres en disolución, los carbonilos de las posiciones 2 y 6 estarán perfectamente hidratados, pero cuando se produce asociación, por “*vertical stacking*”, el impedimento estérico dificulta su hidratación, a pesar de la estructura relativamente flexible que presenta el dímero. Por lo tanto, el acceso bien sea de las moléculas de agua, bien de los iones potasio del medio, no sería libre sino que estaría condicionado.

Ahora bien, los datos obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral sugieren que este proceso de auto-asociación de la cafeína no debe ser el único responsable de la disminución de su coeficiente de difusión. En efecto, estos cambios observados en los coeficientes de difusión principales de la cafeína, en el rango de concentraciones de este estudio, pueden deberse a que, al asociarse ésta con los iones K⁺ del medio, disminuye su movilidad debido, por una parte, al efecto estérico, ya que el tamaño de la especie asociada es ligeramente

mayor que el de la cafeína libre y, por otra parte, como resultado de su densidad superficial de carga eléctrica positiva, ya que un gradiente de concentración de KCl origina la aparición de un campo eléctrico que provoca la desaceleración tanto a los iones K^+ libres presentes en la disolución, como a los que se encuentran asociados a la cafeína. De hecho, una confirmación de tal extremo podría encontrarse al observar el comportamiento del coeficiente de difusión secundario, D_{21} , que representa el flujo de cafeína generado por el gradiente de concentración de cloruro potásico en la disolución y cuyos valores, de signo negativo, difieren significativamente de cero. Del cociente D_{21}/D_{11} , que representa el número de moles de cafeína transportados por 1 mol de KCl, se puede comprobar que, efectivamente, 1 mol de KCl difundente puede “*contra-transportar*” (esto es, transportar en sentido opuesto al de su gradiente de concentración, dado su signo negativo) hasta 0,15 moles de cafeína.

El aumento de la temperatura tampoco parece favorecer la interacción entre las moléculas de cafeína. De los datos de la tabla 8.1, a 310,15 K, se comprueba que el coeficiente de difusión de la cafeína disminuye con el aumento de la concentración y que, además, dicha disminución es mayor que la observada a 298,15 K. Además, que el transporte acoplado de solutos, cuantificado a través de los valores de los coeficientes de difusión secundarios, se reduce a esta temperatura más elevada. Sin embargo, el hecho de que haya más moléculas de cafeína bajo la forma de monómeros podría permitir una mayor interacción con el medio (disolvente) y, consiguientemente, con los iones K^+ . Una manera de comprobar este extremo sería a través del análisis de los valores de los coeficientes de difusión en condiciones de trazas del soluto, análisis que permitiría, por aplicación del modelo descrito en el apartado anterior, cuantificar la asociación de estos solutos y obtener el valor de su constante de asociación.

Para el sistema bajo estudio se ha obtenido, a 298,15 K, un valor para K de $26,8 M^{-1}$ y un coeficiente de difusión, D_{complejo}^0 de la especie asociada $Caf-K^+$, a concentración infinitesimal, de $0,755 \times 10^{-9} m^2 \cdot s^{-1}$. A 310,15 K, la constante de asociación K tiene un valor de $31,6 M^{-1}$ y el coeficiente de difusión de la especie asociada $Caf-K^+$, a concentración infinitesimal, de $0,860 \times 10^{-9} m^2 \cdot s^{-1}$. Hay que destacar que a 310,15 K el coeficiente de difusión a concentración infinitesimal de la especie asociada, es un 20% menor que el de la cafeína libre, en las mismas condiciones. Estos resultados difieren considerablemente de los que se encuentran recogidos en la literatura científica. Diferencia que podría deberse, en gran medida, a las distintas condiciones experimentales en que se han realizado los correspondientes estudios. No obstante las diferencias y teniendo en cuenta todos los

enfoques que intervienen en el modelo que se ha manejado, tanto estos resultados aquí obtenidos, como los que se encuentran en la literatura científica, señalan la existencia de ocasionales complejos en la disolución, cuya presencia resulta importante a la hora de analizar el comportamiento de la difusión de dicho sistema.

A partir de los datos anteriores, se podría hacer una estimación del radio hidrodinámico de la molécula de cafeína en la disolución acuosa conteniendo KCl, mediante la aplicación de la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación (6.1.2) del capítulo 6 de esta Memoria). Los resultados así obtenidos fueron: $r(298,15\text{ K}) = 0,32_3\text{ nm}$ y $r(310,15\text{ K}) = 0,31\text{ nm}$. Comparando estos valores con los obtenidos para la cafeína en disolución acuosa (sin la presencia de KCl), se aprecia un ligero incremento en el tamaño del radio hidrodinámico de la molécula de cafeína a 298,15 K (inferior al 1%) que es mucho más significativo (casi un 5%) cuando la temperatura se eleva hasta los 310,15 K. Estos resultados sirven de soporte a las hipótesis anteriormente manejadas, de que la cafeína se asocia a los iones K^+ del medio y de que dicho proceso se ve favorecido por el aumento de la temperatura.

8.1.2. Efecto del cloruro potásico sobre las propiedades de la teofilina acuosa

Los valores de los coeficientes de difusión para el sistema ternario KCl (1) + teofilina (2) + agua, D_{11} , D_{12} , D_{21} y D_{22} , a 298,15 K y 310,15 K, se presentan en la Tabla 8.3 [15]. Dichos valores corresponden a la media de los obtenidos en, al menos, 6 experimentos diferentes para los que se observó una buena reproducibilidad, tal y como puede comprobarse a través de las pequeñas desviaciones estándar de la media, S_D , que también aparecen en la tabla 8.3. Los límites de error de estos resultados son próximos a la imprecisión del método de medida, por lo que la incertidumbre experimental es del 1-3%.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos para los sistemas binarios a la misma temperatura, esto es, para el cloruro de potasio en disolución acuosa (tabla 8.2) y para la teofilina en agua (tabla 6.8, del capítulo 6), se comprueba que en las composiciones utilizadas en este estudio, el KCl añadido apenas produce cambios significativos en el coeficiente de difusión, D_{22} de la teofilina (siempre inferiores al 1%, con independencia de la temperatura), mientras que la adición de teofilina al medio genera cambios importantes en el valor del coeficiente de difusión D_{11} del KCl (hasta del 12% a 298,15 y hasta del 4% a 310,15 K). Una posible explicación a estos resultados podría buscarse considerando que algunas moléculas de teofilina pudiesen asociarse con el ión potasio en medio acuoso, a través del O6 y del N7 [5, 16], para existir en la disolución como eventuales especies agregadas (por ejemplo, en

forma de complejos), con lo que, consecuentemente, perderían movilidad, justificando así esta importante disminución en D_{11} . Este efecto sería menos apreciable al considerar la influencia del KCl sobre el transporte de teofilina, dada la similitud entre las movilidades de las especies teofilina libre y teofilina asociada al ión K^+ .

Tabla 8.3. Coeficientes de difusión ternarios, D_{11} , D_{12} , D_{21} y D_{22} , para la teofilina acuosa (2) en presencia de KCl (1), a 298,15 K y 310,15K

C_1^a	C_2^a	$D_{11} \pm S_D^b$ /($10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$D_{12} \pm S_D^b$ /($10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$D_{21} \pm S_D^b$ /($10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$D_{22} \pm S_D^b$ /($10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	D_{12}/D_{22}^c	D_{21}/D_{11}^d
T=298,15 K							
0,010	0,000	1,793 \pm 0,009	-0,026 \pm 0,017	-0,009 \pm 0,008	0,800 \pm 0,012	-0,033	-0,005
0,000	0,010	1,856 \pm 0,011	0,008 \pm 0,006	-0,022 \pm 0,008	0,687 \pm 0,007	0,012	-0,012
0,002	0,002	1,847 \pm 0,040	-0,024 \pm 0,020	-0,012 \pm 0,012	0,783 \pm 0,023	-0,030	-0,006
0,005	0,005	1,842 \pm 0,035	-0,313 \pm 0,091	-0,108 \pm 0,177	0,765 \pm 0,020	-0,409	-0,058
0,010	0,010	1,690 \pm 0,056	-0,359 \pm 0,180	-0,103 \pm 0,020	0,736 \pm 0,058	-0,488	-0,061
T=310,15 K							
0,010	0,000	2,423 \pm 0,017	0,098 \pm 0,042	-0,004 \pm 0,012	1,079 \pm 0,003	0,095	-0,002
0,000	0,010	2,406 \pm 0,018	-0,001 \pm 0,021	-0,083 \pm 0,012	0,983 \pm 0,016	-0,001	-0,034
0,002	0,002	2,459 \pm 0,023	0,064 \pm 0,021	-0,200 \pm 0,058	1,105 \pm 0,019	0,058	-0,081
0,005	0,005	2,413 \pm 0,023	0,088 \pm 0,022	-0,232 \pm 0,100	1,026 \pm 0,032	0,086	-0,096
0,010	0,010	2,378 \pm 0,019	0,079 \pm 0,031	-0,193 \pm 0,009	0,976 \pm 0,010	0,080	-0,081

^(a) Unidades: (mol dm^{-3}); ^(b) S_D representa la desviación estándar de todas las medidas realizadas;

^(c) D_{12}/D_{22} representa el número de moles de KCl transportados por 1 mol de teofilina;

^(d) D_{21}/D_{11} representa el número de moles de teofilina transportados por 1 mol de KCl.

Analizando los coeficientes de difusión secundarios, D_{12} y D_{21} , a concentraciones finitas, puede tratar de justificarse mejor la influencia del KCl sobre la difusión de la teofilina y viceversa. A 298,15 K se observa que, en general, estos coeficientes de difusión secundarios presentan signo negativo, lo que significaría que el gradiente de concentración de cada componente produciría, de forma general, un flujo acoplado del otro componente en “*contra-corriente*”, es decir, en contra de su gradiente de concentración. Teniendo en cuenta que D_{12}/D_{22} informa acerca del número de moles de KCl “*contra-transportados*” por 1 mol de teofilina impulsada por su propio gradiente de concentración, se tendría que, en las composiciones estudiadas, cada mol de teofilina “*contra-transportaría*”, como máximo, 0,5 moles de KCl, en el caso óptimo de la mayor concentración de teofilina. Ahora bien, a partir

de los valores encontrados para el cociente D_{21}/D_{11} en las mismas composiciones, solo se podría esperar que 1 mol de KCl difundente “*contra-transportaría*” algo menos de 0,1 moles de teofilina. Es decir, el efecto que produciría la difusión de la teofilina se dejaría sentir de manera más acusada sobre la difusión del KCl, que a la inversa.

Cuando aumenta la temperatura hasta los 310,15 K, el signo de D_{12}/D_{22} cambia y se torna positivo, lo que implica que ahora el transporte de KCl asociado al de teofilina bajo su gradiente de concentración, se produciría en el sentido del gradiente de concentración de KCl, esto es, se produciría un “*co-transporte*” de KCl, si bien su magnitud es muy poco significativa (menor de 0,1 moles por cada mol de teofilina). Este cambio de comportamiento podría tratar de justificarse sobre la base de lo ya comentado con anterioridad, de que el aumento de temperatura afecta en mayor medida a la movilidad del KCl (que experimenta un aumento de valor mucho menor, al aumentar la temperatura, lo que puede derivarse en una disminución relativa del gradiente de concentración de KCl en la disolución y, consecuentemente, un “*aparente*” cambio en su transporte asociado a la difusión de la teofilina) que a la de la teofilina, en los sistemas estudiados.

Por otra parte, los valores encontrados para los coeficientes de difusión secundarios podrían esperarse *a priori*, si se tiene en cuenta que la teofilina dispone de un grupo metilo menos que la cafeína, en la posición N7, luego es más pequeña y al asociarse con el K^+ tendrá una densidad de carga mayor y, consiguientemente, el efecto del campo eléctrico generado por el gradiente de KCl, sobre la especie asociada (y sobre su respectivo coeficiente de difusión) será más intenso. El hecho de que tenga un grupo metilo menos, influye también en la constante de asociación, ya que el N7 queda ahora disponible para interactuar con el medio. Haciendo el mismo razonamiento que anteriormente, al analizar la cafeína, se puede esperar que la constante de asociación del complejo $Teof-K^+$ se verá afectada por la auto-asociación de las moléculas de teofilina aunque, debido a su menor tendencia a esta auto-asociación, hay que esperar que ocurra de manera distinta.

Aplicando las ecuaciones (8.1.2) y (8.1.3) se obtiene para el coeficiente de difusión de la especie asociada, $D_{complejo}^0$ a concentración infinitesimal y para la constante de asociación, K , los valores de $0,758 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ y $27,2 \text{ M}^{-1}$ a 298,15 K, respectivamente, y de $0,778 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ y $25,9 \text{ M}^{-1}$ a 310,15 K, respectivamente. Como puede apreciarse, estos valores son muy próximos a los encontrados para la cafeína a 298,15 K, pero significativamente inferiores a 310,15 K, lo que viene a incidir en lo ya comentado, relativo a la influencia de la temperatura, al analizar los valores encontrados para los coeficientes de difusión.

Los valores del radio hidrodinámico de la molécula de teofilina en disolución acuosa con presencia de KCl, estimados a partir de la aplicación de la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación (6.1.2), en el capítulo 6) fueron: $r(298,15\text{ K}) = 0,30_7\text{ nm}$ y $r(310,15\text{ K}) = 0,30_4\text{ nm}$. Estos valores, comparados con los correspondientes encontrados en disolución acuosa, señalan un ligero incremento en el tamaño del radio hidrodinámico de la teofilina, a ambas temperaturas (alrededor del 1-2 %) que podría venir justificado por una posible asociación de la teofilina con los iones presentes en el medio. Este aumento es muy similar al encontrado para los valores de las constantes de asociación. Una vez más, los datos encontrados en este trabajo de Tesis Doctoral son distintos a los que se encuentran recogidos en la literatura científica aunque, al igual que aquellos, coinciden en señalar la existencia de interacciones entre la teofilina y los iones del medio y, además, que esta interacción disminuye con el aumento de la temperatura.

8.1.3. Resumen

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral, se ha podido estimar que es correcta la hipótesis de que tanto la cafeína como la teofilina interactúan con los iones presentes en los fluidos fisiológicos y, en concreto, con los iones K^+ .

Asimismo, se ha podido comprobar, a través de la aplicación de un modelo bastante sencillo, que ambas xantinas presentan constantes de asociación con valores comprendidos entre 25 y 30 M^{-1} , con independencia de la temperatura (298,15 K y 310,15 K). Los pequeños cambios observados en los valores de estas constantes, parecen ser de origen estructural y no derivados del efecto de la temperatura. Asimismo, queda claro que la teofilina es la que resulta más afectada por la presencia de un electrólito en el medio.

También se estimaron las variaciones ocurridas en el radio hidrodinámico de estas moléculas, inducidas por la presencia de los iones K^+ y Cl^- en la disolución y se comprobó que estas variaciones concuerdan con los valores obtenidos para las constantes de asociación de los solutos en disolución acuosa.

8.2. Efecto del KCl sobre las propiedades de las disoluciones acuosas de β -ciclodextrina y de hidroxipropil- β -ciclodextrina

Es sabido que las ciclodextrinas tienen gran capacidad para incluir en su cavidad diversas moléculas orgánicas, complejos de metales de transición y algunos iones inorgánicos [1, 17]. La mayoría de los autores parecen estar de acuerdo en que la asociación de las ciclodextrinas con los aniones (p. ej., Cl⁻) es más fuerte que la asociación con los cationes (p. ej., K⁺) [18]. Esto es lógico si se tiene en cuenta que con los aniones se pueden formar enlaces por puentes de hidrogeno Cl⁻⋯H-O y que éstos no se producen en el caso de un catión. Se ha propuesto, asimismo, que el interior de la cavidad de la ciclodextrina se compone mayoritariamente de carbono polarizado positivamente y que este entorno, microscópicamente positivo, favorece la inclusión de huéspedes aniónicos y desfavorece a los huéspedes catiónicos [19]. Puesto que se quieren conocer las consecuencias de la presencia de los sales sobre el valor de las constantes de equilibrio para la formación de complejos de inclusión, interesa saber de qué forma influye la presencia de iones K⁺ y de Cl⁻ y establecer cuál será el valor de la constante de su asociación con la ciclodextrina.

Tomando el modelo descrito en el apartado 8.1 y aplicándolo a un equilibrio del tipo



y desarrollando las ecuaciones (8.1.1) a (8.1.6) para el supuesto de la inclusión del ión Cl⁻, se puede estimar un valor para la constante de asociación de la ciclodextrina con este ión. Hay que hacer notar que este procedimiento es aplicable tanto para el ión Cl⁻ como para el ión K⁺, por lo que la constante de asociación y el coeficiente de difusión de la especie asociada se puede obtener para ambos supuestos.

En ese sentido, se realizaron medidas de difusión mutua de β -CD y de HP- β -CD en disolución acuosa con presencia de KCl a 298,15 y 310,15 K, así como medidas de difusión en condiciones de trazas de los respectivos solutos.

8.2.1. Efecto del cloruro potásico sobre las propiedades de la β -ciclodextrina acuosa

Los valores de los coeficientes de difusión para el sistema ternario KCl (1) + β -CD (2) + agua, D_{11} , D_{12} , D_{21} y D_{22} , a 298,15 K [20] se resumen en la Tabla 8.4. A 310,15 K, únicamente se presentan las medidas de los coeficientes de difusión en condiciones de trazas de solutos,

necesarias para estimar el valor de la constante de asociación. Estos resultados son una media, al menos, de 6 experimentos. La reproducibilidad observada es buena, tal como indican las pequeñas desviaciones estándar respecto de la media, S_D . Los límites de error de estos resultados se acercan al valor de la imprecisión del método, por lo tanto, tienen una incertidumbre experimental del 1-3%.

Tabla 8.4. Coeficientes de difusión ternarios, D_{11} , D_{12} , D_{21} y D_{22} , para la β -ciclodextrina acuosa (2) en presencia de KCl (1), a 298,15 K y 310,15 K [20]

C_1^a	C_2^a	$D_{11} \pm S_D^b$ /($10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$D_{12} \pm S_D^b$ /($10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$D_{21} \pm S_D^b$ /($10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$D_{22} \pm S_D^b$ /($10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	D_{12}/D_{22}^c	D_{21}/D_{11}^d
T=298,15 K							
0,010	0,000	1,751±0,046	0,006±0,016	0,081±0,045	0,325±0,018	0,018	0,046
0,000	0,010	1,803±0,019	0,089±0,033	-0,001±0,012	0,331±0,027	0,268	0,000
0,002	0,002	1,924±0,045	-0,242±0,028	-0,068±0,010	0,324±0,036	-0,745	-0,035
0,005	0,005	1,891±0,044	-0,196±0,059	-0,088±0,037	0,317±0,032	-0,618	-0,045
0,010	0,010	1,848±0,034	-0,057±0,041	-0,119±0,051	0,313±0,012	-0,183	-0,064
T=310,15 K							
0,010	0,000	2,360±0,029	0,005±0,012	-0,012±0,012	0,429±0,011	0,012	-0,005
0,000	0,010	2,420±0,017	0,025±0,009	0,003±0,009	0,457±0,013	0,055	0,001

^(a) Unidades: (mol dm^{-3}); ^(b) S_D representa la desviación estándar de todas las medidas realizadas;

^(c) D_{12}/D_{22} representa el número de moles de KCl transportados por 1 mol de β -CD;

^(d) D_{21}/D_{11} representa el número de moles de β -CD transportados por 1 mol de KCl.

Se puede observar que mientras los coeficientes de difusión del cloruro de potasio son inferiores a los encontrados para el sistema binario (tabla 8.2), con desviaciones crecientes con la concentración de soluto, hasta alcanzar un valor del 3,6%, los coeficientes de difusión de la β -CD son prácticamente iguales a los obtenidos en el sistema binario correspondiente (tabla 6.13, del capítulo 6), con pequeñas diferencias que no van más allá del 1,5% y que, dado su carácter errático, parece que podrían ser achacables a la precisión del método. Por otra parte, los valores encontrados para el cociente D_{12}/D_{22} señalan que derivado de la difusión de la β -CD, habría un transporte acoplado de KCl, como consecuencia del gradiente de la ciclodextrina, bastante elevado (1 mol de β -CD llegaría a “*contra-transportar*” hasta 0,7 moles de KCl, si bien el aumento de la concentración de soluto tiende a disminuir progresivamente este valor). Una posible explicación para este comportamiento podría obtenerse teniendo en cuenta que la entrada del KCl en la disolución, su consecuente

disociación en iones y la posterior hidratación de éstos, quitaría moléculas de agua del medio y, posiblemente, también de la capa de hidratación de la β -CD. Sin embargo, la entrada de los iones Cl^- hidratados en la cavidad de la ciclodextrina, exigiría una expulsión de moléculas de agua hacia el exterior que, prácticamente, repondría aquellas y equilibraría el cambio de concentración inicialmente producido, por lo que la entrada de KCl en el medio no provocaría cambios apreciables en el tamaño de la ciclodextrina y, consecuentemente, en su movilidad. Situación muy diferente se produciría en relación al KCl, que se desplazaría (los iones Cl^-), también, ocluido en la cavidad de la ciclodextrina, de movilidad mucho menor, provocando, además, la aparición de un campo eléctrico que tendería a frenar la difusión de los iones K^+ en el sentido de su propio gradiente de concentración.

La estimación de las constantes de asociación, a través de los valores de difusión en condiciones de trazas de los solutos, permitió obtener valores para K de 42,1 M^{-1} a 298,15 K y de 34,2 M^{-1} a 310,15 K. Es decir, a la vista de estos valores hay que deducir que ocurre asociación entre estos solutos y que esta asociación se debilita por efecto del aumento de la temperatura. Los coeficientes de difusión infinitesimal obtenidos por la aplicación de este modelo de Leaist *et al.* [6-7] fueron: $0,344 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ y $0,436 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, para ambas temperaturas, 298,15 K y 310,15 K, valores que son muy cercanos a los de la β -CD libre, lo que parece incidir en el supuesto de que la asociación ocurre por inclusión en la cavidad.

Al igual que en los análisis realizados anteriormente en este capítulo, se estimó el valor del radio hidrodinámico de la molécula de β -CD en esta disolución acuosa con presencia de KCl. La aplicación de la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación (6.1.2), del capítulo 6) condujo a los valores de r (298,15 K) = 0,74₀ nm y r (310,15 K) = 0,71₉ nm. A la vista de estos valores encontrados habría que concluir que mientras que a 298,15 K no se observaría apenas cambio en el tamaño del radio hidrodinámico de la ciclodextrina (disminuiría en torno al 1,5%), a 310,15 K este radio hidrodinámico experimentaría una reducción importante (del 4%, aproximadamente). Una posible explicación para este comportamiento podría basarse en que a la deshidratación de la ciclodextrina que debe seguir a la entrada del KCl en la disolución, tal como se indicó con anterioridad, habría que adicionar el efecto de deshidratación provocado por el aumento de la temperatura.

8.2.2. Efecto del cloruro potásico sobre las propiedades de la hidroxipropil- β -ciclodextrina acuosa

Los valores de los coeficientes de difusión para el sistema ternario KCl (1) + HP- β -CD (2) + agua, D_{11} , D_{12} , D_{21} y D_{22} , a 298,15 K, se indican en la Tabla 8.5. Al igual que en el caso de la otra ciclodextrina estudiada, a 310,15 K solo se presentan las medidas de los coeficientes de difusión en condiciones de trazas de los solutos, necesarias para estimar los valores de la constante de asociación. Estos resultados son, también como en ocasiones precedentes, la media correspondiente a 6 experimentos diferentes. La reproducibilidad observada es buena, tal como puede apreciarse a través de las pequeñas desviaciones estándar de dicha media, S_D . Como en los casos anteriormente analizados, estos resultados presentan una incertidumbre experimental del 1-3%.

En cuanto al sistema bajo estudio KCl (1) + HP- β -CD (2) + agua, si se comparan estos resultados con los obtenidos, a la misma temperatura, para los sistemas binarios cloruro de potasio (tabla 8.2) y para la HP- β -CD en disolución acuosa (tabla 6.18 del capítulo 6), se observa que en las composiciones analizadas en este estudio, el KCl añadido produce cambios relativamente pequeños en el coeficiente de difusión principal, D_{22} , de la HP- β -CD (inferiores al 3%), mientras que la adición de HP- β -CD genera cambios significativos en el coeficiente de difusión D_{11} del KCl ($\leq 7\%$).

Tal como se señaló en el caso de la β -CD, una posible justificación a este comportamiento se encontraría teniendo en cuenta que la entrada del KCl en la disolución, su disociación y la posterior hidratación de sus iones, liberaría agua que estaría atrapada en la esfera de hidratación de la ciclodextrina y, por lo tanto, el tamaño de la molécula de ciclodextrina se vería disminuido, permitiéndole un pequeño aumento de su movilidad. Por otra parte, también en este caso, el KCl se incluiría en la cavidad de la ciclodextrina, principalmente a través de sus iones Cl⁻. A la vista de los valores encontrados para los transportes acoplados de los solutos, y más exactamente para el cociente D_{12}/D_{22} , cuyo valor negativo (igual a 0,4 moles) representa el número de moles de KCl “*contra-transportados*” por 1 mol de HP- β -CD difundente, es de esperar una constante de inclusión significativa.

En efecto, se han obtenido valores para K de 47,8 M⁻¹ y de 34,8 M⁻¹ a 298,15 K y 310,15 K, respectivamente, lo que representaría un aumento de la asociación observada respecto a la observada con β -CD. También en este caso hay indicaciones de que la asociación ocurre por inclusión, lo cual queda evidenciado por los valores de los coeficientes de difusión

infinitesimal obtenidos para la especie asociada y que fueron de $0,340 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ a 298,15 K y de $0,434 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ a 310,15 K, valores muy próximos a los encontrados para la ciclodextrina libre en disolución acuosa.

Tabla 8.5. Coeficientes de difusión ternarios, D_{11} , D_{12} , D_{21} y D_{22} , para la hidroxipropil- β -ciclodextrina acuosa (2) en presencia de KCl (1), a 298,15 K y 310,15K

C_1^a	C_2^a	$D_{11} \pm S_D^b$ / $(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	$D_{12} \pm S_D^b$ / $(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	$D_{21} \pm S_D^b$ / $(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	$D_{22} \pm S_D^b$ / $(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	D_{12}/D_{22}^c	D_{21}/D_{11}^d
T=298,15 K							
0,010	0,000	$1,725 \pm 0,031$	$0,005 \pm 0,006$	$0,052 \pm 0,031$	$0,305 \pm 0,004$	0,015	0,030
0,000	0,010	$1,850 \pm 0,031$	$-0,141 \pm 0,020$	$0,002 \pm 0,034$	$0,328 \pm 0,006$	-0,429	0,001
0,002	0,002	$1,930 \pm 0,027$	$-0,130 \pm 0,039$	$0,012 \pm 0,051$	$0,324 \pm 0,005$	-0,401	0,006
0,005	0,005	$1,808 \pm 0,026$	$-0,089 \pm 0,027$	$-0,024 \pm 0,018$	$0,317 \pm 0,001$	-0,280	-0,013
0,010	0,010	$1,778 \pm 0,028$	$-0,057 \pm 0,024$	$-0,003 \pm 0,060$	$0,308 \pm 0,012$	-0,185	-0,002
T=310,15 K							
0,010	0,000	$2,330 \pm 0,017$	$0,180 \pm 0,092$	$0,003 \pm 0,031$	$0,403 \pm 0,013$	0,447	0,001
0,000	0,010	$2,410 \pm 0,033$	$0,002 \pm 0,024$	$0,086 \pm 0,019$	$0,415 \pm 0,015$	0,005	0,036

^(a) Unidades: (mol dm^{-3}) ; ^(b) S_D representa la desviación estándar de todas las medidas realizadas;

^(c) D_{12}/D_{22} representa el número de moles de KCl transportados por 1 mol de HP- β -CD;

^(d) D_{21}/D_{11} representa el número de moles de HP- β -CD transportados por 1 mol de KCl.

En relación al tamaño de las especies difundentes en disolución, más exactamente de la molécula de HP- β -CD, se estimaron los radios hidrodinámicos en disoluciones acuosas con presencia de KCl, encontrando valores de $r(298,15 \text{ K}) = 0,74_7 \text{ nm}$ y $r(310,15 \text{ K}) = 0,79_2 \text{ nm}$, ambos alrededor del 1-2% por debajo del valor encontrado en agua. Por tanto, la presencia del KCl en la disolución afecta al tamaño de esta molécula de HP- β -CD en mayor medida que a la de β -CD. La disminución en el tamaño, debido a la presencia de estos iones en disolución podría ocurrir, posiblemente, como consecuencia de la mayor tendencia que presenta la HP- β -CD a establecer enlaces con las moléculas de agua y la competencia que, por dichas moléculas de agua, se establecería entre las moléculas de ciclodextrina y los iones del KCl por hidratarse. El aumento de la temperatura amortiguaría este efecto, como consecuencia del movimiento térmico.

8.2.3. Resumen

A través del estudio de las disoluciones acuosas de ciclodextrinas en presencia de KCl se ha podido analizar el efecto de este soluto iónico y comprobar la hipótesis de que el ión Cl^- se introduce en la cavidad de la ciclodextrina, formando con ella un complejo de inclusión. Asimismo se han podido estimar los valores de las constantes de estabilidad de esta asociación, mediante la aplicación de un modelo teórico sencillo. También ha sido posible evaluar las variaciones que en el radio hidrodinámico de estas moléculas de ciclodextrina, induce la presencia de los iones K^+ y Cl^- presentes en la disolución, así como interpretar, en base a dichos resultados, de qué manera éstos afectan a la estructura de la especie difundente.

Se ha observado, por otra parte, que la interacción del ión Cl^- con la HP- β -CD es más intensa que con la β -CD y que esta asociación está favorecida a temperaturas más bajas.

8.3. La presencia de iones en la formación de complejos ciclodextrina-fármaco: ¿estabilización de estructuras ó competición por la inclusión?

El procedimiento seguido hasta este momento ha consistido en analizar, de manera individualizada, una serie de sistemas acuosos conteniendo cada uno de los compuestos involucrados en el desarrollo de un sistema de liberación controlada de un fármaco. En este momento, en que se ha analizado la molécula de fármaco (metilxantina), el vehículo transportador (la ciclodextrina) y los iones presentes en fluidos fisiológicos (aquí representados por el K^+ y el Cl^-), resulta interesante hacer un balance global y comprender de qué manera estos compuestos interaccionan entre sí y ejercen posibles influencias sobre las propiedades de los demás compuestos presentes.

En ese sentido, a través de la medida de los coeficientes de difusión en disoluciones cuaternarias, se han estudiado las propiedades de transporte de disoluciones acuosas de una xantina (cafeína y teofilina), en presencia de una ciclodextrina (β -CD y HP- β -CD) y de KCl.

Del resumen de los datos obtenidos hasta aquí, cabría esperar que, en una disolución acuosa con presencia de ciclodextrinas e iones, la cafeína se viese afectada por la presencia del K^+/Cl^- únicamente en cuanto a su asociación con la β -CD, ya que todas las constantes de asociación de estos sistemas presentan valores muy próximos entre sí. Podría, asimismo, verse afectada por dicha presencia, porque se estableciese una competición con los iones Cl^- , a 310,15 K, por ocupar la cavidad de la ciclodextrina. En presencia de HP- β -CD parecería

que tal competición no se produciría. Por otra parte, para la teofilina en una disolución acuosa conteniendo ciclodextrinas e iones, se esperaría que cuando está presente la HP- β -CD las moléculas de teofilina estarían incluidas en la cavidad de la ciclodextrina

8.3.1. Efecto del cloruro potásico sobre las disoluciones acuosas de ciclodextrina-cafeína

Para analizar el efecto de la presencia del cloruro potásico en los posibles agregados de ciclodextrina-cafeína en disolución acuosa, se midieron los coeficientes de difusión mutua de la cafeína en disoluciones acuosas con presencia de β -CD + KCl y de HP- β -CD + KCl, a diferentes relaciones de concentración entre ambos productos y a la temperatura estándar (298,15 K). El análisis teórico de la dependencia con la concentración, en sistemas de 4 componentes, es bastante complejo. Por ello, la discusión se planteará tan solo a nivel cualitativo y sobre la base de los datos obtenidos para los correspondientes coeficientes de difusión de estos compuestos, tanto en su disolución acuosa binaria, como en cada una de las mezclas acuosas ternarias de ellos con cada uno de los demás compuestos, cuyo análisis ya ha sido hecho con anterioridad a lo largo de esta Memoria de Tesis Doctoral.

8.3.1.1. Difusión en el sistema cuaternario β -CD (1)+ KCl (2) + cafeína (3) + agua

Los valores medios obtenidos para los coeficientes de difusión en el sistema cuaternario β -CD (1)+ cafeína (2) + KCl (3) + agua, a 298,15 K, se presentan en la tabla 8.6 [20].

Con el fin de poder establecer, de manera sencilla, correlaciones entre estos coeficientes de difusión, principales y secundarios, obtenidos en los sistemas cuaternarios, con los encontrados anteriormente para los correspondientes sistemas ternarios y binarios, en la tabla 8.7 se han detallado todos estos valores de los coeficientes de difusión principales y secundarios. Así, por ejemplo, el coeficiente de difusión principal $^{123}D_{33}$, correspondiente a la cafeína en la mezcla acuosa cuaternaria, se puede correlacionar con el coeficiente de difusión correspondiente a mezcla acuosa ternaria, D_{33} (esto es, en presencia bien de la ciclodextrina ó bien del KCl) y con su coeficiente de difusión binario, D (esto es, cafeína disuelta en agua).

Tabla 8.6. Coeficientes de difusión cuaternarios para el sistema β -CD (1)+ cafeína (2) + KCl (3) + agua, a 298,15 K y desviaciones estándar obtenidas, S_D [20]

	$c/(\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3})$		
	0,002	0,005	0,010
$(^{123}D_{11} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$0,322 \pm 0,025$	$0,320 \pm 0,005$	$0,311 \pm 0,020$
$(^{123}D_{12} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$-0,028 \pm 0,006$	$-0,022 \pm 0,008$	$-0,034 \pm 0,012$
$(^{123}D_{13} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$-0,002 \pm 0,017$	$0,020 \pm 0,009$	$0,055 \pm 0,040$
$(^{123}D_{21} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$0,505 \pm 0,013$	$0,210 \pm 0,017$	$-0,052 \pm 0,031$
$(^{123}D_{22} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$1,911 \pm 0,036$	$1,882 \pm 0,080$	$1,518 \pm 0,030$
$(^{123}D_{23} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$-0,121 \pm 0,042$	$-0,101 \pm 0,050$	$-0,104 \pm 0,030$
$(^{123}D_{31} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$-0,007 \pm 0,053$	$0,004 \pm 0,076$	$0,057 \pm 0,015$
$(^{123}D_{32} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$-0,030 \pm 0,040$	$0,001 \pm 0,073$	$0,141 \pm 0,026$
$(^{123}D_{33} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$0,797 \pm 0,073$	$0,770 \pm 0,029$	$0,748 \pm 0,012$

Tabla 8.7. Comparación entre los coeficientes de difusión cuaternarios con los correspondientes ternarios y binarios para el sistema acuoso β -CD (1) + KCl (2) + cafeína (3) a 298,15 K

	D_{11}^f	D_{12}^f	D_{13}^f	D_{21}^f	D_{22}^f	D_{23}^f	D_{31}^f	D_{32}^f	D_{33}^f
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 2 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,322	-0,028	-0,002	0,505	1,911	-0,121	-0,007	-0,030	0,797
$D_{ij}^{(b)}$	0,324	-0,068		-0,242	1,924				
$D_{ij}^{(c)}$	0,323		-0,008				0,016		0,735
$D_{ij}^{(d)}$					1,951	-0,165		-0,056	0,746
$D_{ij}^{(e)}$	0,324				1,954				0,751
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 5 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,320	-0,022	0,020	0,210	1,882	-0,101	0,004	0,001	0,770
$D_{ij}^{(b)}$	0,317	-0,088		-0,196	1,891				
$D_{ij}^{(c)}$	0,318		-0,011				0,014		0,725
$D_{ij}^{(d)}$					1,903	-0,210		-0,112	0,731
$D_{ij}^{(e)}$	0,322				1,934				0,738
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 10 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,311	-0,034	0,055	-0,052	1,518	-0,104	0,057	0,141	0,748
$D_{ij}^{(b)}$	0,313	-0,119		-0,057	1,848				
$D_{ij}^{(c)}$	0,313		-0,014				0,013		0,695
$D_{ij}^{(d)}$					1,844	0,104		-0,282	0,688
$D_{ij}^{(e)}$	0,316				1,918				0,703

^(a)Coeficientes de difusión cuaternarios para disoluciones acuosas de β -CD (1) + KCl (2) + cafeína (3)+ agua;

^(b)Coeficientes de difusión ternarios para las disoluciones acuosas de β -CD (1) + KCl (2);

^(c)Coeficientes de difusión ternarios para las disoluciones acuosas de β -CD (1) + cafeína (2);

^(d)Coeficientes de difusión ternarios para las disoluciones acuosas de KCl (1) + cafeína (2);

^(e)Coeficientes de difusión binarios para las disoluciones acuosas de β -CD, KCl y cafeína

^f Unidades de D en $10^{-9}.\text{m}^2.\text{s}^{-1}$

De esta manera resulta sencillo ver y evaluar los cambios que se van produciendo en la difusión de esta especie como consecuencia de la introducción progresiva de otros solutos, de carácter iónico o molecular, en la disolución acuosa. Asimismo, se pueden correlacionar los coeficientes de difusión secundarios relativos a la difusión en la mezcla cuaternaria, con los que se correspondan en la mezcla ternaria. Por ejemplo, $^{123}D_{31}$ y $^{123}D_{32}$, que representan los flujos de cafeína producidos por los gradientes de concentración de la ciclodextrina y del KCl, respectivamente, se pueden correlacionar con los D_{31} (para la cafeína en presencia únicamente de ciclodextrina) y D_{32} (para la cafeína en presencia tan solo de KCl). Este mismo análisis se puede aplicar, de manera análoga, a los demás componentes presentes en la disolución.

8.3.1.1.1. Coeficientes de difusión principales $^{123}D_{11}$, $^{123}D_{22}$ y $^{123}D_{33}$

Los coeficientes de difusión principales $^{123}D_{11}$, $^{123}D_{22}$ y $^{123}D_{33}$ representan los flujos molares de la β -CD (1), del cloruro potásico (2) y de la cafeína (3) impulsados por sus propios gradientes de concentración (tabla 8.6)

Puede apreciarse que, en el rango de concentraciones estudiadas, los valores de todos ellos disminuyen, aunque en cuantías diferentes, con el aumento de la concentración de los solutos. Así, el coeficiente $^{123}D_{11}$ disminuye alrededor del 3%, manteniendo su valor bastante próximo al encontrado para la ciclodextrina disuelta en agua. Por el contrario, $^{123}D_{22}$ disminuye de manera bastante significativa, hasta un 20%, y $^{123}D_{33}$, llega a disminuir algo más de un 6%. La pequeña disminución observada en el coeficiente de difusión de la β -CD, en contraposición con los decrecimientos más significativos obtenidos para los coeficientes de difusión principales de la cafeína y, sobre todo, del KCl, podrían indicar que las asociaciones que se producen entre la ciclodextrina y los demás solutos presentes, serían mayoritariamente de inclusión, motivo por el cual su movilidad se vería poco afectada. En principio, la inclusión predominante del KCl en la cavidad de la ciclodextrina, en detrimento de la cafeína, podría ser el motivo que justificase la disminución tan significativa que se observa en su coeficiente de difusión.

8.3.1.1.2. Difusión impulsada por gradientes de β -ciclodextrina

$^{123}D_{21}$ y $^{123}D_{31}$ representan los flujos acoplados de KCl y cafeína, respectivamente, generados por el gradiente de β -CD. Con relación a estos coeficientes, se comprueba que

mientras $^{123}D_{31}$ se aproxima a cero, dentro del error experimental, $^{123}D_{21}$ presenta valores que son distintos de cero y que podrían interpretarse en términos de la presencia de posibles interacciones entre la β -CD y el KCl (por ejemplo, dando origen a la formación de los complejos cuya constante de asociación se estimó en el apartado 8.1). Si se cuantifica el transporte de KCl a consecuencia del gradiente de β -CD (a partir del cociente $^{123}D_{21}/^{123}D_{11}$) se comprueba que, en las composiciones ensayadas, 1 mol de β -CD difundente, “*co-transportaría*” hasta 1,6 moles de cloruro potásico, en disoluciones diluidas (transporte que disminuye con el aumento de la concentración de los solutos)

8.3.1.1.3. Difusión impulsada por gradientes de cloruro potásico

Los valores de los coeficientes cuaternarios $^{123}D_{12}$ y $^{123}D_{32}$, que representan los flujos acoplados de β -CD y de cafeína, generados por el gradiente de KCl, presentan valores muy pequeños, próximos a cero dentro del error experimental. En consecuencia, habría que deducir de los mismos que los gradientes de KCl no tienen capacidad para generar flujos acoplados de los demás componentes de la disolución acuosa.

8.3.1.1.4. Difusión impulsada por gradientes de cafeína

Los coeficientes de difusión $^{123}D_{13}$ y $^{123}D_{23}$ representan los flujos acoplados de β -CD y KCl generados por los gradientes de concentración de cafeína. Como puede verse, $^{123}D_{13}$ es muy pequeño y puede despreciarse, dentro del error experimental. Es decir, los gradientes de cafeína no generan flujos acoplados significativos de la ciclodextrina. En cuanto a $^{123}D_{23}$, hay que señalar que mantiene sus valores aproximadamente constantes y, a partir de los valores en D_{23}/D_{33} , en las mismas composiciones, cabe esperar que 1 mol de teofilina difundente “*contra-transporte*” (es decir, transporte en sentido contrario al de su gradiente de concentración) aproximadamente 0,15 moles de KCl; valor que es ligeramente inferior al encontrado para el sistema acuoso KCl + cafeína.

Por tanto, en virtud de los resultados encontrados a partir del análisis de los coeficientes de difusión cuaternarios principales y secundarios, así como de los flujos generados por la difusión de estos solutos, comparados con las mezclas ternarias, y a los resultados de los sistemas binarios, parece haber suficientes evidencias de que podría darse una competencia, entre la cafeína y el KCl, por entrar en la cavidad de la ciclodextrina. Por otra parte, el descenso del 20 % observado en el coeficiente de difusión del KCl, considerado

conjuntamente con el transporte de cantidades significativas de KCl como consecuencia de la difusión de la ciclodextrina y de la cafeína, parecen evidenciar que este soluto, el KCl, tiene tendencia a asociarse y formar agregados β -CD-KCl y cafeína-KCl, tal y como se evidencia al observar los valores, bastante próximos entre sí, obtenidos para las correspondientes constantes de asociación.

8.3.1.2. Difusión en el sistema cuaternario HP- β -CD (1)+ KCl (2) + cafeína (3) + agua

Los valores promedio de los coeficientes de difusión obtenidos para el sistema cuaternario HP- β -CD (1)+ cafeína (2) + KCl (3) + agua, a 298,15 K, están recogidos en la tabla 8.8.

Tabla 8.8. Coeficientes de difusión cuaternarios para la HP- β -CD (1)+ KCl (2) + cafeína (3) + agua, a 298,15 K y respectivas desviaciones estándar, S_D

	$c/(\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3})$		
	0,002	0,005	0,010
$(^{123}D_{11} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$0,313 \pm 0,008$	$0,315 \pm 0,010$	$0,309 \pm 0,007$
$(^{123}D_{12} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$0,149 \pm 0,031$	$0,098 \pm 0,018$	$0,092 \pm 0,023$
$(^{123}D_{13} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$-0,023 \pm 0,010$	$-0,009 \pm 0,005$	$-0,029 \pm 0,008$
$(^{123}D_{21} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$0,052 \pm 0,059$	$0,172 \pm 0,057$	$0,263 \pm 0,106$
$(^{123}D_{22} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$2,116 \pm 0,032$	$1,996 \pm 0,085$	$1,802 \pm 0,090$
$(^{123}D_{23} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$-0,096 \pm 0,079$	$0,082 \pm 0,029$	$0,006 \pm 0,032$
$(^{123}D_{31} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$0,077 \pm 0,044$	$0,054 \pm 0,016$	$0,047 \pm 0,117$
$(^{123}D_{32} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$-0,595 \pm 0,144$	$-0,240 \pm 0,069$	$-0,149 \pm 0,084$
$(^{123}D_{33} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$0,797 \pm 0,035$	$0,687 \pm 0,032$	$0,673 \pm 0,028$

Asimismo, en la tabla 8.9 se detallan, a fin de permitir su fácil correlación, los valores de los coeficientes de difusión principales y secundarios obtenidos con anterioridad en las medidas de los sistemas binarios y ternarios, analizándose los cambios observados.

Tabla 8.9. Comparación de los coeficientes de difusión cuaternarios con los correspondientes ternarios y binarios para el sistema acuoso HP- β -CD (1) + KCl (2) + cafeína (3) a 298,15 K

	D_{11}^f	D_{12}^f	D_{13}^f	D_{21}^f	D_{22}^f	D_{23}^f	D_{31}^f	D_{32}^f	D_{33}^f
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 2 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,313	0,149	-0,023	0,052	2,116	-0,096	0,077	-0,595	0,758
$D_{ij}^{(b)}$	0,324	0,012		-0,130	1,930				
$D_{ij}^{(c)}$	0,300		0,003				0,050		0,744
$D_{ij}^{(d)}$					1,951	-0,165		-0,056	0,746
$D_{ij}^{(e)}$	0,319				1,954				0,751
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 5 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,315	0,098	-0,009	0,172	1,996	0,082	0,054	-0,240	0,687
$D_{ij}^{(b)}$	0,317	-0,024		-0,089	1,808				
$D_{ij}^{(c)}$	0,293		-0,011				0,054		0,665
$D_{ij}^{(d)}$					1,903	-0,210		-0,112	0,731
$D_{ij}^{(e)}$	0,314				1,934				0,738
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 10 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,309	0,092	-0,029	0,263	1,802	0,006	0,047	-0,149	0,673
$D_{ij}^{(b)}$	0,308	-0,003		0,246	1,778				
$D_{ij}^{(c)}$	0,283		-0,021				0,103		0,640
$D_{ij}^{(d)}$					1,844	0,104		-0,282	0,688
$D_{ij}^{(e)}$	0,307				1,918				0,703

^(a) Coeficientes de difusión cuaternarios para disoluciones acuosas de HP- β -CD (1) + KCl (2) + cafeína (3) + agua;

^(b) Coeficientes de difusión ternarios para las disoluciones acuosas de HP- β -CD (1) + KCl (2);

^(c) Coeficientes de difusión ternarios para las disoluciones acuosas de HP- β -CD (1) + cafeína (2);

^(d) Coeficientes de difusión ternarios para las disoluciones acuosas de KCl (1) + cafeína (2);

^(e) Coeficientes de difusión binarios para las disoluciones acuosas de HP- β -CD, KCl y cafeína

^f Unidades de D en $10^{-9} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

8.3.1.2.1. Coeficientes de difusión principales $^{123}D_{11}$, $^{123}D_{22}$ y $^{123}D_{33}$

Los coeficientes de difusión principales $^{123}D_{11}$, $^{123}D_{22}$ y $^{123}D_{33}$ miden los flujos molares de la HP- β -CD (1), del cloruro de potásico (2) y de la cafeína (3) impulsados por sus propios gradientes de concentración (Tabla 8.8)

Del análisis de la tabla 8.8 se puede deducir que el valor del coeficiente $^{123}D_{11}$ es prácticamente independiente del aumento de la concentración de los solutos en la disolución acuosa, ya que sus cambios (del 1,5%, aproximadamente) tanto frente a la concentración como respecto al correspondiente valor encontrado en el sistema binario (HP- β -CD en disolución acuosa) se encuentran dentro del intervalo del error experimental, que es del 1-2%. Por el contrario, los demás coeficientes de difusión sí experimentan disminuciones

importantes que están en torno al 15% tanto en el caso del $^{123}D_{22}$, esto es, para el KCl, como en el del $^{123}D_{33}$, o sea, para la cafeína. Al igual que sucediese en el sistema anteriormente analizado, la pequeña disminución del coeficiente de difusión de la HP- β -CD indicaría que las asociaciones entre la ciclodextrina y los demás solutos, de existir, serían mayoritariamente de inclusión, motivo por el cual su movilidad se vería muy poco afectada. Por el contrario, las disminuciones más elevadas encontradas para los coeficientes de difusión principales de la cafeína y del KCl vendrían justificadas por su consiguiente inclusión en la cavidad de la ciclodextrina. Dado que ambas son similares, se analiza a continuación el efecto que el gradiente de concentración de cada uno de los solutos presentes en la disolución, produce sobre los demás solutos, con el fin de intuir cuál de ellos sería el que presentaría una mayor tendencia a entrar en la cavidad de la ciclodextrina.

8.3.1.2.2. Difusión impulsada por gradientes de hidroxipropil- β -ciclodextrina

$^{123}D_{21}$ y $^{123}D_{31}$ representan, respectivamente, los flujos acoplados de KCl y cafeína, producidos por el gradiente de HP- β -CD. Al examinar estos coeficientes puede verse que ambos son positivos, lo que significa que el gradiente de HP- β -CD “*co-transporta*”, en ambos casos, en el mismo sentido de su gradiente de concentración, tanto cafeína como KCl. Pero, mientras que 1 mol de HP- β -CD difundente “*co-transportaría*” hasta casi 0,25 moles de cafeína, en el caso del KCl ese “*co-transporte*” puede alcanzar los 0,85 moles, valor superior al encontrado para el correspondiente sistema ternario y que podría interpretarse en términos de la existencia de posibles interacciones importantes entre la HP- β -CD y el KCl (por ejemplo, para dar origen a los complejos cuya constante de asociación ya fue estimada en el apartado 8.1)

8.3.1.2.3. Difusión impulsada por gradientes de cloruro potásico

Los valores de los coeficientes de difusión cuaternarios $^{123}D_{12}$ y $^{123}D_{32}$ representan los flujos acoplados de HP- β -CD y cafeína generados por los gradientes de KCl. Los valores obtenidos para $^{123}D_{12}$ son pequeños y podría considerarse que entran dentro del error experimental, por lo que pueden ser despreciados. $^{123}D_{32}$, por el contrario, presenta valores distintos de cero que implicarían que tendría lugar un “*contra-transporte*” de cafeína (que ocurre en sentido contrario al de su gradiente de concentración), como consecuencia del gradiente de KCl, con un valor máximo próximo a 0,3 moles de cafeína por cada 1 mol de KCl que

difunde en la disolución, valor que disminuye con el aumento de la concentración de solutos en la disolución. Tal situación es la opuesta a la que ocurría en los sistemas ternarios cafeína + KCl.

8.3.1.2.4. Difusión impulsada por gradientes de cafeína

Los coeficientes de difusión $^{123}D_{13}$ y $^{123}D_{23}$, que informan acerca de los flujos acoplados de HP- β -CD y de KCl, originados por los gradientes de concentración de cafeína, presentan valores muy pequeños por lo que, dentro del error experimental, se pueden tomar como cero. Es decir, el gradiente de cafeína no generaría un flujo acoplado significativo de ciclodextrina (en base a los datos aquí obtenidos, no se transportaría más de 0,04 moles de ciclodextrina por cada mol de cafeína que difunde), ni de KCl (cuyo valor, a partir de los datos aquí obtenidos, se desvanece con el aumento de concentración de solutos en la disolución). Esta situación es contraria a la encontrada para el sistema ternario correspondiente.

En el caso del sistema acuoso HP- β -CD (1) + KCl (2) + cafeína (3) y a partir de los estudios previos realizados para los sistemas ternarios que lo componen, cabría esperar resultados que evidenciaran la inclusión de la cafeína en la cavidad de la ciclodextrina, en detrimento de la entrada del KCl. En realidad, a partir de los coeficientes de difusión principales, se observa, como se ha comentado anteriormente, que la difusión de la ciclodextrina no se ve afectada por la presencia de los demás solutos, lo que señala que debe tener lugar la formación de complejos de inclusión. Con el aumento de concentración de los solutos en el medio, se observa que la evolución de los flujos generados por los gradientes de concentración van en la dirección de señalar que o bien tiene lugar una asociación más estable ciclodextrina + cafeína y menos estable ciclodextrina + KCl, o bien dicha asociación se produce entre cafeína + KCl. Incluso, parecería que, en las disoluciones más diluídas, el KCl podría experimentar un efecto de *salting out*, al presentar valores más elevados para sus coeficientes de difusión, que los obtenidos en agua.

8.3.2. Efecto del cloruro potásico sobre las disoluciones acuosas de ciclodextrina-teofilina

Al igual que en el caso de la cafeína, para entender el efecto que la presencia de cloruro potásico puede ejercer sobre los posibles agregados formados entre la ciclodextrina y la teofilina en disolución acuosa, se realizaron medidas de los coeficientes de difusión mutua de disoluciones acuosas de teofilina en presencia de β -CD + KCl y de HP- β -CD + KCl, para diferentes relaciones de concentración y a la temperatura estándar (298,15 K), comparándose asimismo estos valores con los correspondientes encontrados para los sistemas binarios y ternarios.

8.3.2.1. Difusión en el sistema cuaternario β -CD (1)+ KCl (2) + teofilina (3) + agua

En la tabla 8.10 se presentan los valores promedio de los coeficientes de difusión obtenidos para el sistema cuaternario β -CD (1)+ teofilina (2) + KCl (3) + agua, a 298,15 K. Asimismo, siguiendo el mismo patrón de análisis establecido en los análisis precedentes, en la tabla 8.11 se presentan, para un análisis más detallado, los coeficientes de difusión, principales y secundarios, tanto para el sistema cuaternario, como para las correspondientes mezclas acuosas ternarias y binarias.

Tabla 8.10. Coeficientes de difusión cuaternarios para la β -CD (1)+ KCl (2) + teofilina (3) + agua, a 298,15 K y respectivas desviaciones estándar, S_D

	c/(mol·dm ⁻³)		
	0,002	0,005	0,010
$(^{123}D_{11} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	0,328 ± 0,002	0,304 ± 0,014	0,289 ± 0,008
$(^{123}D_{12} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	0,009 ± 0,025	0,039 ± 0,070	0,033 ± 0,056
$(^{123}D_{13} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	0,003 ± 0,018	0,029 ± 0,068	0,030 ± 0,045
$(^{123}D_{21} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	-0,052 ± 0,010	-0,176 ± 0,043	-0,143 ± 0,251
$(^{123}D_{22} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	2,011 ± 0,071	1,870 ± 0,081	1,719 ± 0,045
$(^{123}D_{23} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	0,043 ± 0,096	0,187 ± 0,240	0,347 ± 0,248
$(^{123}D_{31} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	0,029 ± 0,224	-0,020 ± 0,208	-0,275 ± 0,136
$(^{123}D_{32} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	-0,279 ± 0,128	-0,273 ± 0,079	-0,068 ± 0,086
$(^{123}D_{33} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	0,706 ± 0,034	0,631 ± 0,023	0,583 ± 0,036

Tabla 8.11. Comparación de los coeficientes de difusión cuaternarios con los correspondientes ternarios y binarios para el sistema acuoso

β -CD (1) + KCl (2) + teofilina (3) a 298,15 K

	D_{11}^f	D_{12}^f	D_{13}^f	D_{21}^f	D_{22}^f	D_{23}^f	D_{31}^f	D_{32}^f	D_{33}^f
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 2 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,328	0,009	0,003	-0,052	2,011	0,043	0,029	-0,279	0,706
$D_{ij}^{(b)}$	0,324	-0,068		-0,242	1,959				
$D_{ij}^{(c)}$	0,321		-0,003				0,004		0,721
$D_{ij}^{(d)}$					1,847	-0,024		-0,012	0,783
$D_{ij}^{(e)}$	0,324				1,954				0,785
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 5 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,304	0,039	0,029	-0,176	1,870	0,187	-0,020	-0,273	0,631
$D_{ij}^{(b)}$	0,317	-0,088		-0,196	1,937				
$D_{ij}^{(c)}$	0,316		0,005				-0,024		0,683
$D_{ij}^{(d)}$					1,842	-0,313		-0,108	0,765
$D_{ij}^{(e)}$	0,322				1,934				0,762
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 10 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,289	0,033	0,030	-0,143	1,719	0,347	-0,275	-0,068	0,583
$D_{ij}^{(b)}$	0,313	-0,119		-0,059	1,925				
$D_{ij}^{(c)}$	0,309		-0,016				-0,063		0,628
$D_{ij}^{(d)}$					1,690	-0,359		-0,103	0,736
$D_{ij}^{(e)}$	0,316				1,918				0,734

^(a) Coeficientes de difusión cuaternarios para disoluciones acuosas de β -CD (1) + KCl (2) + teofilina (3) + agua;

^(b) Coeficientes de difusión ternarios para las disoluciones acuosas de β -CD (1) + KCl (2);

^(c) Coeficientes de difusión ternarios para las disoluciones acuosas de β -CD (1) + teofilina (2);

^(d) Coeficientes de difusión ternarios para las disoluciones acuosas de KCl (1) + teofilina (2);

^(e) Coeficientes de difusión binarios para las disoluciones acuosas de β -CD, KCl y teofilina

^f Unidades de D en $10^{-9} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

8.3.2.1.1. Coeficientes de difusión principales $^{123}D_{11}$, $^{123}D_{22}$ y $^{123}D_{33}$

Los coeficientes de difusión principales $^{123}D_{11}$, $^{123}D_{22}$ y $^{123}D_{33}$ dan los flujos molares de la β -CD (1), del cloruro potásico (2) y de la teofilina (3), impulsados por sus propios gradientes de concentración (Tabla 8.10)

Como puede verse, el valor del coeficiente $^{123}D_{11}$ disminuye con el aumento de la concentración de los solutos, en el rango de concentraciones estudiado, alrededor del 12%. Asimismo, $^{123}D_{22}$ y $^{123}D_{33}$ también disminuyen con la concentración, siendo esta disminución en $^{123}D_{22}$ del orden del 14,5% y en $^{123}D_{33}$ algo superior, hasta llegar al 17,5%. Estas elevadas disminuciones podrían ser explicadas bien como consecuencia del aumento de viscosidad en las disoluciones, debido al aumento del número de componentes presentes en la disolución

acuosa, o bien porque tiene lugar una mayor interacción entre los solutos. Sin embargo, las variaciones observadas en las viscosidades de los sistemas ternarios correspondientes no son lo suficientemente importantes como para justificar, en una mezcla cuaternaria, un descenso de este orden. Por tanto, una explicación más razonable tendría que basarse en la posible formación de agregados entre los solutos, que daría lugar a especies menos móviles y que llevaría, consecuentemente, a una disminución elevada en los valores de sus coeficientes de difusión.

Se ha intentado encontrar un procedimiento que permita predecir los valores de $^{123}D_{11}$, $^{123}D_{22}$ y $^{123}D_{33}$ a partir de los coeficientes de difusión ternarios, D_{11} , D_{22} y D_{33} , en los sistemas correspondientes. Sin embargo, los cocientes entre los valores de los coeficientes de difusión cuaternario y ternario correspondiente no son constantes, sino que disminuyen con el aumento en la concentración de los solutos en disolución, lo que pone de evidencia que el tipo de interacción que se está produciendo tiene una influencia directa sobre el coeficiente de difusión y no puede ser explicado como si únicamente se tratase de un sencillo proceso de asociación.

8.3.2.1.2. Difusión impulsada por gradientes de β -ciclodextrina

Los coeficientes $^{123}D_{21}$ y $^{123}D_{31}$, que representan los flujos acoplados de KCl y de teofilina generados por los gradientes de β -CD, aumentan con carácter general su magnitud, cuando crece la concentración del soluto, haciéndose cada vez más negativos, lo que indica que existen flujos acoplados de solutos. Sus valores pueden ser interpretados en términos de las variaciones que ocurren en las interacciones entre β -CD + KCl ó β -CD + teofilina para disoluciones diluidas (los complejos 1:1 anteriormente señalados) lo que, por otra parte, también explicaría las importantes disminuciones observadas en los coeficientes de difusión principales. Si se tiene en cuenta que D_{21}/D_{11} informa acerca del número de moles de cloruro potásico transportados por mol de β -CD, impulsado por la acción de su propio gradiente de concentración, se puede considerar que en las composiciones utilizadas en este trabajo, 1 mol de β -CD que difunde, “*contra-transporta*” (en sentido opuesto a su gradiente de concentración) un máximo de 0,6 moles de cloruro potásico. A partir de los valores encontrados para el cociente D_{31}/D_{11} a las mismas composiciones, cabe esperar que 1 mol de β -CD, cuando difunde “*contra-transporte*” (en sentido contrario a su gradiente de concentración) un máximo de 0,95 moles de teofilina. A partir de los valores encontrados para estos coeficientes de difusión secundaria en los sistemas ternarios correspondientes, se aprecia que existe poca

variación en relación al transporte de KCl por motivo de la difusión de la β -CD. Finalmente, se observa que la cantidad de teofilina transportada por la β -CD, tanto en presencia únicamente de la ciclodextrina, como en presencia de β -CD + KCl, se incrementa.

8.3.2.1.3. Difusión impulsada por gradientes de cloruro potásico

Los valores de los coeficientes cuaternarios de difusión $^{123}D_{12}$ y $^{123}D_{32}$ representan los flujos de β -CD y teofilina acoplados a la difusión del KCl bajo la acción de su propio gradiente de concentración. Los valores que se obtienen para $^{123}D_{12}$ son pequeños y están dentro del orden del error experimental. Es decir, el gradiente de KCl no genera un flujo acoplado de β -CD, de igual manera que tampoco se vio que lo hacía al analizar el sistema acuoso ternario β -CD (1) + KCl (2).

No sucede lo mismo con el coeficiente $^{123}D_{32}$, que presenta valores negativos y bastante distintos de cero, posiblemente debido a la existencia de asociación entre las moléculas de teofilina y los iones potasio en disolución. Cuantitativamente, se puede observar que el transporte de teofilina debido al gradiente de KCl desciende desde 0,24 hasta 0,04 moles de teofilina “*contra-transportados*” por 1 mol de KCl difundente, en el intervalo de concentración estudiado. Esta disminución de la cantidad de teofilina transportada, puede deberse a un cambio en la preferencia de las interacciones de dicha teofilina hacia otros componentes presentes en la disolución, en especial hacia la ciclodextrina.

8.3.2.1.4. Difusión impulsada por gradientes de teofilina

Los coeficientes de difusión $^{123}D_{13}$ y $^{123}D_{23}$ representan los flujos acoplados de β -CD y de KCl ocasionados por el gradiente de concentración de la teofilina. El valor de $^{123}D_{13}$ es muy pequeño y está dentro del error experimental. Como se ha visto anteriormente, el gradiente de teofilina no genera flujos acoplados significativos de la ciclodextrina aunque, en base a los resultados aquí encontrados, 1 mol de teofilina difundente “*co-transportaría*”, en el mismo sentido de su gradiente de concentración, un máximo de 0,05 moles de β -CD, aumentando dicha cantidad con el aumento de la concentración de solutos en la disolución. Con respecto a $^{123}D_{23}$, sus valores son positivos y aumentan de manera importante con el incremento de la concentración de los solutos, llegando a alcanzar valores relativamente grandes. A partir de los cocientes D_{23}/D_{33} para las mismas composiciones, cabe esperar que 1 mol de teofilina difundente “*co-transporte*” (es decir, transporte en el mismo sentido de su gradiente de

concentración) hasta un máximo de 0,6 moles de KCl, situación que es la contraria a la que se encontró al estudiar el sistema acuoso KCl + teofilina.

Del análisis previo de los resultados encontrados para los coeficientes de difusión principales y secundarios de la mezcla cuaternaria β -CD (1) + KCl (2) + teofilina (3), así como de los flujos generados por la difusión de estos solutos en las mezclas ternarias y de los resultados de los sistemas binarios, puede afirmarse que hay evidencias de que podría existir una verdadera competencia entre la teofilina y el KCl, incluso podría darse cierta preferencia hacia el KCl, por incorporarse al interior de la cavidad de la ciclodextrina. El transporte, por la ciclodextrina, de cantidades de KCl realmente significativas y que estaría asociado a la disminución de hasta un 15% observada en su coeficiente de difusión, parece indicar inequívocamente que este soluto, en la mezcla cuaternaria, tiende a asociarse preferencialmente a la β -CD.

8.3.2.2. Difusión en el sistema cuaternario HP- β -CD (1)+ KCl (2) + teofilina (3) + agua

En las tablas 8.12 y 8.13 se presentan, respectivamente, los valores medios de los coeficientes de difusión para el sistema cuaternario HP- β -CD (1)+ teofilina (2) + KCl (3) + agua, a 298,15 K, y la relación de éstos con los correspondientes a los sistemas ternarios y binarios, en las disoluciones respectivas.

Tabla 8.12. Coeficientes de difusión cuaternarios para la HP- β -CD (1)+ KCl (2) + teofilina (3) + agua, a 298,15 K y respectivas desviaciones estándar, S_D

	$c/(\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3})$		
	0,002	0,005	0,010
$(^{123}D_{11} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	0,322 \pm 0,013	0,311 \pm 0,012	0,307 \pm 0,014
$(^{123}D_{12} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	0,020 \pm 0,031	-0,015 \pm 0,010	-0,002 \pm 0,017
$(^{123}D_{13} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	-0,059 \pm 0,026	0,031 \pm 0,020	0,003 \pm 0,010
$(^{123}D_{21} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	0,149 \pm 0,117	0,180 \pm 0,093	0,393 \pm 0,375
$(^{123}D_{22} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	2,028 \pm 0,091	1,940 \pm 0,060	1,842 \pm 0,042
$(^{123}D_{23} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	0,230 \pm 0,054	0,129 \pm 0,101	0,186 \pm 0,120
$(^{123}D_{31} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	-0,013 \pm 0,097	-0,014 \pm 0,030	-0,258 \pm 0,074
$(^{123}D_{32} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	-0,470 \pm 0,168	-0,240 \pm 0,051	-0,120 \pm 0,014
$(^{123}D_{33} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	0,719 \pm 0,049	0,646 \pm 0,022	0,556 \pm 0,045

Tabla 8.13. Comparación de los coeficientes de difusión cuaternarios con los correspondientes ternarios y binarios para el sistema acuoso HP- β -CD (1)+ KCl (2) + teofilina (3) +agua a 298,15 K

	D_{11}^f	D_{12}^f	D_{13}^f	D_{21}^f	D_{22}^f	D_{23}^f	D_{31}^f	D_{32}^f	D_{33}^f
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 2 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,322	0,020	-0,059	0,149	2,028	0,230	-0,013	-0,470	0,719
$D_{ij}^{(b)}$	0,324	0,012		-0,130	1,930				
$D_{ij}^{(c)}$	0,306		0,002				0,068		0,756
$D_{ij}^{(d)}$					1,847	-0,024		-0,012	0,783
$D_{ij}^{(e)}$	0,319				1,954				0,785
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 5 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,311	-0,015	0,031	0,180	1,940	0,129	-0,014	-0,240	0,646
$D_{ij}^{(b)}$	0,317	-0,024		-0,089	1,808				
$D_{ij}^{(c)}$	0,301		0,024				0,063		0,682
$D_{ij}^{(d)}$					1,842	-0,313		-0,108	0,765
$D_{ij}^{(e)}$	0,314				1,934				0,762
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 10 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,307	-0,002	0,003	0,393	1,842	0,186	-0,258	-0,120	0,556
$D_{ij}^{(b)}$	0,308	-0,003		0,246	1,798				
$D_{ij}^{(c)}$	0,298		-0,029				-0,009		0,548
$D_{ij}^{(d)}$					1,690	-0,359		-0,103	0,736
$D_{ij}^{(e)}$	0,307				1,918				0,734

^(a)Coeficientes de difusión cuaternarios para disoluciones acuosas de HP- β -CD (1) + KCl (2) + teofilina (3)+ agua;

^(b)Coeficientes de difusión ternarios para las disoluciones acuosas de HP- β -CD (1) + KCl (2);

^(c)Coeficientes de difusión ternarios para las disoluciones acuosas de HP- β -CD (1) + teofilina (2);

^(d)Coeficientes de difusión ternarios para las disoluciones acuosas de KCl (1) + teofilina (2);

^(e)Coeficientes de difusión binarios para las disoluciones acuosas de HP- β -CD, KCl y teofilina

^f Unidades de D en $10^{-9} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

8.3.2.2.1. Coeficientes de difusión principales $^{123}D_{11}$, $^{123}D_{22}$ y $^{123}D_{33}$

Se observa que el coeficiente de difusión $^{123}D_{11}$ disminuye, en torno al 3%, al aumentar la concentración de los solutos en la disolución. El valor de este coeficiente es muy similar a su correspondiente binario y a los coeficientes ternarios encontrados en los demás sistemas bajo estudio (Tabla 8.13) y se puede estimar a partir de ellos. En efecto, se ha encontrado que $^{123}D_{11}$, en la mezcla cuaternaria decrece de acuerdo a un factor de 0,98 respecto a D_{11} en el sistema HP- β -CD + KCl y que es 1,03 veces mayor que en el sistema HP- β -CD + teofilina. La suma de estos efectos compensadores conduce a un valor del coeficiente cuaternario muy cercano al valor binario encontrado.

En cuanto a los coeficientes $^{123}D_{22}$ y $^{123}D_{33}$ los cambios observados son mayores. En el

caso del $^{123}D_{22}$ se observa que se produce una disminución del 9%, aproximadamente, al aumentar la concentración de los solutos, aunque como puede verse, los valores encontrados son, en general, ligeramente superiores a los que presentan los coeficientes de difusión binario y ternarios (tabla 8.13), esto es, el KCl en agua o el KCl en disolución acuosa con presencia de HP- β -CD. En general, los cambios que tienen lugar en $^{123}D_{22}$ respecto a D_{22} revelan que, dentro del error experimental, el coeficiente cuaternario de difusión es superior a los correspondientes ternarios en un factor de 1,05, salvo para la concentración más elevada.

Las diferencias mayores se observan en el coeficiente de difusión cuaternario principal para la teofilina, $^{123}D_{33}$, que experimenta una caída de casi el 21%, al aumentar la concentración, respecto al valor de su coeficiente de difusión binario, esto es, para una disolución acuosa de teofilina. La comparación con el valor del coeficiente D_{33} de la teofilina en el sistema ternario con presencia de KCl, pone de manifiesto que los cambios están entre el 8 y el 23%. También se encuentra que $^{123}D_{33}$ es aproximadamente un 5% menor que el valor obtenido en el sistema ternario con ausencia de la sal (tabla 8.13).

8.3.2.2.2. Difusión impulsada por gradientes de hidroxipropil- β -ciclodextrina

$^{123}D_{21}$ y $^{123}D_{31}$ representan los flujos acoplados de KCl y de teofilina, generados por el gradiente de HP- β -CD. Se puede ver que para ambos coeficientes de difusión, los valores aumentan en magnitud con el aumento de la concentración de los solutos. $^{123}D_{21}$ es grande y positivo, mientras que $^{123}D_{31}$ es negativo, lo que muestra claramente la existencia de flujos acoplados de solutos. Los valores elevados observados en $^{123}D_{21}$ pueden interpretarse en términos de la presencia de interacciones entre la HP- β -CD y el KCl para disoluciones diluidas. Si se tiene en cuenta que D_{21}/D_{11} representa el número de moles de cloruro potásico “*co-transportados*” por 1 mol de HP- β -CD, impulsado por su propio gradiente de concentración, se tendría que en las composiciones ensayadas, 1 mol de HP- β -CD difundente “*co-transportaría*” hasta 1,3 moles de cloruro potásico. A partir de los valores de D_{31}/D_{11} en las mismas composiciones, cabe esperar que 1 mol de HP- β -CD al difundir “*contra-transporte*” (esto es, en el sentido contrario al de su gradiente de concentración) un máximo de 0,84 moles de teofilina. Esto supone un cambio significativo en el transporte de los solutos respecto a lo que sucedía en los correspondientes sistemas ternarios, ya que el transporte de teofilina en presencia de ciclodextrina tenía lugar en el sentido contrario al ahora encontrado, esto es, en el sentido del gradiente de concentración de ésta última, además de que ahora el transporte de KCl acoplado al transporte de la ciclodextrina se incrementa.

8.3.2.2.3. Difusión impulsada por gradientes de cloruro potásico

Los valores para los coeficientes de difusión cuaternarios $^{123}D_{12}$ y $^{123}D_{32}$ representan los flujos acoplados de HP- β -CD y teofilina, producidos como consecuencia del gradiente de concentración del KCl.

Se observa que $^{123}D_{12}$ es muy pequeño y del orden del error experimental. Es decir, no se deducen flujos acoplados de HP- β -CD producidos por el gradiente de KCl. Al analizar el valor de D_{12} obtenido en los sistemas ternarios correspondientes, se observan los mismos resultados. Se puede considerar, pues, que los gradientes de KCl no producen flujos apreciables acoplados de los componentes no-electrolíticos en disolución, debido a que los iones K^+ y Cl^- tienen movilidades muy similares y, por consiguiente, el campo eléctrico generado a consecuencia de la difusión del KCl es relativamente pequeño.

Respecto a $^{123}D_{32}$, los valores encontrados son negativos y distintos de cero. Una posible explicación de estos hechos se podría encontrar recurriendo a considerar que algunas moléculas de teofilina y de KCl podrían existir en disolución en forma de agregados (por ejemplo, en forma de complejos *teofilina-K⁺*). Sin embargo, si se analiza el transporte de teofilina debido al gradiente de KCl, se puede ver que éste cae, con el aumento de la concentración de los solutos, desde 0,23 hasta 0,07 moles de teofilina, transportados en sentido contrario a su gradiente de concentración, por 1 mol de KCl difundente, valores que son inferiores a los encontrados en el sistema teofilina-KCl.

8.3.2.2.4. Difusión impulsada por gradientes de teofilina

Los coeficientes de difusión $^{123}D_{13}$ y $^{123}D_{23}$ representan, respectivamente, los flujos acoplados de HP- β -CD y de KCl, producidos por los gradientes de teofilina. $^{123}D_{13}$ es pequeño y del orden del error experimental. Al igual que sucediese al analizar el coeficiente secundario $^{123}D_{12}$, los gradientes de teofilina no generan flujos acoplados significativos de HP- β -CD, situación análoga a la que se observó al analizar los sistemas ternarios correspondientes.

En cuanto a $^{123}D_{23}$, los valores encontrados son casi constantes. Es decir, el transporte de KCl ocasionado por el gradiente de teofilina, no parece verse afectado por las variaciones en la concentración de los solutos presentes en la disolución.

Para el sistema acuoso HP- β -CD (1) + KCl (2) + teofilina (3), a partir de los estudios previos que se realizaron para los sistemas ternarios que lo componen, se esperarían resultados que evidenciaran la inclusión de la teofilina en la cavidad de la ciclodextrina, en perjuicio del KCl. En realidad, a partir de los valores de los coeficientes de difusión principales, se observa que la difusión de la ciclodextrina se ve muy poco afectada por los demás solutos presentes, lo que parece indicar que de existir complejos, éstos serían de inclusión. Por otra parte, se encuentra que con el aumento de concentración de los solutos, los flujos generados por los gradientes de concentración evidencian una asociación más estable entre ciclodextrina y teofilina, pues se obtiene para ellos valores elevados y negativos. La posible asociación entre la HP- β -CD y el KCl sería muy débil, pero para las moléculas de teofilina libres en disolución podría existir cierta tendencia a asociarse al KCl.

8.3.3. Resumen

La introducción de iones en sistemas de liberación controlada de fármacos que incluyen ciclodextrinas, produce efectos sobre dichos sistemas. En el caso de que estos sistemas incluyan β -CD, la asociación de ésta con los fármacos se ve debilitada por la posible competencia que parece establecerse entre la molécula de fármaco y los iones, por ocupar la cavidad de la ciclodextrina.

Aun así, parece ser que la hidrofobicidad es un factor importante pues, incluso en una situación en la cual las constantes de asociación en disolución acuosa posean valores próximos, habría mayor tendencia a que la molécula del fármaco se introdujese en la cavidad de la ciclodextrina y que la asociación con los iones se produjese bien por la parte externa de la ciclodextrina expuesta al medio, o bien que esta asociación se realizase con las moléculas de fármaco que se encontrasen libres en la disolución.

Referencias bibliográficas

- [1] Mochida K., Kagita A., Matsui Y., Date Y., “*Effects of Inorganic Salts on the Dissociation of a Complex of β -Cyclodextrin with an Azo Dye in an Aqueous Solution*”, Bull. Chem. Soc. Jpn., 46 (1973) 3703–3707.
- [2] Dey J., Roberts E. L., Warner I. M., “*Effect of Sodium Perchlorate on the Binding of 2-(4'-Aminophenyl)- and 2-(4'-(N,N'-Dimethylamino)phenyl)benzothiazole with β -Cyclodextrin in Aqueous Solution*”, J. Phys. Chem. A, 102 (1998) 301–305.
- [3] Yi Z., Zhao C., Huang Z., Chen H. Y., “*Investigation of buffer-cyclodextrin systems*”, Phys. Chem. Chem. Phys., 1 (1999) 441–444.
- [4] Maaieh A. Al., Flanagan D. R., “*Salt effects on caffeine solubility, distribution and self association*”, J. Pharm. Sci., 91 (2002) 1000-1008.
- [5] Nafisi S., Monajemi M., Ebrahimi S., “*The effects of mono- and divalent metal cations on the solution structure of caffeine and theophylline*”, J. Mol. Struct., 705 (2004) 35-39.
- [6] Leaist D. G., “*Ternary diffusion coefficients of 18-crown-6 ether–KCl–water by direct least-squares analysis of Taylor dispersion measurements*”, J. Chem. Soc. Faraday Trans. I, 87 (1991) 597-601.
- [7] Leaist D. G., “*Simplified theory of diffusion of mixed electrolytes with simultaneous chemical reactions. Application to glycine + HCl + H₂O mixtures*”, J. Chem. Soc. Faraday Trans. I, 78 (1982) 3069-3079.
- [8] Tyrrell H. J. V., Harris K. R., “*Diffusion in Liquids*”, 2nd ed., Butterworths, London, (1984).
- [9] Spiro M., Grandoso D. M., Price, W. E., “*Protonation constant of caffeine in aqueous solution*”, J. Chem. Soc. Faraday Trans. I, 85 (1989) 4259-4267.
- [10] Nishijo J., Yonetani I., “*The Interaction of Theophylline with Benzylamine in Aqueous Solution*”, Chem. Pharm. Bull., 30 (1982) 4507-4511.
- [11] Nishijo J., Yonetani I., Tagahara, K., Suzuta, Y., Iwamoto, E., “*Influence of temperature and ionization on self association of theophylline in aqueous solution. Studies by ¹H-NMR*”, Chem. Pharm. Bull., 34 (11) (1986) 4451-4456.

- [12] Lobo V. M. M., Ribeiro A. C. F., Veríssimo L. M. P., “*Diffusion coefficients in aqueous solutions of potassium chloride at high and low concentrations*”, *J. Mol. Liq.*, 78 (1998) 139-149.
- [13] Lobo V. M. M., “*Handbook of Electrolyte Solutions*”. Elsevier, Amsterdam, (1990).
- [14] Falk M., Gil M., Iza N., “*Self-association of caffeine in aqueous solution: an FT-IR study*”, *Can. J. Chem.*, 68 (1990) 1293–1299.
- [15] Santos C. I. A. V., Lobo V. M. M., Estesó M. A., Ribeiro, A. C. F., “*Effect of Potassium Chloride on Diffusion of Theophylline at $T = 298.15\text{ K}$* ”, *J. Chem. Thermodynamics*, 43 (2011) 873-875.
- [16] Tu A. T., Reinosá J. A., “*The Interaction of Silver Ion with Guanosine, Guanosine Monophosphate, and Related Compounds. Determination of Possible Sites of Complexing*”, *Biochemistry*, 5 (1966) 3375-3383.
- [17] Matsui Y., Ono M., Tokunaga S., “*NMR Spectroscopy of Cyclodextrin–Inorganic Anion Systems*”, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 70 (1997) 535-541.
- [18] Sanemasa I., Fujiki M., Deguchi T., “*A new method for determining cyclodextrin complex formation constants with electrolytes in aqueous medium*”, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 61 (1998) 2663-2665.
- [19] Kano K., Tanaka N., Minamizono H., Kawakita Y., “*Tetraarylporphyrins as Probes for Studying Mechanism of Inclusion-complex Formation of Cyclodextrins. Effect of Microscopic Environment on Inclusion of Ionic Guests*”, *Chem. Lett.*, 25 (11) (1996) 925-926.
- [20] Ribeiro A. C. F., Santos C.I. A. V., Lobo V. M. M., Estesó M. A., “*Quaternary Diffusion Coefficients of beta-Cyclodextrin plus KCl plus Caffeine + Water at 298.15 K Using a Taylor Dispersion Method*”, *J. Chem. Eng. Data*, 55 (2010) 2610–2612.

Capítulo 9

Conclusiones generales

En este trabajo de Tesis Doctoral se estudiaron sistemas de liberación controlada de fármacos, en un modelo ciclodextrina-fármaco en disolución acuosa, desde la perspectiva de analizar algunas de sus propiedades físico-químicas y, en concreto, propiedades termodinámicas y de transporte. El efecto de factores biológicos, tales como la temperatura fisiológica y la presencia de iones constituyentes de los fluidos fisiológicos, fueron también estudiados a fin de comprender de qué manera estos sistemas pueden verse influenciados cuando se encuentran dentro de un entorno similar al del cuerpo humano. De esta manera, en este trabajo de Tesis Doctoral se ha pretendido obtener información a nivel de las interacciones moleculares que tienen lugar, con la intención de que los resultados hallados puedan contribuir a un conocimiento, mayor y más claro, de los factores involucrados en las interacciones que se producen entre ciclodextrinas y fármacos, así como sobre cuál es la manera en que éstas se ven afectadas por factores fisiológicos tales como temperatura y presencia de iones relevantes en estos medios, así como de que puedan tener aplicación en la investigación farmacéutica.

Para tal fin, se utilizaron sistemas que involucran a dos tipos de moléculas de ciclodextrina, la β -ciclodextrina y su derivado hidrofílico, e la hidroxipropil- β -ciclodextrina; y dos fármacos de solubilidad limitada, la cafeína y la teofilina, en virtud de sus propiedades farmacológicas como estimulantes del sistema nervioso central, así como por sus aplicaciones como antiasmáticos.

La utilización de dos tipos de ciclodextrinas con características fisicoquímicas diferentes permitió estimar, de una parte, el efecto de los grupos sustituyentes y, de otra, la influencia que pudiese tener la solubilidad de la ciclodextrina en la interacción con el fármaco. La

introducción de las variables temperatura y presencia de iones, permitió analizar su efecto sobre la estabilidad de estos sistemas bajo condiciones que se acercan al entorno fisiológico.

El estudio de estos sistemas se realizó a través de la determinación y posterior análisis de las propiedades termodinámicas: densidad y volumen molar parcial aparente; y de las de transporte: viscosidad y difusión mutua. En los estudios de difusión, se determinaron los coeficientes de difusión en las disoluciones acuosas binarias de los fármacos y de las ciclodextrinas, de forma individual. Posteriormente, se determinaron y analizaron los coeficientes de difusión en disoluciones acuosas ternarias de fármacos con ciclodextrinas y, finalmente, se repitió dicho análisis en disoluciones acuosas cuaternarias de fármacos, ciclodextrinas e iones. El rango de concentraciones analizado estuvo comprendido entre $0,0005$ y $0,01 \text{ mol kg}^{-1}$, en un intento de buscar la coincidencia, dentro de lo posible, de los sistemas estudiados con las dosis terapéuticas. Las medidas se llevaron a cabo a las temperaturas de $(298,15 \pm 0,01) \text{ K}$ y $(310,15 \pm 0,01) \text{ K}$.

Como resultado de estos estudios se alcanzaron las siguientes conclusiones:

- Metilxantinas en disolución acuosa

El estudio de las propiedades de las disoluciones acuosas binarias de fármacos, cafeína y teofilina, permitió comprobar que, en medio acuoso, ambas xantinas presentan un comportamiento semejante en cuanto a las propiedades aquí estudiadas, tal como cabría esperar dadas las similitudes de estructura que ambas moléculas tienen (difieren en la presencia, en el caso de la cafeína, de un grupo metilo en el carbono 7 del anillo de purina).

A ambas temperaturas se encontró que la teofilina exhibe un valor del volumen molar parcial a concentración infinitesimal, inferior al de la cafeína, acorde con su diferente estructura.

Del análisis de los coeficientes de la ecuación de Jones-Dole para la viscosidad de disoluciones de electrolitos se dedujo, por una parte, a partir del valor encontrado para el coeficiente A , que aunque la constante de asociación de la cafeína posee un valor mayor que la correspondiente a la teofilina, las interacciones asociativas que tienen lugar entre las moléculas de ésta última son más fuertes.

Se encontró un valor positivo para el coeficiente B de viscosidad, para ambos solutos, si bien ligeramente inferior para la teofilina, y muy similar a ambas temperaturas. El hecho de

que su variación con la temperatura, igual en ambos casos, $dB/dT = 0,06$, fuese también positivo, además de que el cociente entre el valor del coeficiente B de la ecuación de Jones-Dole y el volumen molar parcial, resultara con valores iguales para ambos solutos, llevó a considerar que ambos compuestos poseen un carácter *structure making* (promotor de estructura) *anómalo* en disolución acuosa, aunque la capacidad para potenciar una mayor estructura del agua es ligeramente mayor en el caso de la cafeína.

Respecto a la difusión de estas especies en disolución acuosa, se confirmó que los coeficientes de difusión siguen la tendencia observada en las anteriores propiedades fisicoquímicas analizadas. Es decir, la cafeína es la que presenta un coeficiente de difusión menor, lo que es consistente, por una parte, con su mayor masa molecular y con un mayor radio hidrodinámico y, por otra parte, con su mayor tendencia a la auto-asociación y, por lo tanto, para tener una menor movilidad.

- Ciclodextrinas en disolución acuosa

El estudio y posterior análisis de las propiedades seleccionadas, en disoluciones acuosas de β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina, permitió verificar que estas dos ciclodextrinas presentan un comportamiento diferente cuando se encuentran en medio acuoso. A ambas temperaturas se comprobó que las disoluciones de HP- β -CD son más densas que las equivalentes de β -CD, presentando la primera de ellas, no obstante, un volumen molar parcial a concentración infinitesimal mucho más elevado. Este hecho, unido al signo positivo encontrado para la pendiente de la representación de ϕ_V con la concentración de HP- β -CD, sugiere que este soluto interacciona fuertemente con las moléculas de agua, incorporando un número relativamente importante de éstas a su esfera de hidratación.

En cuanto a las viscosidades, se comprobó que ambos compuestos presentan valores positivos y elevados del coeficiente B , tal como se esperaría para compuestos de elevado peso molecular. Esta circunstancia se relacionó con un carácter formador ("*structure making*") de la estructura del agua. El hecho de que los valores de B encontrados para la HP- β -CD fuesen superiores a los de β -CD, unido a la observación del cociente $B/\sqrt{V_2^0}$, reveló que la primera posee una mayor capacidad de interacción con el disolvente, apoyando la idea de una mayor hidratación de esta ciclodextrina sustituida.

No obstante lo anterior, el análisis de la variación dB/dT , arrojó valores positivos de este

parámetro, en especial para la HP- β -CD, resultado que se identifica, habitualmente, con compuestos rompedores (“*structure breaking*”) de la estructura del agua, lo que está en oposición al resultado obtenido a partir del análisis del coeficiente *B*. Tal contradicción puede ser debida, principalmente, a que las teorías sobre el carácter formador o rompedor de la estructura del disolvente son aplicables a los electrólitos y las ciclodextrinas no lo son.

Respecto a la difusión de estas especies en disolución acuosa se verificó que los coeficientes de difusión siguen la tendencia ya observada en las otras propiedades estudiadas. Es decir, la HP- β -CD es la que presenta un coeficiente de difusión más bajo, lo que es consistente, por una parte, con una mayor masa molecular y un mayor radio hidrodinámico y, por otra parte, con el hecho de que sus disoluciones son más viscosas, por lo que presentan una mayor resistencia al movimiento.

En cuanto al análisis de los valores encontrados para el coeficiente de difusión de ambas ciclodextrinas, se observó que éstos son pequeños y poco influenciados por el aumento de la concentración de la disolución, independientemente de cuál sea la temperatura que se considere. Este comportamiento sugirió que el gran tamaño de las moléculas de ambas ciclodextrinas y, en consecuencia, la necesidad de encontrar “huecos” en la estructura de la disolución que posean el tamaño adecuado, condiciona, principalmente, su difusión a través de la disolución, por encima de cualquiera otra circunstancia.

Los valores estimados para los radios hidrodinámicos, de acuerdo al modelo de Stokes-Einstein y los volúmenes hidrodinámicos calculados en base a aquellos, confirmaron un tamaño de la entidad cinética HP- β -CD-agua bastante superior al de la entidad β -CD-agua, en especial a la temperatura de 310,15 K, lo que reforzó la idea de una mayor hidratación de la ciclodextrina sustituida.

- Modelo ciclodextrina- fármaco

La influencia de las ciclodextrinas sobre las propiedades fisicoquímicas de los fármacos en disolución acuosa, se estudiaron mediante técnicas volumétricas, viscosimétricas y de medida de los coeficientes de difusión, comprobándose la existencia de interacciones entre las xantinas y las ciclodextrinas.

El uso de modelos teóricos permitió ajustar los datos experimentales, cuantificar las interacciones moleculares existentes en la disolución y estimar valores de la constante de asociación, bajo la consideración de que la mezcla agua + ciclodextrina es un disolvente

mixto y de que tiene lugar la formación de especies complejas xantina-ciclodextrina del tipo 1:1, únicamente.

A partir de los volúmenes molares aparentes obtenidos, se determinaron valores de las constantes del equilibrio de asociación xantina-ciclodextrina. En el caso de la cafeína, se comprobó que en presencia de HP- β -CD las interacciones están caracterizadas por valores de una constante de estabilidad más elevada que en presencia de β -CD, pero solamente a 298,15 K. A la temperatura fisiológica, 310,15 K, no se encontraron evidencias de que ocurra esta asociación cafeína-ciclodextrina, hecho de suma importancia teniendo en cuenta las aplicaciones farmacológicas de estos solutos. Debido a su solubilidad, la HP- β -CD es la ciclodextrina de mayor aplicación a nivel farmacológico. En base a los resultados aquí obtenidos, a la temperatura del interior del cuerpo humano (310,15 K), los complejos cafeína-ciclodextrina no son estables. Así pues, el incremento de temperatura que acompaña a la entrada en el organismo, podría provocar la liberación precoz del fármaco, lejos del lugar donde se pretende que se produzca su absorción.

El estudio volumétrico de las disoluciones acuosas de teofilina en presencia de ciclodextrinas se realizó de manera paralela, comprobando igualmente que ocurren interacciones entre la teofilina y las ciclodextrinas. A través del ajuste a los modelos teóricos, de los datos experimentales obtenidos, se pudo estimar la magnitud de esas interacciones y obtener la constante de asociación, considerando la formación de complejos del tipo 1:1. De esta manera se verificó que en presencia de HP- β -CD las interacciones vienen caracterizadas por valores de una constante de estabilidad más elevada que en presencia de β -CD, a ambas temperaturas, si bien K disminuye con el incremento de la temperatura.

Las medidas de viscosidad realizadas pusieron de manifiesto el carácter formador de estructura (*structure making*) de ambas xantinas, cafeína y teofilina, en estos medios. Es decir, confirmaron la existencia de importantes interacciones xantina-ciclodextrina-agua, a ambas temperaturas. En el caso de las xantinas en presencia de HP- β -CD pueden llegar a formarse, además, complejos de no-inclusión xantina-ciclodextrina, incluso a la temperatura fisiológica.

Los datos de coeficientes de difusión mutua determinados permitieron estimar valores de las constantes de asociación de los complejos xantina-ciclodextrina, que refuerzan los que se obtuvieron a partir de las medidas de volúmenes parciales aparentes. Además, se estimó que, en el caso de la β -CD, la molécula de xantina está total o parcialmente incluida en la cavidad de la ciclodextrina y que en el caso de la HP- β -CD, podrían existir interacciones tanto dentro como fuera de la molécula de ciclodextrina. Es decir, la asociación que tiene lugar en la

disolución, especialmente entre la teofilina y la HP- β -CD, podría involucrar a más de una molécula de teofilina por cada molécula de ciclodextrina, formando complejos de no-inclusión teofilina-ciclodextrina. Asimismo fue importante observar que a la temperatura fisiológica, 310,15 K, sigue ocurriendo asociación entre los solutos, hecho éste que, hasta el momento presente, no había sido puesto de manifiesto.

Si se tiene en cuenta que los cambios de volumen encontrados para el proceso de complejación de la teofilina son razonablemente superiores a los encontrados para el de la cafeína y que, además, las constantes de estabilidad obtenidas son de un orden inferior, es razonable suponer que en disolución acuosa, el proceso de interacción de estas dos xantinas con las ciclodextrinas estudiadas, es distinto.

- Influencia de la presencia de iones sobre el modelo ciclodextrina-fármaco

Se comprobó que la introducción de iones en sistemas de liberación controlada de fármacos, en el modelo aquí estudiado, ciclodextrina-fármaco en disolución acuosa, produce efectos sobre dichos sistemas. En ese sentido se caracterizó, en primer lugar, la interacción de cada uno de los componentes individuales con los iones. Después de ello se abordó el estudio de los cambios que ocurren en la mezcla cuaternaria ciclodextrina + fármaco + KCl + disolvente.

En el caso de que estos sistemas incluyan β -CD, se concluyó que la asociación de ésta con los fármacos se ve debilitada por la posible competencia que parece establecerse entre la molécula de fármaco y los iones, por ocupar la cavidad de la ciclodextrina. Aún así, parece ser que la hidrofobicidad es un factor importante pues, incluso en una situación en la cual las constantes de asociación en disolución acuosa posean valores próximos entre sí, los datos aquí encontrados revelaron que habría mayor tendencia a que la molécula del fármaco se introdujese en la cavidad de la ciclodextrina y que la asociación con los iones se produjese bien por la parte externa de la ciclodextrina expuesta al medio, o bien que esta asociación se realizase con las moléculas de fármaco que se encontrasen libres en la disolución.

En lo que se refiere a la interacción fármaco-ión, se esperaba encontrar algún tipo de asociación de los aquí estudiados, con los iones K^+ del medio, dada la capacidad para establecer enlaces con los grupos carboxilo C=O y nitrógeno de ambas moléculas de xantina (uno menos en el caso de la cafeína). A partir de la aplicación de modelos cuantitativos a los coeficientes de difusión obtenidos en estos sistemas, se estimaron valores de la constante de

asociación de estos solutos y se comprobó como correcta la hipótesis de que tanto la cafeína como la teofilina interaccionan con los iones presentes en los fluidos fisiológicos y, en concreto, con los iones K^+ .

En cuanto a la interacción ciclodextrina-ión, teniendo en cuenta la presencia de los hidroxilos terminales, cabría esperar que pudiera existir algún tipo de interacción, a través de enlaces de hidrógeno, con el anión Cl^- , incluso que éste pudiera entrar en la cavidad de la ciclodextrina debido al microambiente de carga positiva que favorecería la inclusión de huéspedes aniónicos, tal como ha sido sugerido por algunos autores. A partir del uso del mismo modelo utilizado para los fármacos y de las medidas de difusión en condiciones de trazas de solutos, se comprobó dicha hipótesis de que el ión Cl^- se incorpora en la cavidad de la ciclodextrina, formando con ella un complejo de inclusión. Se obtuvieron los valores para las constantes de estabilidad de esta asociación y se dedujo, además, que la interacción del Cl^- con la HP- β -CD es más fuerte que con la β -CD y que esta asociación está favorecida a temperaturas más bajas.

Asimismo, se pudo comprobar, a través de la aplicación de un modelo bastante sencillo, que ambas xantinas presentan constantes de asociación con valores muy similares entre sí, con independencia de la temperatura (298,15 K y 310,15 K). Los pequeños cambios observados en los valores de estas constantes, parecen ser de origen estructural y no derivados del efecto de la temperatura. Asimismo, resultó claro que la teofilina es la que se ve más afectada por la presencia de un electrólito en el medio.

También se estimaron las variaciones ocurridas en el radio hidrodinámico de estas moléculas, inducidas por la presencia de los iones K^+ y Cl^- en la disolución y se comprobó que estas variaciones concuerdan con los valores obtenidos para las constantes de asociación de los solutos en disolución acuosa.

Para finalizar, señalar solamente que se pretendió que los resultados presentados en esta Memoria de Tesis Doctoral contribuyeran a un conocimiento, mayor y más claro, de los factores involucrados en las interacciones que se producen entre ciclodextrinas y fármacos, así como sobre cuál es la manera en que éstas se ven afectadas por factores fisiológicos tales como temperatura y presencia de iones relevantes en estos medios.

Capítulo 10

Síntese

Nas próximas páginas é apresentada uma síntese, em português, do trabalho experimental que deu lugar a esta dissertação, previamente descrito em castelhano. Neste capítulo vêm condensados todos os precedentes com especial ênfase na discussão de resultados. Neste último ponto apenas se incluem as tabelas principais, sendo todas as restantes, assim como as figuras e equações utilizadas, enumeradas e referenciadas relativamente ao texto principal. São igualmente apresentadas as conclusões mais importantes deste trabalho e reenumeradas todas as referências cuja pertinência justifica a sua introdução na presente síntese.

1. Introdução

Desde as origens da nossa civilização que o homem tenta melhorar a sua saúde ou eliminar a dor através da ingestão ou administração de determinadas substâncias. O conhecimento empírico, aliado ao desenvolvimento industrial, permitiu o desenvolvimento de diversas áreas das ciências médicas e, especificamente na área farmacêutica, de novos agentes terapêuticos, com origem natural ou sintética [1-3]. No entanto nem todas estas substâncias possuem as propriedades necessárias para serem agentes terapêuticos eficazes. Frequentemente não chegam a ultrapassar a primeira fase de ensaios clínicos, o que se deve, na opinião da maioria dos investigadores [4-5], a fracas propriedades farmacocinéticas em humanos, falta de eficiência clínica ou a elevados efeitos adversos ou ainda a fatores económicos [6-7]. Uma das formas de contornar esta situação consiste em criar alternativas às formas de administração convencionais, por exemplo através de sistemas de libertação controlada de fármacos [8-9].

Um sistema de libertação controlada (ou modificada) [10] utiliza um transportador dentro do qual está incorporada a molécula de fármaco e que vai sendo libertada a determinada velocidade, no local e momento definidos. O objetivo principal é simples: minimizar os problemas decorrentes da administração convencional, dado que a eficácia de um fármaco *in vivo* está condicionada em grande medida pelas suas características físico-químicas, em particular pela sua solubilidade nos fluidos biológicos e nas membranas celulares [11,12]. Desta forma pode conseguir-se uma diminuição dos efeitos adversos, um tempo de atividade mais prolongado, mantendo constante a concentração plasmática do fármaco e ainda a proteção contra ataques enzimáticos ou degradação por efeito do pH.

As ciclodextrinas são um dos transportadores mais utilizados neste tipo de sistemas de libertação controlada [13-19] para encapsular moléculas de fármaco de hidrosolubilidade limitada, aumentando a sua estabilidade e melhorando a biodisponibilidade.

1.1. Ciclodextrinas – Características físico-químicas e farmacológicas

As ciclodextrinas são oligossacáridos cíclicos, constituídos por um número variável de moléculas de D-(+)-glicose, unidas entre si por ligações do tipo α -(1,4). As ciclodextrinas nativas (Figura 1) são compostas de 6, 7 ou 8 unidades de glicose e denominam-se α -, β -, γ -ciclodextrinas, respetivamente [20-21].

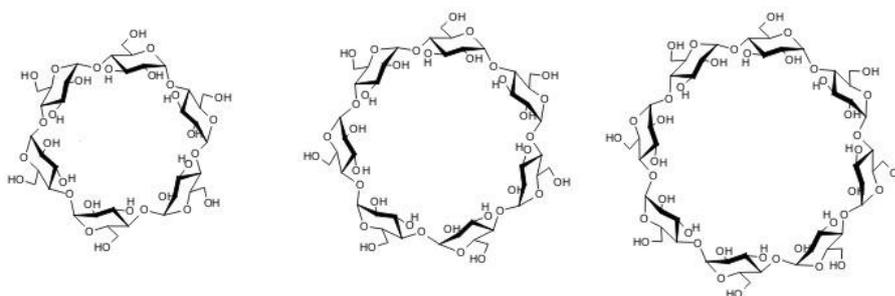


Figura 1: Estrutura química das α -, β - e γ -ciclodextrinas

A sua estrutura é em forma de cone truncado com os grupos hidroxilo primários localizados na extremidade mais estreita do cone e os grupos hidroxilo secundários localizados do lado oposto, na extremidade mais larga [22]. Esta distribuição dos grupos da molécula é, segundo Duchêne *et al.* [23,24], a razão das suas características particulares, capacitando-as de um carácter hidrófilo em solução aquosa e permitindo-lhes deter uma cavidade de natureza apolar com capacidade de albergar moléculas mais pequenas e formar complexos do tipo “*host-guest*” [24].

A formação destes complexos ocorre sem que se estabeleçam ligações covalentes entre a ciclodextrina “anfitrião” e a molécula “hóspede” e a associação está definida por uma constante de estabilidade K (Figura 2).

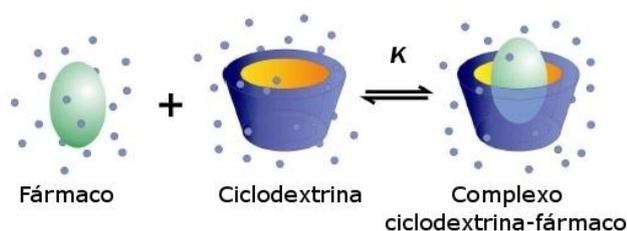


Figura 2: Formação de um complexo de inclusão 1:1 em solução aquosa

Lui *et al.* [25] denotam que as forças que conduzem à formação de um complexo de inclusão incluem a libertação de moléculas de água da cavidade da ciclodextrina (que possuem alta entalpia devido ao facto de não poderem estabelecer ligações de hidrogénio), ligações de Van der Waals, interações hidrófobas, ligações de hidrogénio, interações eletrostáticas e libertação de energia devido a ajustes estéreos e de conformação da macromolécula [25-26]. A libertação do fármaco após a sua administração habitualmente ocorre por efeito de diluição [27], substituição por competição com sais ou outros materiais do meio fisiológico envolvente, efeito de pH (fármacos ionizáveis) ou temperatura [26].

Investigações mais recentes, realizadas por Loftsson *et al.* [28-29] revelaram que, além da formação de complexos de inclusão convencionalmente aceite, as ciclodextrinas podem ainda formar agregados supramoleculares, devido à sua auto-associação, e estes agregados podem funcionar como fator adicional para o aumento de solubilidade do fármaco, quer através do estabelecimento de ligações exteriores quer através da formação de estruturas micelares.

Apesar de a forma habitual para o estudo de complexos ciclodextrina-fármaco se efetuar através de medidas de solubilidade, este trabalho apresenta um método alternativo: determinações volumétricas, viscosimétricas e de difusão realizadas para estimar qualitativa e quantitativamente a existência de interações entre estas moléculas em solução aquosa, assim como as dimensões das espécies existentes, livres e associadas, e conseqüentemente obter informação sobre o tipo de complexos que se podem formar.

1.2. Metilxantinas

Segundo Gilbert [30] as xantinas são possivelmente os agentes farmacológicos com maior utilização a um nível global. Estes compostos têm origem vegetal e estão naturalmente presentes em produtos de consumo diário, tais como o café, o chá e o chocolate. Estruturalmente, as metilxantinas cafeína, teofilina e teobromina (Figura 3) são derivados purinérgicos formados por anéis de pirimidina e imidazol condensados [31]. Atuam como psicoestimulantes, i.e., sobre o sistema nervoso central (SNS), aumentando a atividade motora e o rendimento intelectual, diminuindo a fadiga e o sono. A sua ação como fármacos é semelhante (devido a sua analogia química) e a sua especificidade está relacionada com a localização dos grupos metilo na molécula.

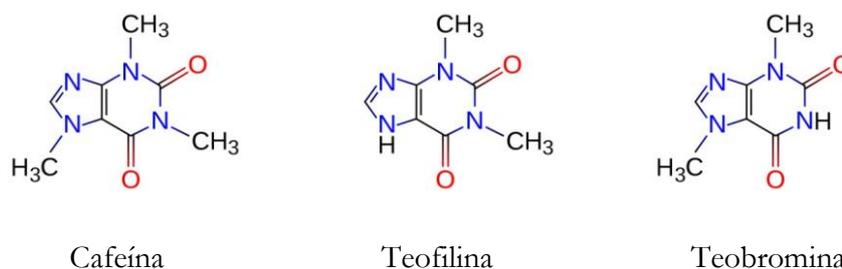


Figura 3: Estrutura química da cafeína, teofilina e teobromina

1.2.1. Cafeína- Características físico-químicas e farmacológicas

Denomina-se 1,3,7-trimetilxantina, possui fórmula molecular $C_8H_{10}N_4O_2$ e massa molecular de 194,19 g/mol. Apresenta-se em forma de pó branco, cristalino, inodoro e com sabor amargo. O seu ponto de fusão está compreendido entre 234 e 236,5 °C [32]. A cafeína é uma base fraca com pK_a de 0,78 [33], possui solubilidade em água bastante moderada, de apenas 2,17 g/100 mL (25° C) [32], no entanto a molécula possui carácter suficientemente hidrófobo para poder atravessar as membranas biológicas.

Segundo Fredholm *et al.* [34] e Moratalla [35], a ação farmacológica da cafeína caracteriza-se pelo bloqueio dos recetores de adenosina (inibidor do SNS) no cérebro [34]. Os efeitos produzidos dependem da dose. Aumenta o desempenho intelectual, a interação social e produz sensação de bem-estar, no entanto também pode desencadear ansiedade. Tal como outros estimulantes, reduz a impressão de fadiga e melhora o desempenho de atividades motoras, além de aumentar o estado de vigília. Aumenta a pressão arterial e frequência respiratória e taquicardia, produzindo diurese e estimulando a liberação de catecolaminas, especialmente adrenalina [35]. O tratamento repetido com a cafeína pode produzir tolerância ou sensibilização, dependendo do modo de administração, principalmente ao nível dos efeitos cardiovasculares [36].

O metabolismo e a farmacocinética da cafeína encontram-se descritos em variados artigos científicos e livros, entre os quais destacamos o trabalho de Arnaud *et al.* [37-41]. De acordo com este autor, a cafeína é quase completamente absorvida no trato intestinal, possui um tempo de meia-vida entre 2,5 e 4,5 horas, de modo que a ingestão repetida durante o dia aumenta gradualmente os níveis plasmáticos de cafeína, e conseqüentemente, os efeitos produzidos [40]. A cafeína distribui-se por todos os tecidos e fluidos corporais e sofre metabolismo no fígado, com formação de paraxantina, teofilina e teobromina, metabolitos, que, por sua vez, podem potenciar os seus efeitos no organismo [42]. Cada um destes metabolitos sofre ainda metabolização posterior e é excretado na urina. A cafeína é utilizada terapêuticamente em combinação com ergotamina para o tratamento da enxaqueca e em combinação com drogas anti-inflamatórias nas formulações de analgésicos. É ainda utilizada como princípio ativo para o tratamento de várias condições de dor de cabeça, problemas respiratórios em recém-nascidos, hipotensão e obesidade [43].

1.2.2. Teofilina- Características físico-químicas e farmacológicas

A teofilina, ou 1,3-dimetilxantina, tem fórmula molecular $C_7H_8N_4O_2$ e massa molecular de 180,16 g/ mol. Encontra-se na forma de pó branco cristalino com sabor amargo. O seu ponto de fusão está compreendido entre 274 e 275 °C [44]. A teofilina é um ácido fraco com pK_a de 0,94 [27] e baixa solubilidade em água, 0,55 -0,8 g/100 mL (25 ° C) [32], e tal como a cafeína é solúvel em lípidos.

A descrição das ações farmacológicas da teofilina pode ser encontrada nos trabalhos de Moratalla [35] e Peck *et al.* [45]. Estes autores atribuem-lhe a capacidade de relaxar a musculatura lisa, principalmente ao nível dos brônquios e vasos sanguíneos pulmonares e de possuir um efeito estimulador sobre a respiração. Estimula o miocárdio e o sistema nervoso central, diminui a pressão periférica e a pressão venosa e tem efeito diurético. A atividade broncodilatadora de teofilina é essencialmente devida à inibição (não específica) dos recetores de adenosina e fosfodiesterase [46].

Arnaud *et al.* [37-40], Hendeles *et al.*, [47] y Ogilvie [48] verificaram que a teofilina é bem absorvida após administração oral, mas esta absorção pode variar de acordo com a forma de administração utilizada. Geralmente, as concentrações plasmáticas máximas são atingidas no espaço de 2 horas. A dose de teofilina necessária para atingir níveis séricos terapêuticos, entre 10 e 20 mg/ mL, é fortemente afetada pelo metabolismo de modo que é necessário um controlo cuidadoso em cada paciente. O seu metabolismo e excreção assemelham-se aos da cafeína, dado que a teofilina é um de seus metabolitos. A prescrição deste fármaco, para o alívio sintomático ou prevenção da crise de asma e/ou doenças pulmonares obstrutivas, tais como bronquite crónica e enfisema [49-50], caiu em desuso. Apesar do seu baixo custo, este medicamento possui fortes efeitos adversos facto que, aliado a uma baixa eficácia e elevado nível de toxicidade fora do seu intervalo terapêutico, e ao aparecimento de medicamentos alternativos para as mesmas terapêuticas, levou ao seu conseqüente abandono como agente farmacêutico [51-52]. No entanto, de acordo com Barnes *et al.* [53-54] este poderá ser ainda um fármaco com elevado potencial.

1.3. Importância do desenvolvimento de sistemas de libertação controlada de fármaco para sistemas que envolvem metilxantinas e ciclodextrinas

Com base nas características farmacológicas das metilxantinas apresentadas anteriormente é compreensível que estes fármacos sejam bons modelos para desenvolver sistemas de libertação controlada de fármaco, em modelo de complexo fármaco / CD:

a) Aplicabilidade limitada por limites de solubilidade: tanto a cafeína como a teofilina são compostos cuja solubilidade em água é limitada e esse facto condiciona a sua distribuição pelos diferentes fluidos corporais.

b) Elevados efeitos adversos: para concentrações acima do seu intervalo terapêutico as metilxantinas possuem efeitos adversos, especialmente importantes no caso de teofilina. A utilização deste composto é fortemente condicionada pelo seu pequeno intervalo terapêutico exigindo que a dose e a forma de administração sejam rigorosamente controladas, normalmente através de um aumento consecutivo até que se alcancem concentrações eficazes.

A alternativa à terapia convencional é a inclusão destes fármacos num sistema de libertação controlada para permitir um controlo mais fácil das formas de libertação e absorção e das concentrações plasmáticas assim como ultrapassar limitações de solubilidade.

2. Conceitos matemáticos

2.1. Volume molar

Num processo de solvatação, a entrada de uma molécula de soluto num solvente implica a quebra de ligações intermoleculares neste. Após a abertura da cavidade no solvente capaz de receber a molécula de soluto estabelecem-se interações entre o soluto e o solvente, cuja magnitude vai depender do carácter hidrofóbico ou hidrofílico do soluto e refletir-se numa maior ou menor estrutura do meio. A caracterização destas interações em solução aquosa, a um nível molecular, pode ser feita por meio de propriedades com alta precisão, como é o caso do volume molar. Na verdade, através desta propriedade termodinâmica podem obter-se informações sobre as interações entre solutos em solução, entre um soluto e o solvente ou como se alteraram as interações de um soluto com o solvente quando se muda o solvente.

O volume molar parcial de um soluto em solução aquosa pode ser visto como o volume adicional obtido por adição de uma mole de componente i a um volume elevado da solução. A concentração infinitesimal, o volume molar parcial de um soluto, \overline{V}_2^0 , coincide com o volume molar aparente, ϕ_V^0 . Este último pode ser calculado, para uma solução de molalidade conhecida m , a partir do uso da equação

$$\phi_V = \frac{V - V_{H_2O}}{m} = \frac{M}{\rho} + \frac{1000}{m} \left(\frac{1}{\rho} - \frac{1}{\rho_{H_2O}} \right) \quad (2.1.1)$$

onde ρ e ρ_{H_2O} são, respetivamente, as densidades da solução e da água pura, à temperatura de trabalho; M é a massa molar do soluto; V é o volume (em cm^3) da solução de molalidade m e V_{H_2O} é o volume (em cm^3) da água pura.

A extrapolação dos valores de ϕ_V para concentração infinitesimal pode efetuar-se, para o caso dos eletrólitos, através da equação de Masson [55]

$$\phi_V = \phi_V^0 + S_V^0 \sqrt{c} \quad (2.1.2)$$

e para não eletrólitos, segundo Redlich [56]

$$\phi_V = \phi_V^0 + b_V c \quad (2.1.3)$$

representando, ambos S_V^0 e b_V , o declive da reta correspondente, e que pode ser relacionado com as interações entre solutos na solução.

Terekhova *et al.* [57-58] propuseram que, quando uma mistura de solutos em solução é analisada, tendo em conta a regra de Young para um modelo de ligação 1:1 entre 2 moléculas que se associam, por exemplo, entre uma molécula de ciclodextrina e uma molécula de cafeína em solução, o volume ϕ_V se exprima em termos dos volumes de todas as espécies presentes no sistema, livres e associadas, segundo

$$\phi_V = (1 - \alpha_c) \phi_{V,f} + \alpha_c \phi_{V,c} \quad (2.1.4)$$

onde α_c é a fração de moléculas associadas, $\phi_{V,f}$ e $\phi_{V,c}$ são, respetivamente, os volumes das espécies livres e totalmente associadas. A fração de cada espécie associada viria dada por (no caso da ciclodextrina)

$$\alpha_c = \frac{K m_{CD,f} m_{Farmaco,f}}{m_{CD}} \quad (2.1.5)$$

onde

$$m_{CD} = m_{CD,f} (1 + Km_{Farmaco,f}) \quad (2.1.6)$$

em que m_{CD} é a concentração estequiométrica da ciclodextrina, e $m_{CD,f}$ e $m_{Farmaco,f}$ são as concentrações da ciclodextrina e do farmaco no estado livre, respetivamente. A manipulação das equações (2.1.4) a (2.1.6) permitiria obter a expressão

$$\phi_{V,CD} = \frac{\phi_{V,f} + K\phi_{V,c}m_{Farmaco,f}}{1 + Km_{Farmaco,f}} \quad (2.1.7)$$

Assim, através da determinação do volume molar aparente dos solutos, cuja medida para cada componente da solução é realizada em presença de concentração constante do outro componente, pode obter-se a constante de associação K .

2.2. Viscosidade

A viscosidade é a propriedade física dos fluidos que caracteriza a resistência por eles oposta ao movimento devido a uma força externa. A um nível molecular a viscosidade é, na realidade, a expressão do transporte de momento cinético na direção perpendicular ao movimento global do fluido. Também através desta propriedade de transporte se pode obter uma visão geral das interações que ocorrem em solução aquosa ao nível do soluto/solvente, através do coeficiente de Jones-Dole [60].

Jones e Dole desenvolveram uma equação que permite relacionar a viscosidade relativa de uma solução de eletrólitos com a concentração

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + Ac^{1/2} + Bc + Dc^2 \quad (2.2.1)$$

onde η é a viscosidade da solução e η_0 a viscosidade do solvente, e A , B e D parâmetros dependentes da temperatura. O coeficiente A proporciona informação acerca das forças intermoleculares de longo alcance e o seu valor pode ser utilizado como indicador da ocorrência de algum tipo de associação. O coeficiente B está relacionado com as interações soluto-solvente e dá informação acerca do carácter organizador e desorganizador da estrutura do solvente. O coeficiente D é importante unicamente para concentrações elevadas do eletrólito e não foi considerado para esta análise.

Para soluções de não eletrólitos, a análise da influência da concentração sobre a viscosidade pode realizar-se tendo como base a equação de Einstein [61],

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + 2,5\phi + a\phi^2 \quad (2.2.2)$$

onde η_0 e η são as viscosidades do solvente puro e da solução, respetivamente, ϕ é o volume total das partículas presentes em 1 cm³ da solução e o coeficiente a é um parâmetro que quantifica as interações de segunda ordem que ocorrem no meio. O valor 2,5 presente nesta equação corresponde ao caso específico em que as partículas de soluto são consideradas esféricas. Reajustando esta equação, uma vez que para moléculas de elevado tamanho o segundo termo à direita da equação (2.2.2) é equivalente ao produto de um coeficiente numérico pelo volume molar do soluto (solvatado) e pela concentração molar da solução [62], vem

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + Bc + Dc^2 \quad (2.2.3)$$

onde B e D são constantes que dependem tanto da natureza do soluto como do solvente, assim como da temperatura e pressão. O coeficiente B pode ser assumido como sendo equivalente ao encontrado na equação Jones-Dole para a viscosidade dos eletrólitos, de modo que refletirá igualmente os efeitos das interações soluto-solvente na solução. Desta maneira pode ser usado como um critério para a medida da capacidade de aumentar (*structure-making*) ou diminuir (*structure-breaking*) a estrutura do solvente. O sinal e a magnitude do coeficiente D , por sua vez, podem ser associados com as interações soluto-soluto que ocorrem no meio.

2.3. Difusão isotérmica

Ocorre difusão quando numa solução existe um gradiente de concentração e, na ausência de correntes de convecção, se produz um fluxo espontâneo de matéria no sentido de reduzir essa diferença de concentração, o que pode ser interpretado como o resultado de movimentos permanentes das partículas existentes em solução conhecidos como movimentos Brownianos [63-64]. A difusão assim descrita é um processo irreversível importante na Natureza e é observada em todos os estados físicos da matéria. A medida quantitativa da difusão pode ser avaliada através do coeficiente de difusão de cada espécie em solução, que relaciona o fluxo de matéria com o seu gradiente de concentração. A força

motriz da difusão é o gradiente de potencial químico da substância difundente que, em soluções ideais, é igual ao gradiente de concentração a temperatura constante. Normalmente a difusão isotérmica é descrita de duas formas: as leis de Fick e a termodinâmica aplicada aos processos irreversíveis.

Num sistema de multicomponentes, a primeira lei de Fick [63] para a difusão (confinada a um espaço unidimensional) diz-nos que, para um dado componente i , a quantidade de matéria J que atravessa, por unidade de tempo, a unidade de área de um plano perpendicular ao eixo de difusão x , é proporcional ao seu gradiente de concentração, e que a constante de proporcionalidade é o coeficiente de difusão, D , do sistema

$$-(J_i) = \sum_{j=1}^q D_{ij} \frac{\partial c_j}{\partial x} \quad (i = 1, 2, \dots, q) \quad (2.3.1)$$

onde c representa a concentração, $\partial c / \partial x$ o gradiente de concentração na direção de x , ij representa o efeito do fluxo do componente j no comportamento do componente i e q é o número de componentes independentes existentes no sistema. A diferenciação da concentração em relação a x é parcial, uma vez que c pode ser, também, dependente do tempo. Para que D seja positivo introduz-se o sinal negativo na expressão, pois se x aumentar no sentido do fluxo a diferencial é negativa [63].

A segunda lei de Fick estabelecida a partir da derivação da equação (2.3.1) [65], permite avaliar a variação da concentração com o tempo, t , devida à difusão

$$\left(\frac{\partial c}{\partial t} \right)_{x=const.} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D \frac{\partial c}{\partial x} \right) \quad (2.3.2)$$

onde x é considerado de acordo com o referencial escolhido anteriormente.

Para o espaço tridimensional, as leis de Fick podem ser escritas na forma [64]

$$J = -D \text{ grad } c \quad (2.3.3)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \text{div} (\text{grad } c) \quad (2.3.4)$$

A resolução da equação (2.3.4) para um processo unidimensional torna-se possível desde que se considere como constante o valor do coeficiente de difusão relativamente à concentração [64]. Embora esta consideração seja menos rigorosa tratando-se de sistemas reais, ela é usada no campo experimental atendendo a que a força responsável pela difusão é o gradiente de potencial químico, e assim, considera-se que a variação do coeficiente de

atividade não é significativa relativamente a diferença de concentrações responsável pela difusão [64]. Nessas condições, é legítimo considerar que obtemos coeficientes de difusão diferenciais com significado termodinâmico bem definido. A determinação experimental dos coeficientes de difusão é descrita pelas leis de Fick, expressões (2.3.1) e (2.3.2).

Num sistema com mais de dois componentes independentes, as leis de Fick são, em geral, inadequadas para descrever o processo de difusão [63-64]. O fluxo de cada um dos componentes pode ser afetado pelos gradientes de concentração de todos os outros componentes, e esta interação pode ocorrer quer os componentes sejam iónicos ou moleculares. Reduzindo a difusão a um processo unidimensional, o fluxo do componente i é dado pela equação (2.2.1).

A introdução da restrição adicional

$$\sum_{j=1}^q \nabla_i J_j = 0 \quad (2.3.5)$$

onde ∇_i é o volume parcial molar do componente i , permite-nos a eliminação de um dos fluxos, dado que se interrelaciona com os outros através dessa última expressão.

Para um sistema ternário (i.e., $q = 3$) [64] e para um referencial a volume constante representado por v , as equações de difusão mútua dos solutos 1 e 2 podem ser descritas através das equações (2.3.6) e (2.3.7)

$$-(J_1) = (D_{11})_v \frac{\partial c_1}{\partial x} + (D_{12})_v \frac{\partial c_2}{\partial x} \quad (2.3.6)$$

$$-(J_2) = (D_{21})_v \frac{\partial c_1}{\partial x} + (D_{22})_v \frac{\partial c_2}{\partial x} \quad (2.3.7)$$

onde J_i representa o fluxo do componente i na direção de x e $\partial c / \partial x$ o gradiente de concentração do componente i na mesma direção. Os coeficientes de difusão principais D_{11} e D_{22} , representam os fluxos dos solutos 1 e 2, respetivamente, produzidos pelo seu próprio gradiente de concentração. Os coeficientes secundários D_{12} e D_{21} representam respetivamente os fluxos 1 e 2, produzidos, no entanto, pelo gradiente de concentração do outro componente [63-67]. Em soluções diluídas que envolvem solutos que não interagem, os valores de D_{12} e D_{21} podem ser negligenciáveis dentro dos limites de imprecisão do método, e, como tal, considerados nulos. Não sendo nulos, um valor positivo para estes coeficientes, representado genericamente por D_{ik} ($i \neq k$), indica transporte do soluto i desde regiões de mais alta concentração do soluto k para regiões de mais baixa concentração do

mesmo soluto. Um valor negativo para D_{ik} ($i \neq k$) indica transporte do soluto i desde regiões de mais baixa concentração do soluto k para regiões de mais alta concentração do mesmo soluto.

A difusão num sistema quaternário em solução aquosa [68-70] (i.e., $q = 4$) vem descrita pelas equações de difusão

$$-J_1 = {}^{123}(D_{11})_v \frac{\partial c_1}{\partial x} + {}^{123}(D_{12})_v \frac{\partial c_2}{\partial x} + {}^{123}(D_{13})_v \frac{\partial c_3}{\partial x} \quad (2.3.8)$$

$$-J_2 = {}^{123}(D_{21})_v \frac{\partial c_1}{\partial x} + {}^{123}(D_{22})_v \frac{\partial c_2}{\partial x} + {}^{123}(D_{23})_v \frac{\partial c_3}{\partial x} \quad (2.3.9)$$

$$-J_3 = {}^{123}(D_{31})_v \frac{\partial c_1}{\partial x} + {}^{123}(D_{32})_v \frac{\partial c_2}{\partial x} + {}^{123}(D_{33})_v \frac{\partial c_3}{\partial x} \quad (2.3.10)$$

A interpretação destes coeficientes de difusão principais e secundários segue a mesma ordem de ideias descritas para o caso de um sistema ternário.

Nos processos de difusão envolvendo vários solutos é interessante obter informação sobre as interações intermoleculares que ocorrem em solução. Alguns autores desenvolveram modelos no sentido de quantificar essas interações moleculares mediante a estimativa de uma constante de associação.

Paduano *et al.* [71-74] desenvolveram um desses modelos, considerando o caso particular de 2 solutos em equilíbrio químico, $1 + 2 \xrightleftharpoons{K_c} 3$ onde a espécie 1 é uma ciclodextrina (1), a espécie 2 é uma molécula hóspede (2) e a espécie 3 o possível complexo, e definiram as equações de difusão em termos das espécies presentes

$$-(J_1^*) = (D_{11}^*)_v \frac{\partial c_1^*}{\partial x} + (D_{12}^*)_v \frac{\partial c_2^*}{\partial x} + (D_{13}^*)_v \frac{\partial c_3^*}{\partial x} \quad (2.3.11)$$

$$-(J_2^*) = (D_{12}^*)_v \frac{\partial c_1^*}{\partial x} + (D_{22}^*)_v \frac{\partial c_2^*}{\partial x} + (D_{23}^*)_v \frac{\partial c_3^*}{\partial x} \quad (2.3.12)$$

$$-(J_3^*) = (D_{31}^*)_v \frac{\partial c_1^*}{\partial x} + (D_{32}^*)_v \frac{\partial c_2^*}{\partial x} + (D_{33}^*)_v \frac{\partial c_3^*}{\partial x} \quad (2.3.14)$$

onde os termos secundários D_{ij}^* dão as interações entre solutos produzidas unicamente devido ao processo de difusão. Em termos das espécies constituintes podemos considerar as seguintes relações

$$J_1 = J_1^* + J_3^* \quad \text{e} \quad J_2 = J_2^* + J_3^* \quad (2.3.15)$$

$$c_1 = c_1^* + c_3^* \quad \text{e} \quad c_2 = c_2^* + c_3^* \quad (2.3.16)$$

e a constante de associação, em molaridade

$$K_c = \frac{c_3^*}{c_1^* c_2^*} \quad (2.3.17)$$

Desprezando todos os termos secundários nas equações (2.3.11) a (2.3.14) e rearranjando as equações, a constante de associação K_c e o coeficiente de difusão da espécie associada D_{33}^* podem obter-se por

$$D_{11} = \frac{1}{2} \left\{ (D_{11}^* + D_{33}^*) + (D_{11}^* - D_{33}^*) [1 - K_c (c_2 - c_1)] R \right\} \quad (2.3.18)$$

$$D_{12} = \frac{1}{2} \left\{ (D_{33}^* - D_{11}^*) + (D_{11}^* - D_{33}^*) [1 - K_c (c_2 - c_1)] R \right\} \quad (2.3.19)$$

$$D_{21} = \frac{1}{2} \left\{ (D_{33}^* - D_{22}^*) + (D_{22}^* - D_{33}^*) [1 - K_c (c_2 - c_1)] R \right\} \quad (2.3.20)$$

$$D_{22} = \frac{1}{2} \left\{ (D_{22}^* + D_{33}^*) + (D_{22}^* - D_{33}^*) [1 - K_c (c_2 - c_1)] R \right\} \quad (2.3.21)$$

onde

$$R = \left\{ [1 + K_c (c_2 - c_1)]^2 + 4K_c c_1 \right\}^{-1/2} \quad (2.3.22)$$

O modelo descrito implica que, para obter a estimativa de K_c a partir das equações (2.3.18) a (2.3.21), se considere D_{11}^* e D_{22}^* como sendo iguais aos valores dos coeficientes de difusão binários, D_1 (ciclodextrina) e D_2 (molécula hóspede) à correspondente concentração, corrigida pela viscosidade da solução. Os valores de D_{33}^* e K_c são aqueles para os quais se obtém uma maior concordância dos dados experimentais, dentro da precisão das determinações.

Leaist *et al.* [75-77] propõem um outro modelo, baseado no transporte acoplado de solutos, em condições de concentração vestigial, e que permite igualmente estimar a constante de associação K e o coeficiente de difusão da espécie associada D para o caso particular de um dos componentes em solução ser um eletrólito forte. Nesta situação, e supondo um sistema aquoso onde coexistem 2 solutos A (1) e MX (2) e que A interage com um dos iões do outro soluto em solução aquosa, p. ex. o catião M^+ , o equilíbrio viria descrito por



e existiriam 4 espécies em solução: A ; $A \cdot M^+$; M^+ e X^- . As equações de balanço de massas seriam

$$c_1 = [A] + [AM^+] \quad \text{e} \quad c_2 = [M^+] + [AM^+] \quad (2.3.24)$$

e as frações associadas de A (X_1) e de M^+ (X_2) poder-se-iam escrever como

$$X_1 = \frac{[AM^+]}{[A] + [AM^+]} \quad \text{e} \quad X_2 = \frac{[AM^+]}{[M^+] + [AM^+]} \quad (2.3.25)$$

A difusão da espécie associada AM^+ e a respetiva constante de associação podem estimar-se mediante o uso das equações (2.3.26) e (2.3.27), e dos dados experimentais obtidos através de medidas dos coeficientes de difusão ternária de concentrações vestigiais de A em solução aquosa de MX , D_{11}^0 ($c_1/c_2=0$), e medidas dos coeficientes de difusão ternária de concentrações vestigiais de MX em solução aquosa de A , D_{22}^0 ($c_1/c_2=0$).

$$D_{11}^0 \left(\frac{c_1}{c_2} = 0 \right) = X_1 D_{AM}^0 + (1 - X_1) D_A^0 \quad (2.3.26)$$

$$D_{22}^0 \left(\frac{c_1}{c_2} = 0 \right) = 2D_X \frac{X_2 D_{AM}^0 + (1 - X_2) D_{M^+}^0}{D_X + X_2 D_{AM}^0 + (1 - X_2) D_{M^+}^0} \quad (2.3.27)$$

onde D_A^0 e D_{AM}^0 representam os coeficientes de difusão infinitesimal das moléculas de A e do complexo $A \cdot M^+$, respetivamente. O valor de D_A^0 é considerado igual ao do coeficiente de difusão, a concentração infinitesimal, de A em solução aquosa. Assim, nas condições de difusão de concentrações vestigiais de soluto, $X_1 = X_2$, e a constante de associação pode ser definida como

$$K = \frac{X_1}{c_1(1 - X_1)} = \frac{X_2}{c_2(1 - X_2)} \quad (2.3.28)$$

Estão envolvidas várias considerações neste modelo para permitir a estimativa da constante de associação dos solutos. Ainda que a contribuição da viscosidade da solução seja tomada em conta no cálculo, a contribuição da constante dielétrica e as alterações na hidratação dos solutos [64] são negligenciadas. O modelo supõe ainda que, na gama de concentrações estudada o coeficiente de atividade das soluções é igual à unidade e que as mobilidades de espécies livres e associadas não se alteram com a concentração.

3. Experimental

3.1. Reagentes e soluções

Cafeína (*pro analysi*, pureza > 98,5 %), teofilina (*anidra*, pureza > 99,0 %), β -ciclodextrina (pureza 98%, com fração em massa de água de 13,1 %), 2- hidroxipropil- β -ciclodextrina (pureza 100% com fração em massa de água de 18,2 %) e cloreto de potássio (*pro analysi*, pureza >99,5 %) foram proporcionados pela Sigma-Aldrich e utilizados tal como recebidos, tendo apenas sido mantidos num exsiccador com gel de sílica. Como solvente foi utilizada água desionizada (condutividade de $5,6 \times 10^{-8} \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e fervida para eliminar gases dissolvidos. As soluções foram preparadas em balões volumétricos calibrados (no caso das medidas de densidade e viscosidade, por pesagem direta de solvente e soluto) e desarejadas no ultrasons antes de cada conjunto de medições.

3.2. Equipamentos e procedimento

A densidade das soluções foi determinada com recurso a um densímetro digital Anton Paar, modelo DMA 5000, cuja sensibilidade é de $1 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ e a reprodutibilidade de resultados de $\pm 5 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$, entre 0 e 90 °C e 0-10 bar de pressão. Para a realização da medida injetou-se 1 mL de solução problema no tubo em U do densímetro, aguardou-se até a completa estabilização térmica da amostra e registou-se o valor de densidade (mínimo de 4 leituras para cada amostra espaçadas por 1-2 minutos). Posteriormente retirou-se a amostra, lavou-se o tubo com água destilada, secou-se com o auxílio da bomba de ar e introduziu-se nova amostra, da mesma solução problema. Este procedimento foi repetido até a obtenção de 6 séries de medidas cuja variação de valores experimentais fosse na ordem de $\pm 0,000 01$ unidades, representando uma incerteza de 0,01 %.

As medidas de viscosidade foram realizadas com o auxílio de um viscosímetro do tipo Ostwald, modelo Cannon-Fenkse A-1, série 25, de Comecta S.A., que permite obter valores de viscosidade de líquidos com uma incerteza de $\pm 0,2$ %. Para a realização da medida introduziram-se 7 mL da solução problema no reservatório do viscosímetro, colocando-o em posição vertical num banho termostático durante cerca de 2 horas, até atingir a temperatura do estudo e alcançar o equilíbrio térmico. Em seguida, a solução foi elevada até ao depósito superior e deixada fluir sob a ação da gravidade, medindo-se o tempo que demorou a passar entre as 2 marcas de calibração. O processo de medida foi repetido até a obtenção, para a

mesma solução, de pelo menos 4 valores de tempos de fluxo com diferenças entre si de $\pm 0,05$ segundos. Após a medida o viscosímetro foi lavado com água destilada e posteriormente com a solução problema seguinte.

As medidas de coeficientes de difusão foram realizadas com o recurso ao método de dispersão de Taylor. Parte destas medidas foi realizada no Departamento de Química da Universidade *Federico II* de Nápoles (Itália) com o objetivo de comprovar a reprodutibilidade dos resultados. Os princípios em que se baseia este método de medição e a descrição do equipamento são apresentados de forma sucinta, uma vez que essa informação se encontra bem documentada na literatura [70,78-83].

Neste método, cada solução de fluxo, recolhida num balão volumétrico no início do circuito, é introduzida num tubo de dispersão, que se encontra enrolado circularmente de forma homogênea dentro de um termostato, através de uma bomba peristáltica (Gilson, modelo Miniplus 3) e move-se em regime de fluxo contínuo, a uma velocidade constante de $0,17 \text{ mL min}^{-1}$. No início de cada experiência, e através de uma seringa ligada a uma válvula de injeção de 6 portas (Rheodyne modelo 5020) são introduzidos $0,063 \text{ cm}^3$ de solução de concentração ligeiramente diferente da solução em fluxo (solução de injeção). A dispersão das amostras é monitorizada usando um refratômetro diferencial (Waters modelo 2410) colocado à saída do tubo de dispersão. A diferença do índice de refração é transformada num sinal de tensão que é lido pelo voltímetro digital com interface IEEE (Agilent modelo 34401A). Estas leituras são feitas em intervalos de 13 segundos. A aquisição de dados é feita no computador onde são registados o tempo e o valor do sinal do voltímetro, utilizando um programa de aquisição de dados, elaborado em BASIC (Anexo I). O tratamento de dados é feito através de um programa também elaborado em BASIC (Anexo I).

Os ensaios para as medidas dos coeficientes de difusão mútua foram realizados de acordo com o tipo de solução problema a determinar, isto é

- para o caso das medidas de coeficientes de difusão de soluções aquosas binárias (soluto + solvente) são introduzidas, alternadamente, amostras de soluções de injeção de concentração $c \pm \Delta c$, num fluxo laminar de uma solução de concentração c , sendo que por cada amostra injetada se obterá um valor de D ;

- no caso das medidas de coeficientes de difusão de soluções aquosas ternárias (soluto 1 + soluto 2 + solvente) apenas se faz variar a concentração de um dos solutos em cada uma das amostras, isto é, são introduzidas, alternadamente, injeções de concentração $c_1 \pm \Delta c_1$ e c_2 e

de concentração c_1 e $c_2 \pm \Delta c_2$, num fluxo laminar de uma solução de concentração $c_1 + c_2$; obtém-se um coeficiente de difusão para cada par de injeções realizadas;

- para o caso das medidas de coeficientes de difusão de soluções aquosas quaternárias (soluto 1 + soluto 2 + soluto 3 + solvente) novamente apenas se faz variar a concentração de 1 dos solutos em cada uma das amostras, isto é, são introduzidas em sequência de três, injeções de concentração $c_1 \pm \Delta c_1$, c_2 e c_3 ; em seguida c_1 , $c_2 \pm \Delta c_2$ e c_3 ; finalmente c_1 , c_2 e $c_3 \pm \Delta c_3$; obtém-se um coeficiente de difusão para cada conjunto de três injeções realizadas.

4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização de propriedades físico-químicas de fármacos em solução aquosa

Como indicado anteriormente, a eficácia de um fármaco esta condicionada, em grande parte, pelo valor da sua solubilidade em água, dado que esta é o solvente por excelência nos organismos vivos, e pelo correto equilíbrio entre um ambiente aquoso e lipídico, para que possam atravessar as membranas biológicas e atingir o seu local de atuação [84]. É por tanto compreensível a importância do conhecimento das propriedades físico-químicas das soluções aquosas destes compostos. Igualmente importante é a caracterização dos excipientes, tais como as ciclodextrinas, que possam ser utilizados em conjunto com os fármacos no desenvolvimento de formas de libertação modificada. Cada ciclodextrina tem a sua própria capacidade de formar complexos de inclusão com moléculas específicas, capacidade esta que depende quer de um bom ajuste da molécula hóspede à cavidade hidrofóbica, quer da existência de uma força motriz que leve à formação destes complexos. Portanto, dado que a formação do complexo ocorre em solução aquosa, as propriedades destas soluções devem ser conhecidas.

Para cada um dos sistemas sob investigação foram obtidas e analisadas a densidade, a viscosidade e os coeficientes de difusão, em solução aquosa, a diferentes concentrações, e às temperaturas de 298,15 e 310, 15 K. A partir dos dados experimentais da densidade, em solução aquosa, foram calculados os valores correspondentes ao volume molar aparente do soluto e, a partir da sua análise, determinaram-se os valores correspondentes ao volume molar parcial a concentração infinitesimal. A partir desta informação procurou-se caracterizar as interações moleculares que possam ter lugar e estimar características estruturais destas soluções.

Através dos valores experimentais da viscosidade, e em particular do seu parâmetro B de viscosidade de Jones-Dole (no caso dos eletrólitos) ou do seu equivalente (no caso dos não eletrólitos), caracterizou-se a capacidade organizadora de estrutura (*structure making*) ou desorganizadora de estrutura (*structure breaking*) do solvente que possuem estes solutos.

A partir dos coeficientes de difusão mútua foi possível estimar valores do raio e volume hidrodinâmico destes compostos em solução aquosa.

4.1.1. Sistema cafeína + água

Para a cafeína em água obtiveram-se valores de densidade (tabela 6.1 e figura 6.1 - capítulo 6) que apresentam um comportamento de crescimento monótono com o aumento da concentração da cafeína em solução e cuja variação com a temperatura ocorre na mesma magnitude. Os valores obtidos para os volumes molares aparentes, ϕ_V (tabela 6.1), foram relacionados com a concentração, a partir da equação de Masson (equação 2.1.2) a ambas as temperaturas. Verificou-se que estes decrescem com o aumento da concentração do soluto em solução aquosa, indicando a existência de interações associativas entre moléculas de cafeína, de acordo com evidências já reportadas por outros autores [85, 33]. Falk *et al.* [86] estudaram a cafeína através de medidas de FT-IR e sugerem que as ligações de hidrogénio entre os grupos C=O da cafeína e a água diminuiriam à medida que ocorre associação entre as moléculas de soluto, libertando água para o meio. Consequentemente a cafeína atuaria como um promotor de estrutura do solvente (*structure making*). A entrada da cafeína em solução aquosa e a correspondente formação da sua esfera de hidratação provocaria o estabelecimento de ligações de hidrogénio cafeína-água que gerariam uma contração do volume da solução [87-88]. Ao mesmo tempo, estas entidades de soluto hidratadas poderiam entrar nas cavidades da estrutura tipo gelo da água, por efeito de hidratação hidrofóbica [89-90] (diminuindo a energia livre total da solução). O aumento destas entidades em solução levaria a uma suavização deste efeito, como consequência da diminuição dos interstícios livres da estrutura da água [91-92]. A partir da equação de Masson foram também obtidos os valores dos volumes molares aparentes a concentração infinitesimal, e comprovado o seu bom acordo ($143,49 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ a $298,15 \text{ K}$) com dados publicados anteriormente por outros autores [85, 93]. A $310,15 \text{ K}$ observou-se um volume molar aparente a concentração infinitesimal de $148,48 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$. O aumento de ϕ_V^0 em consequência do aumento da temperatura confirma a hipótese anterior de que a cafeína tem carácter “*structure making*” em solução aquosa.

A partir do ajuste dos valores de viscosidade das soluções aquosas de cafeína (tabela 6.2, capítulo 6) à equação de Jones-Dole (equação 2.2.1), dado que a cafeína é uma base fraca, podemos obter informação adicional sobre o tipo de interações passíveis de ocorrer em solução aquosa. Foram observados valores de A pequenos e negativos a ambas as temperaturas, o que nos permite inferir a presença de interações cafeína-cafeína, especialmente a 298,15 K, tal como esperado tendo em conta a tendência deste soluto para auto-associação por "vertical-stacking" [85, 94, 86]. No caso do coeficiente B encontraram-se valores positivos o que, em conjunto com a variação da sua derivada frente a temperatura também positiva, dB/dT ($= 0,06$), vem confirmar o carácter "structure-making" anómalo deste soluto. Podemos ainda relacionar o valor de B com o volume molar parcial (i.e. volume molar aparente a concentração infinitesimal) e obter informação relativamente ao estado de solvatação de um soluto. Neste sentido, valores de B/\overline{V}_2^0 elevados (superiores a 2,5) são indicativos da formação de uma primeira camada de hidratação em redor de um soluto. Valores de B/\overline{V}_2^0 entre 0 e 2,5 correspondem habitualmente a espécies não solvatadas [95-96]. Para a cafeína os valores do quociente B/\overline{V}_2^0 são indicativos da existência de uma camada ordenada de moléculas de solvente em redor da molécula, o que é consistente com as observações anteriores de que este é um soluto com carácter "structure making".

Relativamente aos coeficientes de difusão para este sistema (tabela 6.4), estes foram medidos com recurso à técnica de Taylor e o seu comportamento analisado em função da temperatura e da concentração. A variação deste parâmetro com a concentração é polinomial e o seu ajuste permite obter o valor do coeficiente de difusão a concentração infinitesimal. Os valores obtidos foram $D^0 = 0,764 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, a 298,15 K, e $D^0 = 1,077 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, a 310,15 K. Estes valores foram ainda determinados por via experimental, com recurso a medidas de perfis de concentração gerados por injeção de amostras de baixa concentração ($c < 10 \text{ mM}$) em fluxos laminares de água. Experimentalmente obtiveram-se valores bastante concordantes, dentro da imprecisão que acompanha este método experimental, de $D^0 = 0,760 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, a 298,15 K, e $D^0 = 1,052 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, a 310,15 K. Relativamente à variação com a temperatura, observa-se uma diminuição mais acentuada de D com a concentração quando à temperatura fisiológica, observações concordantes com o facto de que, por um lado a cafeína é uma base fraca e portanto, em solução aquosa está fracamente protonada, e que o aumento da temperatura desloca esse equilíbrio provocando um aumento da quantidade da cafeína protonada em solução [33], contribuindo para um aumento da mobilidade das espécies e, por outro lado, de que este soluto sofre auto-associação de forma

progressiva [85] e que esta associação é mais débil a temperaturas mais elevadas.

A equação de Stokes-Einstein (equação 6.1.2, capítulo 6) permite relacionar, para uma partícula que se move num meio hidrodinâmico contínuo, o coeficiente de difusão e a viscosidade do meio com as dimensões da partícula ou seja, permite determinar o seu raio hidrodinâmico e a partir deste o seu volume hidrodinâmico. Da sua aplicação aos dados de difusão obtidos experimentalmente estimou-se um raio hidrodinâmico de r (298,15 K) = 0,321 nm e r (310,15 K) = 0,305 nm e um correspondente volume hidrodinâmico molar de 83,47 cm³·mol⁻¹, a 298,15 K e 71,61 cm³·mol⁻¹, a 310,15 K. Estes valores indicam que a maior temperatura a molécula tende a encontrar-se menos hidratada.

4.1.2. Sistema teofilina + água

Os valores de densidade obtidos para as soluções aquosas de teofilina (tabela 6.5 e figura 6.5- capítulo 6) apresentam, tal como para o caso da cafeína uma variação monótona com o aumento da concentração de teofilina em solução e sem efeito de temperatura apreciável, já que a variação com esta última é análoga. Os valores dos volumes molares aparentes calculados com recurso à equação de Masson (eq. 2.1.2) permitiram também para este soluto observar um decréscimo nos valores de ϕ_v com a concentração, ainda que os valores do volume molar parcial a concentração infinitesimal da teofilina sejam mais pequenos, especialmente a temperatura mais elevada, tal como se esperaria devido a ausência do grupo metil na posição 7, relativamente à cafeína. Tal como outras bases purínicas, a teofilina sofre igualmente auto-associação em solução aquosa e esta pode ser a razão para a diminuição nos valores de ϕ_v com a concentração. Este comportamento sugere ainda que a teofilina deve possuir carácter “*structure making*”.

Relativamente às medidas de viscosidade para estas soluções (tabela 6.6-capítulo 6) verificamos um aumento com a concentração, ainda que bastante pequeno, e uma diminuição com o aumento da temperatura à medida que aumenta a concentração de teofilina em solução. Através do ajuste dos dados experimentais à equação de Jones-Dole (eq. (2.2.1)), dado que a teofilina é um ácido fraco, obtiveram-se os valores dos parâmetros A e B . O parâmetro A apresenta valores negativos mas superiores aos encontrados para a cafeína, indicação de que ambas as bases de purina em solução aquosa possuem capacidade auto associativa distinta, isto é, as interações que têm lugar entre as moléculas de teofilina são mais fortes do que as que se produzem entre as moléculas de cafeína, especialmente a 310,15

K. Para o coeficiente B o valor é positivo, e os valores apresentados pela sua primeira derivada em relação à temperatura ($dB/dT (= 0,06)$) e pelo quociente $B/\sqrt{V_2^0}$ são iguais aos da cafeína, a ambas as temperaturas. Isto significa que o carácter da teofilina em solução aquosa é predominantemente o de um organizador da estrutura da água, tal como previsto anteriormente pela análise da variação em ϕ_v . Um valor de B para a teofilina inferior ao da cafeína é concordante com o facto de que a molécula de teofilina tem menos um grupo metil, e portanto é um composto mais polar (menos hidrofóbico) que a cafeína sendo portanto espectável que a estrutura da água se visse menos afetada pela auto-associação deste soluto [97].

No que se refere aos coeficientes de difusão (tabela 6.8 - capítulo 6), verificamos que os valores obtidos a ambas as temperaturas diminuem com o aumento da concentração de teofilina em solução e que esta diminuição é mais acentuada no caso da temperatura mais alta, tal como ocorria com a cafeína. A partir do ajuste polinomial dos dados do coeficiente de difusão face à concentração é possível obter o valor do coeficiente de difusão, a concentração infinitesimal, D^0 (tabela 6.9- capítulo 6). Os valores obtidos desta forma, $D^0 = 0,811 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, a 298,15 K e $D^0 = 1,152 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, a 310,15 K, são muito próximos aos determinados experimentalmente, $D^0 = 0,806 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, a 298,15 K e $D^0 = 1,157 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, a 310,15 K, através de injeções de soluções diluídas de teofilina num fluxo laminar de água. Aplicando a equação de Stokes-Einstein (eq. 6.2, capítulo 6) estimou-se o valor do raio hidrodinâmico da molécula às duas temperaturas do estudo, tendo-se obtido um valor de $r = 0,302 \text{ nm}$ (para 298,15 K) e $r = 0,285 \text{ nm}$ (para 310,15 K). Tal como ocorre com a cafeína, o aumento da temperatura parece conduzir à desidratação da molécula de teofilina. Os valores estimados para o volume hidrodinâmico molar foram de $71,08 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ a 298,15 K e de $57,90 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ a 310,15 K. Ambos os valores são, como esperaríamos, inferiores aos encontrados para a cafeína.

4.1.3. Sistema β -ciclodextrina + água

Os valores de densidade obtidos para as soluções aquosas de β -ciclodextrina, doravante designada apenas como β -CD por uma questão de simplicidade, (tabela 6.10- capítulo 6) têm um crescimento análogo com o aumento de concentração a ambas as temperaturas, sendo concordantes com valores publicados por outros autores a 298,15 K [98-99]. Igualmente concordantes são os valores calculados (por aplicação da equação 2.2.1) para os volumes

molares aparentes às diferentes concentrações [98, 100]. Estes últimos são positivos e elevados, ainda que não apresentem uma linearidade aparente (figura 6.10-capítulo 6) quando do ajuste frente à concentração (equação 6.6-capítulo 6), dado o reduzido intervalo de concentrações que pode ser investigado. O valor de ϕ_v tende a diminuir com o aumento da concentração de ciclodextrina em solução, evidenciando a existência de interações entre as moléculas de ciclodextrina, possivelmente formando agregados, tal como já foi sugerido por outros autores [101], através do estabelecimento de ligações de hidrogénio entre os grupos hidroxilo secundários.

Relativamente à viscosidade destas soluções, verificamos tal como esperado, um aumento do seu valor com a concentração, que se intensifica à temperatura fisiológica. Dos valores encontrados para os parâmetros B e D do ajuste dos dados experimentais obtidos (tabela 6.8 e figura 6.11- capítulo 6) observamos que a tendência deste soluto é para um carácter organizador de estrutura do solvente [102]. Isto é, D toma um valor bastante pequeno enquanto B é elevado e positivo. Além disso a relação $B/\sqrt{V_2^0}$ apresenta valores superiores a 2,5, a ambas as temperaturas, indicação da formação de uma camada de hidratação em redor da molécula de ciclodextrina em solução aquosa. No entanto a partir da primeira derivada de B relativamente à temperatura, $dB/dT = 0,10$, a indicação seria a de que este soluto teria um carácter oposto (“*structure-breaking*”) [103]. Apesar desta aparente contradição, é necessário recordar que as teorias sobre o carácter organizador ou desorganizador da estrutura do solvente estão dirigidas a eletrólitos, e este soluto é um não eletrólito. Marcus [102] e outros especialistas concordam que esta caracterização se faça baseada principalmente no sinal e magnitude de B , pelo que esta é a consideração seguida.

Os coeficientes de difusão das soluções aquosas de β -CD [98, 104], diminuem com o aumento da concentração de β -CD no meio, mas apenas cerca de 2%, possivelmente devido ao elevado tamanho deste soluto em solução e à necessidade de que a molécula encontre um “espaço” contíguo adequado [105] para poder mover-se no seio da solução. Já o efeito térmico é bastante importante pois produz um aumento significativo no valor deste parâmetro. A análise da variação dos seus valores com a concentração permitiu-nos estimar o valor do coeficiente de difusão a concentração infinitesimal, resultado de um ajuste linear (figura 6.12- capítulo 6) a 298,15 K, $D^0 = 0,326 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, coincidente com o obtido por outros autores [98] e com o valor experimental. A 310, 15 K o valor observado foi de $D^0 = 0,464 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. A partir dos valores de D pode estimar-se o raio hidrodinâmico com resultados de 0,75₂ nm a 298,15 K e de 0,74₇ nm a 310,15 K, valores muito próximos aos

reportados por Longsworth [106] para este soluto e aos de Evans *et al.* [107] para solutos similares. As variações nos raios hidrodinâmicos molares com a temperatura são inferiores a 1%, portanto esta ciclodextrina não deve ser afetada pelo aumento de temperatura. Os volumes hidrodinâmicos obtidos foram de $1074,3 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ a $298,15 \text{ K}$ e de $1021,9 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ a $310,15 \text{ K}$.

4.1.4. Sistema hidroxipropil- β -ciclodextrina + água

Para a hidroxipropil- β -ciclodextrina, doravante diante designada apenas como HP- β -CD por uma questão de simplicidade, as medidas de densidade das suas soluções aquosas permitiram-nos obter resultados (tabela 6.15-capítulo 6) a $298,15 \text{ K}$ e $310,15 \text{ K}$, cujo aumento é monótono, e na mesma ordem de grandeza, com o incremento da concentração da ciclodextrina em solução. Os valores dos volumes molares aparentes calculados a partir das medidas de densidade (Figura 6.14) são consideravelmente superiores aos da β -CD, possivelmente consequência da substituição dos grupos hidroxilo por grupos hidroxipropilo mais volumosos, e cuja tendência é de aumentar com a concentração da solução. Aplicando a equação proposta por Redlich (eq. 2.1.3) [56] obtiveram-se valores para o volume molar aparente a concentração infinitesimal de $861 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ a $298,15 \text{ K}$ e $880,76 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ a $310,15 \text{ K}$.

Relativamente às viscosidades das soluções de HP- β -CD (tabela 6.16- capítulo 6), verificou-se um comportamento análogo ao da β -CD em solução, aumentando a viscosidade com o aumento de concentração da ciclodextrina em solução, principalmente à temperatura de $310,15 \text{ K}$. Os valores obtidos foram analisados (figura 6.15- capítulo 6) com recurso à equação de Einstein (eq. (2.2.3)), tendo-se alcançado valores praticamente desprezáveis para o coeficiente D (tabela 6.17- capítulo 6), enquanto para B os valores são grandes e positivos, e superiores a 2,5, a ambas temperaturas, evidenciando que o soluto se encontra solvatado em solução e portanto possui capacidade “*structure-making*”. No entanto, tal como para a β -CD, a variação de B com a temperatura, dB/dT , apresenta um valor positivo o que, de acordo com Nightingale [99], indica carácter desorganizador da estrutura do solvente, o que estaria apoiado pela variação positiva do volume molar aparente ϕ_v , com o aumento da concentração observada anteriormente. Se tivermos em conta que a HP- β -CD apresenta, relativamente à β -CD, grupos hidroxipropilo no seu exterior em substituição de grupos hidroxilo, aumentando a sua solubilidade e o carácter hidrofílico, somos levados a concluir que esta ciclodextrina tem maior capacidade para estabelecer uniões com as moléculas de

água circundantes, e que para tal seria necessário quebrar a estrutura do solvente.

No que se refere aos coeficientes de difusão da HP- β -CD em solução (tabela 6.18- capítulo 6) [108] verifica-se uma pequena diminuição dos valores com o aumento da concentração da ciclodextrina, principalmente a 298,15 K. O efeito de aumento da viscosidade do meio provocado por uma maior presença de soluto é compensado por uma diminuição da estrutura do solvente. Esta situação traduz-se numa diminuição de D menos pronunciada do que o esperado devido ao efeito viscoso, principalmente a temperatura mais elevada, onde a diminuição produzida na estrutura do solvente, quer por efeito térmico, quer por uma maior hidratação do soluto, compensa quase por completo o aumento de viscosidade do meio. Ajustando os valores do coeficiente de difusão com a concentração (figura 6.16 e tabela 6.19- capítulo 6) obtemos $D^0 = 0,322 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ a 298,15 K e $D^0 = 0,408 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ a 310,15 K o que está de acordo com os resultados obtidos anteriormente para a β -CD. Há que ter em conta que a HP- β -CD tem um maior peso molecular, logo uma menor mobilidade, e também que as soluções aquosas desta ciclodextrina são mais viscosas, portanto há maior resistência a que flua. Este efeito de aumento relativo de viscosidade é muito mais acentuado a 310,15 K, justificando a diminuição pronunciada no valor de D^0 encontrado. Este resultado parece indicar que há uma maior presença de moléculas de água na esfera de hidratação da HP- β -CD a esta temperatura, com o conseqüente aumento de volume desta entidade, que difundiria num meio menos estruturado (por efeito de uma maior agitação térmica molecular), mas sem dispor de “espaços livres” suficientes na estrutura de tamanho adequando ao volume da ciclodextrina substituída e hidratada. Através da aplicação da equação de Stokes-Einstein (equação 6.1.2) estimaram-se os valores dos raios hidrodinâmicos para a molécula de HP- β -CD aquosa, tendo-se encontrado valores de $r(298,15 \text{ K}) = 0,76 \text{ nm}$ e $r(310,15 \text{ K}) = 0,80 \text{ nm}$, valores superiores aos da β -CD aquosa, tal como para os volumes hidrodinâmicos molares, com valores de $1115 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ a 298,15 K e de $1317 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ a 310,15 K, e portanto confirmando que existe uma maior hidratação para estas moléculas.

4.2. Influência das ciclodextrinas nas propriedades físico-químicas das metilxantinas em solução aquosa

A complexação de fármacos com solutos macromoleculares, como é o caso das ciclodextrinas, no sentido de obter a sua eficácia terapêutica máxima, é um tema cuja investigação é vasta. No entanto, apesar de ser conhecido que as ciclodextrinas permitem

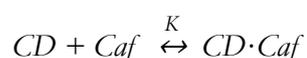
modificar as propriedades físico-químicas de um fármaco, proporcionando o aumento da sua solubilidade e biodisponibilidade, poucos estudos caracterizam de que forma acontece essa alteração. Dado que os derivados das xantinas do nosso estudo, a cafeína e a teofilina, são ambos compostos com baixa solubilidade em água e com efeitos secundários indesejáveis, que reduzem significativamente o seu potencial como agentes terapêuticos, é importante saber de que forma ocorre a modulação das suas propriedades em presença das ciclodextrinas e determinar se estes sistemas podem ter interesse como sistemas de libertação controlada de fármaco. Os dados experimentais obtidos neste capítulo têm por objetivo estudar o efeito da adição de β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina nas propriedades das soluções aquosas de cafeína e teofilina. A formação de complexos entre estes compostos foi estudada por vários investigadores, mediante diferentes técnicas experimentais [109-115], e obtidas as constantes de associação a 298,15 K (tabela 7.1- capítulo 7). No entanto, não foi possível encontrar informação na literatura científica sobre a existência de interação à temperatura fisiológica, o que se revela de fundamental importância principalmente devido às extensas aplicações farmacêuticas destes compostos.

Relativamente aos dados já publicados verificamos que, muitas vezes, as constantes de associação apresentam valores díspares, dependendo quer do método experimental quer do solvente utilizado. Por exemplo, um ensaio de solubilidade é normalmente feito com soluções saturadas de fármaco, enquanto as medidas espectroscópicas geralmente são realizadas em soluções muito diluídas, apesar de teoricamente uma constante de equilíbrio não ser afetada pelo valor da concentração. É frequentemente aceite que, em solução aquosa, as ciclodextrinas formam complexos de inclusão, nos quais as moléculas de água da cavidade são substituídas por moléculas hóspede (total ou parcialmente incluídas) com carácter hidrofóbico. No entanto, os grupos hidroxilo exteriores da molécula de ciclodextrina podem formar ligações com outras moléculas ou até mesmo com moléculas de ciclodextrina contíguas. Loftsson *et al.* [28-29] propuseram que em solução aquosa saturada podem coexistir complexos ciclodextrina-fármaco de inclusão e de não inclusão e que isto poderia explicar porque o valor da constante de equilíbrio é, as vezes, dependente da concentração e dependente do método aplicado na sua determinação. Apesar da intensa investigação neste campo, há uma área para a qual poucos estudos se direccionaram, a modulação das propriedades da molécula hóspede à temperatura fisiológica. Ainda que o espectável seja que o aumento de temperatura provoque enfraquecimento das interações entre ciclodextrina e molécula hóspede é importante conhecer se à temperatura fisiológica há formação de complexos e em que medida o ambiente circundante influencia a sua formação. Além disso,

é também importante entender se a temperatura tem o mesmo efeito sobre a associação dos fármacos com diferentes ciclodextrinas. Neste sentido é feita uma abordagem menos convencional a estes sistemas e, para analisar o tipo de interações ocorrentes em solução, são medidas propriedades termodinâmicas e de transporte e, a partir dos valores exibidos por estas, estimadas as constantes de associação e as dimensões das espécies em solução.

4.2.1. Caracterização das interações entre as ciclodextrinas e a cafeína em solução aquosa

Assumindo que entre uma molécula de ciclodextrina e uma molécula de cafeína em solução aquosa pode ocorrer associação, dando origem a um complexo 1:1, que pode ser ou não de inclusão, e que o processo de associação vem dado por



onde *CD* representa a ciclodextrina, *Caf* a cafeína e *K* a correspondente constante de equilíbrio, as variações nos valores desta última serão consequência das alterações ocorrentes no meio, devidas à associação dos solutos. Dessa forma, a análise das alterações das propriedades físico-químicas da solução, como consequência da interação entre os solutos, podem funcionar como um meio alternativo de quantificar a constante de equilíbrio.

Em misturas ternárias, ou seja, ciclodextrina + hóspede + água, o volume molar aparente, medido para cada componente pode expressar-se em termos dos volumes de todas as espécies presentes em solução, livres e associadas. Segundo o modelo de Terekhova *et al.* seria possível desta forma obter a fração de cada espécie associada e, relacionando-a com a molalidade da solução (equações 2.1.4 a 2.1.7), obter a constante de equilíbrio da referida associação.

A partir dos valores de densidade determinados para soluções aquosas de cafeína em presença de diferentes concentrações de cada uma das ciclodextrinas (tabelas 7.2 e 7.3 - capítulo 7) determinaram-se, numa primeira parte, os volumes molares parciais a concentração infinitesimal e compararam-se com o respetivo valor em água (equação 7.3 - capítulo 7), obtendo-se assim os volumes molares parciais de transferência da água para um solvente misto (Tabela 4A). A concentração infinitesimal, as interações entre as moléculas de soluto desvanecem-se e os volumes de transferência observados são unicamente resultado das interações entre as moléculas de soluto e solvente. Se considerarmos a mistura água + ciclodextrina um solvente misto, então a informação facultada pelos valores dos volumes

molares parciais de transferência será relativamente ao tipo de interação entre as moléculas de cafeína e de ciclodextrina.

Tabela 4A: Volumes molares parciais, ϕ_V^0 e volumes molares parciais de transferência, $\Delta\phi_V^0$, para soluções aquosas de cafeína em presença de ciclodextrinas, a 298,15 K e 310,15 K

$10^3 m_{\beta-CD}$ /(mol kg ⁻¹)	ϕ_V^0 /(cm ³ mol ⁻¹)	$\Delta\phi_V^0$ /(cm ³ mol ⁻¹)	$10^3 m_{HP-\beta-CD}$ /(mol kg ⁻¹)	ϕ_V^0 /(cm ³ mol ⁻¹)	$\Delta\phi_V^0$ /(cm ³ mol ⁻¹)
T = 298,15 K					
0,000000	143,5 (± 0,6)				
0,465996	150,4 (± 1,8)	6,95	0,417997	139,1 (± 2,8)	-4,40
0,931992	148,0 (± 0,8)	4,51	0,835994	142,2 (± 1,3)	-1,30
3,70056	139,5 (± 3,1)	-3,98	3,34398	145,5 (± 1,6)	2,04
7,26405	131,9 (± 1,6)	-11,60	6,68795	146,6 (± 0,8)	3,07
9,18286	118,9 (± 0,5)	-24,62	8,35994	149,7 (± 1,5)	6,21
T = 310,15 K					
0,000000	148,5 (± 0,6)				
0,465996	165,3 (± 7,1)	16,83	0,417997	158,9 (± 4,2)	10,44
0,931992	161,1 (± 6,5)	12,60	0,835994	157,4 (± 1,7)	8,92
3,70056	150,5 (± 3,2)	2,02	3,34398	152,6 (± 1,5)	4,16
7,26405	142,3 (± 2,0)	-6,18	6,68795	148,8 (± 1,4)	0,30
9,18286	136,4 (± 1,8)	-12,04	8,35994	144,0 (± 0,4)	-4,46

Nota: corresponde a tabela 7.4 no texto principal- capítulo 7; os valores entre parêntesis correspondem aos desvios padrão das medidas

Verifica-se a existência de valores de $\Delta\phi_V^0$ predominantemente positivos a baixas concentrações de ciclodextrina, e que diminuem com o aumento da concentração das ciclodextrinas, tornando-se negativos, a ambas temperaturas. A exceção ocorre para a cafeína em presença de HP- β -CD, unicamente a 298,15 K, cujos valores de $\Delta\phi_V^0$ apresentam comportamento oposto.

Devido à cavidade hidrofóbica, as moléculas de ciclodextrina oferecem à molécula de cafeína um ambiente adequado para que ocorra interação e se formem complexos de inclusão. O facto de o exterior das ciclodextrinas ser compatível com a água permite que ocorram interações por pontes de hidrogénio coesivas, evitando a auto-associação da cafeína e levando ao predomínio de interações entre os dois solutos e consequentemente a uma diminuição do volume neto. Quando aumenta a temperatura, produzem-se espaços livres no meio ordenado do solvente, resultando num melhor ajuste dos complexos estruturados, e diminui a contribuição da interação predominantemente hidrofóbica cafeína-ciclodextrina,

aumentando o volume molar parcial.

As alterações de volume que sofre um soluto quando é transferido da água para um solvente misto podem ser explicadas através do modelo de sobreposição de esferas de hidratação de Friedman e Krishnan [116], segundo o qual o efeito de sobreposição de esferas de hidratação é destrutivo. A sobreposição das esferas de hidratação de duas espécies iônicas resulta num aumento de volume, enquanto a sobreposição das esferas de hidratação de dois grupos hidrofóbicos ou de um grupo hidrofóbico e um grupo iônico contribui de forma negativa para o volume.

Uma análise do tipo de interações passíveis de ocorrer entre as moléculas de cafeína e as moléculas de ciclodextrina em solução aquosa, permite classificá-las em diferentes grupos [117]:

- 1- interações do tipo hidrofílico-iônico entre grupos OH das moléculas de ciclodextrina e centros carregados da molécula de cafeína (C=O ou N);
- 2- interações do tipo hidrofílico - hidrofílico entre grupos OH das moléculas de ciclodextrina e o grupo C=O da molécula de cafeína, mediadas através de pontes de hidrogénio;
- 3- interações do tipo hidrofílico - hidrofóbico entre grupos OH das moléculas de ciclodextrina e grupos apolares da molécula de cafeína (-CH₃);
- 4- interações do tipo hidrofóbico - hidrofóbico entre grupos das moléculas de ciclodextrina (-CH₂-) e grupos apolares da molécula de cafeína (-CH₃).

A interação do tipo 1 contribui de forma positiva para o volume, pois a sobreposição da esfera de hidratação do ião (>CO⁻ e >N⁻) e do grupo hidrofílico OH conduz a uma diminuição da tendência desorganizadora de estrutura e a uma redução da eletrostrição da água causada por estes iões. A interação do tipo 2 contribui também de forma positiva, dado que a sobreposição da esfera de hidratação de grupos OH conduz a um aumento da magnitude da interação por pontes de hidrogénio. Já a interação do tipo 3 entre grupos OH da ciclodextrina e grupos apolares da molécula de cafeína (-CH₃) conduz a uma diminuição do volume, assim como a interação do tipo 4.

Volumes tendencialmente mais negativos como os observados na tabela 4A sugerem que, em soluções ternárias, as interações do tipo hidrofílico-hidrofóbico ou entre grupos hidrofóbicos predominam sobre as do tipo hidrofílico-iônico ou entre grupos hidrofílicos. A única exceção acontece para o caso da cafeína em presença de HP-β-CD, a 298,15 K, onde

parece existir uma predominância das interações do tipo 1 e 2, já que com o aumento da concentração desta ciclodextrina em solução os volumes se tornam cada vez mais positivos.

Realmente, é assumido que a contribuição mais importante à termodinâmica do processo de complexação das ciclodextrinas [118] provém maioritariamente da penetração da parte hidrofóbica da molécula hóspede na cavidade da ciclodextrina e, em menor medida, da desidratação do composto. A ocorrência de pontes de hidrogénio, se possíveis, pode funcionar como um terceiro fator com efeito estabilizador do complexo. A libertação de moléculas de água e as alterações conformacionais posteriores à entrada da molécula hóspede podem também contribuir para a complexação.

Dado que todos estes tipos de interações influem sobre o volume molar dos compostos em solução e, dado que as alterações que derivam de estas se podem quantificar, podem obter-se os valores das constantes de associação para estes sistemas moleculares. A resolução analítica da equação 2.1.7, através do método de mínimos quadrados, permite obter ϕ_V (volume molar aparente) para cada um dos componentes, assim como o valor de K (constante de estabilidade) e de $\phi_{V,c}$, o volume molar aparente da espécie complexada (tabela 4B).

Tabela 4B: Propriedades termodinâmicas do processo de complexação das ciclodextrinas com a cafeína, a 298,15 e 310,15 K

	K /(kg·mol ⁻¹)	$\phi_{V,c\text{Caf}}$ /(cm ³ ·mol ⁻¹)	$\Delta\phi_{V,c\text{Caf}}$ /(cm ³ ·mol ⁻¹)	$\phi_{V,c\text{CD}}$ /(cm ³ ·mol ⁻¹)	$\Delta\phi_{V,c\text{CD}}$ /(cm ³ ·mol ⁻¹)
298,15 K					
β -CD	47,89	123,0 (\pm 3,1)	-19,50	668,2 (\pm 7,3)	-38,07
HP- β -CD	187,9	145,3 (\pm 0,1)	2,77	875,1 (\pm 1,8)	6,71
310,15 K					
β -CD	25,15	30,4 (\pm 2,8)	-16,40	655,5 (\pm 3,8)	-62,57
HP- β -CD	--	144,7 (\pm 0,4)	-1,98	882,3 (\pm 0,1)	0,84

Nota: corresponde a tabela 7.5 no texto principal- capítulo 7; os valores entre parêntesis correspondem aos desvios padrão das medidas

Uma inspeção detalhada da tabela 4B revela que a associação de ambas as ciclodextrinas com a cafeína se caracteriza por constantes de estabilidade cujos valores estão próximos dos seus correspondentes na literatura a 298,15 K (tabela 7.1 - capítulo 7), para estudos realizados em condições análogas, ou seja, em solução aquosa. Ainda assim, para a cafeína em presença

de HP- β -CD os resultados coincidem inclusivamente em condições distintas de pH. Tendo em conta que os fluidos biológicos têm distintos pHs em diferentes locais do organismo (por exemplo no estômago $\text{pH} \approx 2$ e no sangue $\text{pH} \approx 7,4$), é interessante assinalar que, em princípio, este fator não influencia significativamente a constante de estabilidade e, portanto, os resultados são válidos como aproximação às condições fisiológicas (esta hipótese será confirmada mais tarde). O aumento da temperatura conduz, tal como esperado, a uma diminuição da constante de estabilidade de associação cafeína-ciclodextrina. Para a HP- β -CD não se verificam alterações de volume a 310,15 K que dêem a indicação de que esteja a ocorrer associação, ou esta ocorre de forma insuficiente para permitir a sua quantificação.

Geralmente, quanto mais forte é a estabilidade do complexo menor é a variação de volume associada à sua formação (equação 7.9-capítulo 7). A molécula de cafeína sofre alterações de volume, resultantes do processo de associação, maiores em presença de β -CD que em presença de HP- β -CD. Estas alterações podem dever-se à substituição parcial dos grupos hidroxilo por grupos hidroxipropilo, em redor da cavidade dos macrociclos, alterando a sua afinidade pela molécula de cafeína e indicando que a associação cafeína-ciclodextrina não é unicamente devida a interações com o interior da cavidade, como observado anteriormente através da análise dos volumes molares parciais de transferência.

Aplicando o mesmo modelo na análise da variação do volume da cafeína no caso da formação de complexos, $\Delta\phi_{V,c}$, para o caso do sistema cafeína- β -CD, os valores podem interpretar-se tendo em conta a reorganização das moléculas de solvente quando ocorre formação de complexo, ou seja, a substituição das moléculas de água por uma molécula de cafeína gera uma variação de volume positiva [119-121]. Adicionalmente a formação do complexo é acompanhada de uma destruição parcial das esferas de hidratação dos dois solutos, seguida de reestruturação, devida predominantemente a sobreposição de grupos hidrófobos, e produzindo uma diminuição do volume [116] que pode ainda ser dilatada pela formação de pontes de hidrogénio [122]. O sinal de $\Delta\phi_{V,c}$ resulta do predomínio de uma contribuição sobre outra, neste caso, claramente hidrofóbica. Quando a cafeína se encontra em presença de HP- β -CD as alterações de volume são mais pequenas e positivas, indicando predominância de interações do tipo 1 e 2 (tipo hidrofílico). Aicart *et al.* [113] realizaram simulações de mecânica molecular dos complexos de inclusão para este sistema, através do programa Hiperchem v.5.1, e obtiveram geometrias que evidenciam que a unidade estrutural do anel de purina da cafeína permanece na entrada da cavidade da ciclodextrina, deixando expostos ao meio exterior os grupos metilo e C=O, sendo que estes últimos seriam os

responsáveis pelo estabelecimento de interações de carácter hidrofílico que resultam num aumento de volume.

A investigação no que se refere às viscosidades das soluções aquosas de cafeína em presença de ciclodextrina pode igualmente revelar que tipo de interações ocorrem em solução, maioritariamente através da análise do coeficiente B da equação de Jones-Dole (eq. 2.2.1), proporcionando informação quer a nível da solvatação dos solutos, quer a nível da sua influência sobre a estrutura do solvente em redor das moléculas do soluto. Foram feitas as determinações das viscosidades das soluções aquosas de cafeína em presença de β -CD e HP- β -CD (tabelas 7.6 e 7.7-capítulo 7) a diferentes concentrações e a 298,15 K e 310,15 K, e determinados os coeficientes B de Jones-Dole de transferência da água (tabela 7.8-capítulo 7) para diferentes soluções aquosas de ciclodextrina (equação 7.10)[123]. A tabela 4C apresenta os valores destes parâmetros.

Tabela 4C: Coeficientes A e B da equação de Jones-Dole e coeficientes de viscosidade de transferência ΔB das soluções aquosas de cafeína em presença de ciclodextrinas, a 298,15 e 310,15 K

$10^3 m_{\beta\text{-CD}}$ /(mol·dm ⁻³)	$A /$ (dm ^{3/2} ·mol ^{-1/2})	$B /$ (dm ³ ·mol ⁻¹)	$\Delta B /$ (dm ³ ·mol ⁻¹)	$10^3 m_{\text{HP-}\beta\text{-CD}}$ (mol·dm ⁻³)	$A /$ (dm ^{3/2} ·mol ^{-1/2})	$B /$ (dm ³ ·mol ⁻¹)	$\Delta B /$ (dm ³ ·mol ⁻¹)
T = 298,15 K							
0,000000	-0,004 ₂	0,310 ₃					
0,465996	0,001	0,429	0,119	0,417997			
0,931992	0,030	0,438	0,127	0,835994	0,027	0,428	0,118
3,70056	0,033	0,638	0,328	3,34398	0,062	0,499	0,188
7,26405	0,034	0,775	0,464	6,68795	0,093	0,629	0,319
9,18286	0,035	1,07 ₉	0,768	8,35994	0,151	0,741	0,431
T = 310,15 K							
0,000000	-0,003 ₇	1,03 ₈					
0,465996	0,004	0,296	-0,742	0,417997			
0,931992	-0,001	0,440	-0,598	0,835994	0,018	0,470	-0,568
3,70056	-0,003	0,507	-0,531	3,34398	0,044	0,937	-0,101
7,26405	-0,003	0,500	-0,538	6,68795	0,081	0,976	-0,062
9,18286	-0,003	0,525	-0,513	8,35994	0,085	1,19 ₁	0,153

Nota: corresponde a tabela 7.8 no texto principal- capítulo 7;

Os valores do coeficiente B da equação de Jones-Dole para a cafeína nos sistemas estudados são positivos e aumentam com o aumento de concentração de ciclodextrina em solução. Pode portanto concluir-se que há fortes interações soluto-solvente-co-solvente que são tanto mais importantes, quanto maior o teor de ciclodextrina na solução. Assumindo que o coeficiente B proporciona informação relativamente às interações que ocorrem entre as moléculas do soluto e do solvente (neste caso, um solvente misto), resultando numa maior ou menor estruturação da solução de [62], então nestas soluções a cafeína comporta-se como um electrólito promotor de estrutura, a ambas as temperaturas. Além disso, como mencionado anteriormente, quanto maior é a quantidade de ciclodextrina mais estruturadas se encontram as soluções, ou seja maior o número de ligações entre as moléculas presentes.

Os valores apresentados pelos coeficientes B de viscosidade de transferência para a cafeína, da água para o solvente misto, vêm confirmar os resultados discutidos anteriormente com base nos resultados dos volumes molares aparentes, de que a presença de moléculas de ciclodextrina em solução oferece à cafeína um ambiente adequado à formação de complexos (que podem ou não ser de inclusão), e que a interação entre estas moléculas predomina sobre a auto-associação das moléculas de cafeína. Quando aumenta a temperatura estas interações são mais fracas.

Tendo em mente que a difusão é umas das principais formas de movimento de substâncias entre as células e um dos modos essenciais de um fármaco atravessar a membrana celular, é importante conhecer de que forma esta propriedade pode ser afetada pela presença das ciclodextrinas e que efeito tem a temperatura. O interesse do estudo das propriedades de difusão de sistemas ternários que abarcam uma molécula de ciclodextrina e uma molécula hóspede (em solução aquosa) está relacionado com a possibilidade de obter, sob algumas suposições razoáveis, a constante de equilíbrio do processo de inclusão através dos quatro coeficientes de difusão experimentais. Aplicando modelos teóricos é possível estimar esta constante assim como coeficiente de difusão da espécie complexada [71-74].

As medidas dos coeficientes de difusão mútua das soluções aquosas de cafeína em presença de β -CD e de HP- β -CD [124-126] (tabelas 7.9 e 7.10- capítulo 7), efetuadas mediante o uso da técnica de dispersão de Taylor, permitiram obter os coeficientes de difusão D_{11} , D_{12} , D_{21} y D_{22} , que descrevem estes sistemas às temperaturas de 298,15 K e 310,15 K.

Os coeficientes de difusão principais, D_{11} e D_{22} , proporcionam os fluxos molares dos componentes ciclodextrina (1) e cafeína (2) provocados pelo seu próprio gradiente de

concentração. Os coeficientes de difusão secundários D_{12} e D_{21} proporcionam os fluxos molares acoplados de cada soluto induzidos pelo gradiente de concentração do outro soluto. Estes últimos devem ser zero, a concentração infinitesimal mas, para solutos que interagem como é o caso, e a concentrações finitas, os seus valores diferentes de zero podem proporcionar informação sobre a influência destes solutos macromoleculares sobre a difusão da cafeína.

Para o caso do sistema β -CD (1) + cafeína (2) (tabela 7.9-capítulo 7), os coeficientes de difusão principais apresentam valores inferiores aos seus correspondentes binários, medidos pela mesma técnica experimental (desvios inferiores a 3% ambas as temperaturas). A adição de cafeína tem pouco efeito sobre D_{11} para a β -CD, mas a adição desta última tem efeito considerável sobre o D_{22} da cafeína. A associação de moléculas de cafeína com a ciclodextrina em solução, através da eventual formação de complexos de inclusão, como evidenciado pelos resultados experimentais anteriores e pelas constantes observadas na bibliografia, resultaria numa menor mobilidade das moléculas de cafeína e conseqüentemente num decréscimo em D_{22} . O facto de este efeito ser menos acentuado em D_{11} que em D_{22} pode dever-se à semelhança entre as mobilidades da ciclodextrina livre e dos agregados β -CD-cafeína. Relativamente aos coeficientes de difusão secundários, estes podem ser utilizados para estimar o transporte acoplado de solutos, através das relações D_{21}/D_{11} e D_{12}/D_{22} , observando-se que uma mole de β -CD difundente co-transporta continuamente cerca de 0,05 moles de cafeína, e que este valor aumenta até 0,13 mol quando aumenta a temperatura, e que uma mole de cafeína difundente transporta em sentido contrário ao seu gradiente de concentração um máximo de 0,01 moles de β -CD a 298,15 K mas a 310,15 K não se observa uma tendência definida (os valores de D_{12} são pequenos e próximos ao erro experimental).

Já para o sistema HP- β -CD (1) + cafeína (2) (tabela 7.10-capítulo 7), podemos verificar uma influência distinta por efeito da presença desta ciclodextrina. A 298,15 K observa-se um decréscimo nos coeficientes de difusão principais entre 5 a 8% relativamente aos correspondentes binários. A 310,15 K, o coeficiente D_{11} para a HP- β -CD, não parece ser influenciado quer pela presença de cafeína quer pelos gradientes de concentração de qualquer das espécies. Contrariamente, os valores de D_{22} são muito inferiores ao coeficiente de difusão binário previamente medido (desvios entre 3 e 15 %) e bastante inferiores (entre 3 e 12%) que os obtidos em presença de β -CD. Para uma determinada concentração de HP- β -CD a diminuição é mais pronunciada com o aumento da cafeína. Também aqui podemos encontrar evidências de que algumas moléculas de cafeína e HP- β -CD podem existir em

solução como complexos, com ou sem inclusão, e que esta interação se produz mais profusamente que no caso da β -CD. Além disso, observando os coeficientes secundários D_{12} e D_{21} , podemos observar um aumento nos seus valores que não pode ser desprezado, dentro da precisão deste método, relativamente aos apresentados pelo sistema β -CD (1) + cafeína (2). Ambos os solutos geram fluxos acoplados do outro componente em solução e, para o intervalo de concentrações estudado, uma mole de HP- β -CD difundente transporta, a favor do seu gradiente de concentração, um máximo de 0,2 moles de cafeína, transporte esse que aumenta até aos 0,28 mol a 310,15 K. Já uma mole de cafeína difundente a 298,15 K pode transportar, em sentido contrário ao do seu gradiente de concentração, aproximadamente 0,03 moles de HP- β -CD e a 310,15 K um máximo de 0,09 moles de HP- β -CD a favor do seu gradiente de concentração.

Utilizando estes valores para quantificar as interações ocorrentes entre os solutos em solução, com suporte de modelos teóricos, obtiveram-se as constantes de equilíbrio e os coeficientes de difusão das espécies associadas (complexos) em solução aquosa que se apresentam nas tabelas 4D e 4E.

Tabela 4D: Valores de K e D_{33}^* estimados a partir dos coeficientes de difusão ternários das soluções aquosas de cafeína em presença de β -ciclodextrina, a 298,15 e 310,15 K

c_2 /(mol·dm ⁻³)	D_{11}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{22}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{33}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	K /(dm ³ ·mol ⁻¹)
T=298,15 K				
0,002		0,737		
0,005	0,317	0,724	0,305 (± 0,016)	43 (± 5,6)
0,010		0,69		
T=310,15 K				
0,002		0,999		
0,005	0,436	0,949	0,430 (± 0,018)	23 (± 2,1)
0,010		0,915		

Nota: corresponde à tabela 7.11 no texto principal- capítulo 7, os dados apresentados são os correspondentes a uma concentração constante de β -CD 10 mM

Os valores das constantes de equilíbrio obtidos pela aplicação do modelo teórico de Paduano *et al.* [71-74] são bastante próximos, quer aos encontrados na literatura para estes sistemas, quer aos anteriormente estimados através da utilização de medidas volumétricas, apesar de as considerações do modelo de difusão não contemplarem a inclusão dos termos

secundários D_{ij}^* . Este pode ser o motivo pelo qual as constantes de equilíbrio obtidas por este meio apresentam valores inferiores.

Tabela 4E: Valores de K e D_{33}^* estimados a partir dos coeficientes de difusão ternários das soluções aquosas de cafeína em presença de hidroxipropil- β -ciclodextrina, a 298,15 e 310,15 K.

c_2 /(mol·dm ⁻³)	D_{11}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{22}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{33}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	K /(dm ³ ·mol ⁻¹)
T=298,15 K				
0,002		0,735		
0,005	0,307	0,723	0,300 (± 0,013)	85 (± 8,6)
0,010		0,688		
T=310,15 K				
0,002		0,979		
0,005	0,406	0,930	0,395 (± 0,018)	20 (± 1,0)
0,010		0,896		

Nota: corresponde à tabela 7.12 no texto principal- capítulo 7; os dados apresentados são os correspondentes a uma concentração constante de HP- β -CD 10 mM

Os valores dos coeficientes de difusão da espécie associada, D_{33}^* , são muito próximos aos da molécula de ciclodextrina, D_{11}^* , para ambas as ciclodextrinas deste estudo, o que evidencia que a molécula de cafeína está total ou parcialmente incluída na cavidade da ciclodextrina, hipótese já avançada anteriormente, portanto as dimensões das espécies difundentes, ciclodextrina ou ciclodextrina-cafeína são muito semelhantes. Para o caso da HP- β -CD-cafeína a 310,15 K foi possível estimar o valor de K através das medidas de difusão, ainda que o valor de D_{33}^* apresente já algum desvio relativamente ao da ciclodextrina livre, o que poderia indicar existência de algum tipo de interações exteriores entre moléculas de ciclodextrina e cafeína e não a sua inclusão na cavidade.

4.2.2. Caracterização das interações entre as ciclodextrinas e a teofilina em solução aquosa

A interação entre a teofilina e as moléculas de ciclodextrina do nosso estudo, β -CD e HP- β -CD é um ponto sobre o qual existe bastante desacordo na literatura. Nos vários estudos disponíveis [109, 114-115, 127-128] todos os autores concordam que ocorre associação entre as moléculas de teofilina e as moléculas de β -CD, mas o valor da constante de equilíbrio que

descreve esta associação e a razão de moléculas que se associam são discordantes. Ammar *et al.* [128] propõem a formação dum complexo cuja estequiometria é do tipo 2:1; a grande maioria assume que a associação ocorre por um mecanismo 1:1. Tendo em conta a analogia de estruturas entre a cafeína e a teofilina, o tipo de interações que podem ocorrer será similar. Foi adotada para este estudo a proporção 1:1 assumida pela maioria dos autores e seguidas as linhas de análise já descritas anteriormente para o sistema ciclodextrina+ cafeína.

A análise dos volumes molares aparentes a concentração infinitesimal, ϕ_V^0 , para a teofilina em presença das duas ciclodextrinas assim como dos volumes molares parciais de transferência $\Delta\phi_V^0$, desde água para soluções aquosas de ciclodextrina apresentada na tabela 4F, revelou que os valores de $\Delta\phi_V^0$ são predominantemente negativos e diminuem ainda mais com o aumento da concentração das ciclodextrinas, a ambas as temperaturas. O efeito é mais acentuado para a teofilina em presença de HP- β -CD.

Tabla 4F: Volumes molares parciais, ϕ_V^0 , e volumes molares parciais de transferência, $\Delta\phi_V^0$, para soluções aquosas de teofilina em presença de ciclodextrinas,

a 298,15 K e 310,15 K

$10^3 m_{\beta-CD}$ /(mol kg ⁻¹)	ϕ_V^0 /(cm ³ mol ⁻¹)	$\Delta\phi_V^0$ /(cm ³ mol ⁻¹)	$10^3 m_{HP-\beta-CD}$ /(mol kg ⁻¹)	ϕ_V^0 /(cm ³ mol ⁻¹)	$\Delta\phi_V^0$ /(cm ³ mol ⁻¹)
T = 298,15 K					
0.000000	143.2 (± 0.7)				
0.439680	136.8 (± 2.4)	-6.33	0.4196690	135.6 (± 3.5)	-7.57
0.878307	130.4 (± 2.7)	-12.75	0.8393380	130.9 (± 1.5)	-12.21
3.527304	122.9 (± 2.9)	-20.25	3.357352	125.3 (± 3.0)	-17.86
7.054608	119.87 (± 1.7)	-23.40	6.714704	123.5 (± 2.9)	-19.67
8.818260	115.5 (± 1.8)	-27.62	8.393380	120.4 (± 2.3)	-22.77
T = 310,15 K					
0.000000	145.9 (± 0.9)				
0.439680	136.5 (± 2.5)	-9.48	0.4196690	131.0 (± 4.2)	-14.90
0.878307	130.6 (± 2.5)	-15.34	0.8393380	125.1 (± 1.9)	-20.84
3.527304	126.9 (± 1.6)	-17.04	3.357352	122.4 (± 2.6)	-23.52
7.054608	124.4 (± 1.4)	-21.51	6.714704	119.8 (± 2.6)	-26.10
8.818260	119.2 (± 1.8)	-26.76	8.393380	119.4 (± 2.4)	-26.55

Nota: corresponde à tabela 7.15 no texto principal- capítulo 7; os valores entre parêntesis correspondem aos desvios padrão das medidas

Considerando os tipos de interações (1-4) descritas acima para o caso da interação da cafeína com as ciclodextrinas igualmente válidos se a molécula em estudo for a teofilina, dada a sua analogia de estruturas, verificam-se variações de volume cada vez mais negativas, indicando que em misturas ternárias em presença de ciclodextrina as interações hidrofóbicas são as predominantes. As variações de volume são praticamente da mesma amplitude, pelo que a inclusão pode ter carácter não específico, ou seja, não sensível à substituição dos grupos hidroxilo pelos grupos hidroxipropilo. A quantificação das interações que ocorrem em solução, feita com recurso ao modelo anteriormente aplicado para o caso da cafeína, permitiu-nos obter os valores de K e de $\phi_{V,c}$ para estes sistemas (tabela 7.16- capítulo 7).

Tabela 4G: Propriedades termodinâmicas do processo de complexação das ciclodextrinas com a teofilina a 298,15 e 310,15 K

	K /(kg·mol ⁻¹)	$\phi_{V,cTeof}$ /(cm ³ ·mol ⁻¹)	$\Delta\phi_{V,cTeof}$ /(cm ³ ·mol ⁻¹)	$\phi_{V,cCD}$ /(cm ³ ·mol ⁻¹)	$\Delta\phi_{V,cCD}$ /(cm ³ ·mol ⁻¹)
298,15 K					
β -CD	30,53	115,6 (± 0,5)	-24,87	596,4 (± 43,1)	-109,82
HP- β -CD	78,71	121,3 (± 0,5)	-19,17	813,5 (± 18,3)	-51,22
310,15 K					
β -CD	16,56	122,9 (± 0,3)	-20,31	568,7 (± 78,2)	-149,38
HP- β -CD	48,47	119,7 (± 0,6)	-23,56	787,9 (± 66,3)	-93,64

Nota: corresponde à tabela 7.16 no texto principal- capítulo 7

A partir dos dados recolhidos na tabela 4G pode confirmar-se que ocorre associação entre as moléculas de teofilina e as moléculas de ciclodextrina em solução aquosa. Obtiveram-se valores para as constantes de associação distintos dos da literatura em condições análogas, ou seja, as medidas calorimétricas para o sistema β -CD-teofilina apontariam para uma constante de estabilidade de $K \approx 2 \text{ kg mol}^{-1}$ e para a não ocorrência de associação para o sistema HP- β -CD-teofilina. Novamente é na presença de HP- β -CD que se observam valores para as constantes de associação mais elevados, permitindo-nos corrigir a suposição anterior da existência de associação não específica. O processo de associação gera uma diminuição de volume em ambas ciclodextrina e teofilina associadas, em geral inversamente proporcional ao valor da constante de associação.

Relativamente à viscosidade, foram feitos estudos de soluções aquosas de teofilina em presença de concentração constante de ciclodextrina (tabelas 7.17 e 7.18), de maneira a avaliar as alterações ocorrentes num soluto dissolvido num solvente misto relativamente a uma solução aquosa e os resultados avaliados com recurso à equação de Jones-Dole, pelos parâmetros A e B e pelo coeficiente B de viscosidade de transferência que se indicam na tabela 4H.

Tabela 4H: Coeficientes A e B da equação de Jones-Dole e coeficientes de viscosidade B de transferência para as soluções aquosas de teofilina em presença de ciclodextrina, a 298,15 e 310,15 K

$10^3 m_{\beta\text{-CD}}$ /(mol·dm ⁻³)	$A /$ (dm ^{3/2} ·mol ^{-1/2})	$B /$ (dm ³ ·mol ⁻¹)	$\Delta B /$ (dm ³ ·mol ⁻¹)	$10^3 m_{\text{HP-}\beta\text{-CD}}$ (mol·dm ⁻³)	$A /$ (dm ^{3/2} ·mol ^{-1/2})	$B /$ (dm ³ ·mol ⁻¹)	$\Delta B /$ (dm ³ ·mol ⁻¹)
T = 298,15 K							
0,000000	-0,012	0,3094	0	0,000000			0
0,878307	-0,005	0,689	0,380	0,839338	0,003	0,535	0,226
3,527304	0,014	0,707	0,398	3,357352	0,059	0,800	0,491
7,054608	0,018	0,894	0,585	6,714704	0,087	0,862	0,553
8,818260	0,049	0,923	0,613	8,393380	0,127	0,935	0,626
T = 310,15 K							
0,000000	-0,021	1,028	0	0,000000			0
0,878307	-0,019	0,538	-0,490	0,839338	0,043	0,545	-0,483
3,527304	-0,017	0,626	-0,402	3,357352	0,054	0,942	-0,086
7,054608	-0,020	0,647	-0,382	6,714704	0,073	1,110	0,082
8,818260	-0,023	0,652	-0,376	8,393380	0,098	1,284	0,256

Nota: corresponde à tabela 7.19 no texto principal- capítulo 7

Para o caso da teofilina os efeitos observados sobre os coeficientes A e B da equação de Jones-Dole, provenientes da presença de ciclodextrina, são semelhantes aos da cafeína, o que, tal como previsto pelos valores dos volumes molares aparentes (figuras 7.4 e 7.5). Este facto indica que a interação entre estas moléculas (soluto-solvente-ciclodextrina) predomina sobre a auto-associação da teofilina, aumentando a medida que a maior quantidade de ciclodextrina é introduzida em solução, e traduzindo-se num aumento de estrutura da solução, ou seja, em maior número de ligações entre as moléculas. Quando aumenta a temperatura estas interações são mais fracas.

A análise dos dados obtidos para os coeficientes de difusão dos sistemas ciclodextrina + teofilina, D_{11} , D_{12} , D_{21} e D_{22} , a 298,15 K [129] e 310,15 K, (tabelas 7.20 e 7.21- capítulo 7) permitiu-nos quantificar a associação entre estes solutos. Estas determinações foram realizadas através do método de dispersão de Taylor instalado em dois laboratórios independentes (no Departamento de Química da Universidade de Coimbra e no Departamento de Química da Universidade de Nápoles) com o objetivo de comprovar a reprodutibilidade dos resultados.

Para o sistema β -CD (1) + teofilina (2) (tabela 7.20) verifica-se que D_{11} e D_{22} são menores que os obtidos para os correspondentes sistemas aquosos binários, D_1 e D_2 , (tabelas 6.13 e 6.8), com desvios que oscilam respetivamente entre 2 e 4% para a ciclodextrina e que podem atingir até 18% para o caso da teofilina, à temperatura mais elevada. Os coeficientes de difusão secundários são geralmente negativos e próximos de zero, dentro do erro experimental inerente a esta técnica, a baixas concentrações. Para as concentrações mais elevadas estes coeficientes atingem valores relevantes e isso permite admitir a possibilidade de que ocorra penetração da teofilina no interior da cavidade da ciclodextrina. Efetivamente, se analisarmos os coeficientes de difusão secundários D_{12} e D_{21} , podemos observar um aumento significativo nos seus valores, em presença de β -CD 10 mM, a ambas as temperaturas, e verificamos que cada mole de ciclodextrina difundente pode transportar, em sentido contrário ao seu gradiente de concentração, até 0,2 moles de teofilina, valor que diminui com o aumento de temperatura. O fluxo acoplado de ciclodextrina gerado pelo gradiente de teofilina é pequeno e capaz de transportar apenas 0,1 moles por cada mole de teofilina difundente, diminuindo igualmente com o aumento de temperatura.

Relativamente ao sistema HP- β -CD (1) + teofilina (2) (tabela 7.21), os coeficientes de difusão principais, D_{11} e D_{22} , são igualmente inferiores aos binários (tabelas 6.18 e 6.8), mas apresentam desvios até 4% para a ciclodextrina e até 25% para a teofilina, especialmente a temperatura mais alta. Quanto aos coeficientes de difusão secundários, podemos verificar um aumento significativo nos valores de D_{21} , principalmente quando em presença da ciclodextrina à concentração mais elevada, a ambas temperaturas. Isso significa que o gradiente de concentração da HP- β -CD produz co-transporte acoplado de teofilina, e nas composições utilizadas, uma mole de HP- β -CD difundente co-transporta um máximo de 0,2 moles de teofilina, e que este valor aumenta até 0,6 moles quando aumenta a temperatura. O fluxo acoplado de ciclodextrina gerado pelo gradiente de teofilina é pequeno e não ultrapassa as 0,08 moles por cada mole de teofilina difundente, diminuindo com o aumento da temperatura.

Utilizando os valores obtidos para os coeficientes de difusão destes sistemas para quantificar as interações ocorrentes entre os solutos em solução, com recurso ao mesmo modelo aplicado para o estudo com cafeína, foi possível obter as constantes de equilíbrio e os coeficientes de difusão das espécies associadas (complexos) em solução aquosa que se apresentam nas tabelas 4I e 4J.

Tabela 4I: Valores de K e D_{33}^* estimados a partir dos coeficientes de difusão ternários das soluções aquosas de teofilina em presença de β -ciclodextrina, a 298,15 e 310,15 K

c_2 /(mol·dm ⁻³)	D_{11}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{22}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{33}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	K /(dm ³ ·mol ⁻¹)
T=298,15 K				
0,002		0,770		
0,005	0,317	0,748	0,300 (± 0,012)	28,5 (± 1,4)
0,010		0,720		
T=310,15 K				
0,002		1,064		
0,005	0,436	1,003	0,395 (± 0,027)	22 (± 2,3)
0,010		0,948		

Nota: corresponde à tabela 7.22 no texto principal- capítulo 7; os dados apresentados são os correspondentes a uma concentração constante de β -CD 10 mM

Tabela 4J: Valores de K e D_{33}^* estimados a partir dos coeficientes de difusão ternários das soluções aquosas de teofilina em presença de HP- β -ciclodextrina, a 298,15 e 310,15 K

c_2 /(mol·dm ⁻³)	D_{11}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{22}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	D_{33}^* /10 ⁻⁹ (m ² ·s ⁻¹)	K /(dm ³ ·mol ⁻¹)
T=298,15 K				
0,002		0,769		
0,005	0,307	0,746	0,265 (± 0,013)	85 (± 8,6)
0,010		0,719		
T=310,15 K				
0,002		1,042		
0,005	0,406	0,982	0,385 (± 0,012)	39 (± 1,4)
0,010		0,929		

Nota: corresponde à tabela 7.23 no texto principal- capítulo 7; os dados apresentados são os correspondentes a uma concentração constante de HP- β -CD 10 mM

Os valores das constantes de equilíbrio obtidos a partir da aplicação do modelo teórico de Paduano *et al.* [71-74] estão em bom acordo com os anteriormente estimados pelas medidas volumétricas. Uma vez mais os valores de K estimados através deste método são

mais baixos que os precedentes (obtidos através de medidas volumétricas). Encontraram-se ainda discrepâncias nos resultados relativamente aos valores da literatura. Objetivamente, os valores encontrados evidenciam um efeito importante da presença da HP- β -CD sobre a teofilina em solução aquosa. Através dos valores encontrados para a espécie associada poder-se-ia conjecturar inclusivamente que a associação ocorresse numa proporção de 2 moléculas de teofilina para cada molécula de ciclodextrina, devido ao decréscimo bastante acentuado em D_{33}^* relativamente a D_{11}^* , maior do que previsto se a molécula estivesse total ou parcialmente incluída na cavidade da ciclodextrina. A associação poderia ocorrer a ambos os níveis interior e exterior da molécula de ciclodextrina e levar a que os coeficientes de difusão D_{22} e D_{33}^* apresentem valores bastante mais baixos que o expectável. Além disso, as variações de volume observadas para o processo de associação (relativamente grandes principalmente para a ciclodextrina) permitem supor que não só a cavidade estaria envolvida no processo de associação, mas também que ocorreriam interações no exterior da ciclodextrina que envolvem as partes apolares das moléculas.

4.3. Estabilidade dos complexos ciclodextrina - fármaco: Influência de iões com relevância em processos fisiológicos

A alteração das propriedades físico-químicas das moléculas de um fármaco conseguidas através da sua complexação com uma molécula de ciclodextrina pode ter um considerável potencial farmacêutico. A constante de estabilidade e a estequiometria dos complexos de inclusão, dependendo da concentração da ciclodextrina e da molécula hóspede em estudo, são índices úteis para estimar a estabilidade do complexo e as alterações nas propriedades físico-químicas do hóspede. No entanto, estes não são os únicos fatores a ter em conta ao delinear formulações e escolher de vias de administração para maximizar a eficácia. É necessário considerar o ambiente biológico em redor dos complexos *in vivo*: diluição, temperatura, pH e presença de iões que compõem os fluidos biológicos. Anteriormente analisaram-se os efeitos de concentração e temperatura sobre a constante de estabilidade dos sistemas ciclodextrina (β -CD e HP- β -CD) e metilxantinas (caféina e teofilina). Seguidamente será investigada a influência da presença de iões com importância fisiológica na estabilidade das interações ciclodextrina-fármaco. Os iões presentes nos fluidos biológicos, intra e extracelulares, podem ter efeitos significativos nas moléculas de fármaco, principalmente se puderem interagir com elas e conseqüentemente influenciar as interações com a ciclodextrina. Em geral, os sais podem influenciar os complexos das ciclodextrinas de

diversas formas [130-132]. Podem ter efeitos de *salting in* ou *salting out* que afetam a estrutura da solução e desviam os equilíbrios que possam ocorrer. Podem levar à formação de complexos ternários nos quais os íons estabilizam o complexo de inclusão ciclodextrina-fármaco, através de interações com ambas as moléculas. Finalmente, podem gerar competição com o fármaco para entrar na cavidade da ciclodextrina, se bem que esta situação é mais comum apenas para aniões de elevado tamanho. Além disso, os cátions podem interagir com moléculas de fármaco carregadas através de interações de pares iônicos, e também este efeito pode ter um papel importante no mecanismo de formação de complexos.

Este trabalho incidiu sobre os efeitos da presença do cloreto de potássio na estabilidade das interações entre uma ciclodextrina (β -CD e HP- β -CD), e uma metilxantina (cafeína e teofilina). Antes de examinar os resultados obtidos para soluções aquosas de cafeína e teofilina em presença destas ciclodextrinas e de KCl será feita uma análise com maior detalhe de cada um dos sistemas *per se*, ou seja apreciando a influência do cloreto de potássio sobre os fármacos e as ciclodextrinas, individualmente, em solução aquosa.

4.3.1. Efeito do cloreto de potássio nas propriedades da cafeína e da teofilina aquosas

Há disponíveis na literatura estudos que facultam informação sobre a interação e efeitos dos íons¹ fisiologicamente relevantes, tais como K⁺, Na⁺ e Cl⁻, sobre a cafeína e a teofilina [133-134]. Estes estudos revelam que ocorre associação entre o íon K⁺ e as posições O6 e N9 da cafeína e com as posições O6, N9 e N7 da teofilina, resultando em constantes de equilíbrio de $5,08 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ para $K_{K\text{-cafeína}}$ e $2,13 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ para $K_{K\text{-teofilina}}$. Estes resultados são especialmente importantes se tivermos em linha de conta os valores das constantes de equilíbrio relativas à associação da cafeína e da teofilina com as ciclodextrinas, dada a diferença entre as suas ordens de grandeza. Há no entanto que considerar que os estudos que levaram à obtenção destas constantes de associação, através de técnicas de FT-IR e espectroscopia de UV, foram realizados em intervalos de concentrações consideravelmente superiores (até 40 mM) às do potássio intracelular (3,5 a 5,0 mM) e na presença de outros íons, introduzidos pelo ajuste de pH, e que podem ter influência na associação.

Através de medidas dos coeficientes de difusão da cafeína e teofilina na presença de cloreto de potássio pode estimar-se a constante de associação destes solutos, tendo como

¹ No decorrer deste texto, no lugar de “íons potássio” poderíamos dizer “substâncias contendo potássio” por uma questão de coerência termodinâmica, i.e., poderíamos preferir uma linguagem fenomenológica a uma linguagem baseada em conceitos extra termodinâmicos. Contudo, esta aproximação poderia tornar o texto mais extenso e menos compreensível para alguns leitores.

suporte modelos teóricos desenvolvidos por Leaist *et al.* [75-77] que relacionam os coeficientes de difusão ternários dos solutos com os coeficientes de difusão vestigiais e as concentrações das espécies difundentes em equilíbrio.

Em relação ao sistema KCl (1) + cafeína (2) (tabela 8.1- capítulo 8), verifica-se que ambos os coeficientes de difusão principais D_{11} , para o cloreto de potássio, e D_{22} , para a cafeína, apresentam, para 298,15 e 310,15 K, valores inferiores aos correspondentes binários (tabela 8.2 –capítulo 8 e tabela 6.4 -capítulo 6), com desvios de cerca de 4-5% em magnitude. Quando em solução aquosa, as moléculas de cafeína associam-se principalmente por estabelecimento de interações hidrofóbicas, já que a ausência de grupos doadores de hidrogénio impede o estabelecimento de ligações internas. No entanto, estas ligações de hidrogénio podem ser estabelecidas entre a cafeína e o solvente (água) através dos grupos polares, grupos carbonilo das posições 2 e 6 e do azoto na posição 9. Segundo Falk *et al.* [86], se as moléculas de cafeína se encontram livres em solução, os carbonilos das posições 2 e 6 estão totalmente hidratados, mas quando ocorre associação por “*vertical stacking*” o impedimento estéreo dificulta a sua hidratação, apesar da estrutura relativamente flexível do dímero. Assim, o acesso a estas posições, quer das moléculas de água, quer dos iões potássio, vê-se condicionado. Seria expectável que a diminuição do coeficiente de difusão da cafeína com o aumento da concentração ocorresse devido à auto-associação da cafeína.

De facto, os dados obtidos demonstram que pode não ser isso o que realmente acontece. Com efeito, as alterações observadas nos coeficientes de difusão da cafeína, na gama de concentrações estudada, podem ser devidas à sua associação com os iões K^+ do meio, diminuindo a sua mobilidade, por um lado devido ao efeito estéreo, já que o tamanho da espécie associada é ligeiramente maior do que o da cafeína livre e, por outro lado, como resultado da sua densidade de carga superficial positiva, pois o gradiente de concentração de KCl gera um campo elétrico que desacelera os iões K^+ livres em solução e aqueles associados com a cafeína. Observando o comportamento do coeficiente de difusão secundário D_{21} , que representa o fluxo de cafeína gerado pelo gradiente de concentração de cloreto de potássio em solução, verificamos que apresenta valores negativos e que diferem significativamente de zero. Da relação D_{21}/D_{11} , que representa o número de moles de cafeína transportados por mole de KCl, pode verificar-se que, de facto, uma mole de KCl difundente pode transportar, em sentido oposto ao do seu gradiente de concentração, até um máximo de 0,15 moles de cafeína. A 310,15 K o efeito de aumento da temperatura desfavorece a interação entre as moléculas de cafeína, e isso reflete-se no seu coeficiente de difusão cujo aumento com a

concentração é menor, além de que o transporte acoplado de solutos também se reduz. No entanto, o facto de existirem mais moléculas de cafeína sob a forma monomérica poderia permitir uma maior interação com o meio (solvente) e, conseqüentemente, com os iões K^+ . Para comprovar esta hipótese aplicou-se o modelo desenvolvido por Leaist *et al.*, que a partir dos valores dos coeficientes de difusão vestigiais de soluto permite quantificar a associação dos solutos em solução aquosa e obter a sua constante de associação.

Para o sistema KCl (1) + cafeína (2), a 298,15 K foi obtida uma constante de estabilidade K de $26,8 M^{-1}$ e um coeficiente de difusão da espécie associada $Caf \cdot K^+$, $D_{complexo}$ a concentração infinitesimal de $0,755 \times 10^{-9} m^2 s^{-1}$. A 310,15 K a constante de estabilidade K tem um valor de $31,59 M^{-1}$ e o coeficiente de difusão da espécie associada $Caf \cdot K^+$, $D_{complexo}$ a concentração infinitesimal é $0,860 \times 10^{-9} m^2 s^{-1}$. Note-se que a 310,15 K o coeficiente de difusão das espécies associadas, a concentração infinitesimal, é 20% menor do que o correspondente à cafeína livre nas mesmas condições. Estes resultados são consideravelmente diferentes daqueles encontrados na literatura e esta diferença pode ser devida, em grande parte, às diferentes condições experimentais em que foram conduzidos os estudos. Apesar das diferenças, e tendo em conta todas as considerações envolvidas no nosso modelo, ambos os resultados indicam que existem complexos em solução e que estes têm um papel importante no comportamento de difusão do sistema.

Pode ainda estimar-se o raio hidrodinâmico da molécula de cafeína em solução aquosa de cloreto de potássio, aplicando a equação de Stokes-Einstein (equação. 6.2- capítulo 6). Os resultados obtidos foram $r(298,15 K) = 0,32_3$ nm e $r(310,15 K) = 0,31_9$ nm. Confirmamos que ocorre um ligeiro aumento no tamanho do raio hidrodinâmico de cafeína em solução aquosa de KCl a 298,15 K relativamente à água (menos de 1%), mas um aumento significativo (cerca de 5%) a 310,15 K, resultados que suportam as evidências anteriores de que a cafeína se associa com os iões presentes no meio. Relativamente aos nossos dados, demonstrou-se a existência de interações entre os iões K^+ do meio e a cafeína e que estas aumentam com o aumento de temperatura.

No caso do sistema KCl (1) + teofilina (2) [135] (tabela 8.3- capítulo 8), e comparando os resultados obtidos com os referentes aos sistemas binários respetivos, à mesma temperatura (tabela 8.2 –capítulo 8 e tabela 6.8 -capítulo 6), isto é, para o cloreto de potássio e a teofilina em solução aquosa, verifica-se que, nas composições utilizadas no presente estudo, o KCl adicionado produz pequenas alterações no coeficiente de difusão D_{22} da teofilina (menos de 1% em ambas as temperaturas), enquanto a adição de teofilina gera alterações significativas

no coeficiente de difusão, D_{11} para o KCl ($\leq 12\%$ a 298,15 K e $< 4\%$ a 310,15 K). Uma possível explicação para a ocorrência destas variações relacionar-se-ia com a associação de algumas moléculas de teofilina com o íão de potássio em solução aquosa através das posições N7 e O6 [134, 136], e estes agregados em solução apresentariam menor mobilidade sendo, portanto, responsáveis pela diminuição relativamente grande de D_{11} . Este efeito é menos pronunciado quando se considera o efeito do KCl no transporte de teofilina, possivelmente devido às semelhanças entre as mobilidades da teofilina livres e das espécies associadas. Analisando os coeficientes de difusão secundários, D_{12} e D_{21} a concentrações finitas, podemos entender a influência da presença de KCl na difusão de teofilina e vice-versa. Em geral, o gradiente de concentração de cada componente produz um fluxo acoplado do outro componente em sentido contrário. Considerando que D_{12}/D_{22} dá o número de moles de KCl transportados por mole de teofilina devido ao seu gradiente de concentração pode admitir-se que nas composições utilizadas, uma mole de teofilina transporta, em sentido contrário ao do gradiente de concentração, um máximo de 0,4 moles de KCl, aumentando o transporte com a concentração crescente de teofilina em solução. Através dos valores da relação D_{21}/D_{11} nas mesmas composições é de esperar que uma mole de KCl difundente transporte em sentido inverso ao do seu gradiente de concentração um máximo de 0,1 moles de teofilina.

Os valores observados para os coeficientes de difusão deste sistema poderiam ser previstos a partir da análise do sistema KCl (1) + cafeína (2), dado que a teofilina dispõe de menos um grupo metilo na posição N7 que a cafeína, sendo portanto mais pequena e consequentemente apresentando maior densidade de carga ao associar-se com o íão K^+ , logo o efeito do campo elétrico gerado pelo gradiente de KCl sobre as espécies associadas (e sobre o seu respetivo coeficiente de difusão) seria mais forte. O facto de a molécula de teofilina possuir menos um grupo metilo também influencia a constante de associação, dado que a posição N7 se encontra agora também disponível para interagir com o meio. De um raciocínio análogo ao acima exposto para a cafeína, podemos esperar que tal como esta, a constante de associação $Teof \cdot K^+$ se veja afetada pela auto-associação de moléculas de teofilina, mas, dado que a teofilina possui uma constante de auto-associação numericamente inferior à da cafeína, os efeitos sobre a difusão podem ser distintos.

Por manipulação das equações (8.2) e (8.3), obtiveram-se para o coeficiente de difusão das espécies associadas $D_{complexos}$ e para a constante de associação K , os valores de $0,758 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ e $27,2 \text{ M}^{-1}$ a 298,15 K, respetivamente, e $0,778 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ e $25,9 \text{ M}^{-1}$ a 310,15 K. Aplicando igualmente a equação de Stokes-Einstein (equação 6.2- capítulo 6) para avaliar os valores do raio hidrodinâmico da molécula de teofilina em solução aquosa de cloreto de

potássio, obtêm-se $r(298,15\text{ K}) = 0,30_7\text{ nm}$ e $r(310,15\text{ K}) = 0,30_4\text{ nm}$. Ocorre um ligeiro aumento no tamanho do raio hidrodinâmico de teofilina em ambas as temperaturas em cerca de 1% -2%, resultado possivelmente de associação com os iões do meio. Mais uma vez os resultados diferem dos encontrados na literatura, apesar da evidência da existência de interação entre a teofilina e iões K^+ do meio, interação esta que diminui com o aumento da temperatura.

4.3.2. Efeito do cloreto de potássio nas propriedades da β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina aquosas

É sabido que as ciclodextrinas têm capacidade para incluir na sua cavidade diversas moléculas orgânicas, mas também complexos de metais de transição e ainda alguns iões inorgânicos. [137-138]. A maioria dos autores parece concordar que a associação de ciclodextrinas com aniões (e.g. Cl^-) é mais forte que a associação com os catiões (e.g. K^+) [139], o que parece lógico se se considerar que os aniões podem formar ligações de hidrogénio $\text{Cl}^- \cdots \text{H-O}$ e que estas não ocorrem para o caso de um catião. No entanto, foi identicamente proposto que na cavidade da ciclodextrina o carbono se encontra positivamente polarizado, e que este ambiente microscopicamente positivo favorece a inclusão de hóspedes aniônicos e desfavorece a inclusão de hóspedes catiónicos [140]. Dado que se ambiciona compreender quais as consequências da presença de sais nas constantes de equilíbrio para a formação de complexos de inclusão, pretende-se saber de que forma influi a presença de K^+ e Cl^- na solução aquosa, assim como definir o valor da sua constante de associação, se ocorrer, com a ciclodextrina.

Tomando como referência o modelo anteriormente aplicado para a estimativa das constantes de associação entre iões K^+ e as metilxantinas, as equações (2.3.23) a 2.3.28) podem ser igualmente desenvolvidas para o sistema KCl – ciclodextrina, supondo um equilíbrio do tipo



Note-se que o processo é aplicável quer ao ião K^+ quer ao Cl^- e que a constante de associação e o coeficiente de difusão das espécies associadas podem ser obtidos em ambos os casos, ainda que apenas se apresentem os cálculos para a inclusão do Cl^- .

Foram realizadas medidas de difusão mútua de sistemas de β -CD e HP- β -CD em solução aquosa na presença de cloreto de potássio a 298,15 e 310,15 K e medidas de difusão vestigial

de cada um dos solutos em solução aquosa do outro soluto, de forma a definir os valores dos coeficientes de difusão que definem estes sistemas.

Para o caso do sistema KCl (1) + β -CD (2) [70] (tabela 8.4 - capítulo 8) encontraram-se valores para os coeficientes de difusão do cloreto de potássio, D_{11} , inferiores aos obtidos em sistemas binários, para as mesmas concentrações, com desvios até 3,5%, mas valores para D_{22} , para a β -CD, ligeiramente superiores aos da β -CD aquosa, em não mais do que 2%. (tabela 8.2- capítulo 8 e tabela 6.13- capítulo 6). Uma possível explicação para este comportamento pode advir da entrada do KCl em solução, que ao dissociar-se e formar a sua camada de hidratação, vai remover moléculas de água do meio e, possivelmente, também a camada de hidratação da β -CD, provocando uma redução no tamanho da estrutura da ciclodextrina hidratada em solução e, por conseguinte, um ligeiro aumento na mobilidade desta última. Por outro lado, parte do KCl pode entrar na cavidade da ciclodextrina, expulsando as moléculas de água para o exterior. Com efeito, a razão D_{12}/D_{22} demonstra a existência de transporte acoplado de KCl como resultado do gradiente de β -CD, apresentando valores bastante elevados (1 mole de β -CD pode transportar em sentido contrário ao do seu gradiente de concentração até 0,7 moles de KCl).

A estimativa das constantes de associação através de dados de difusão em condições vestigiais de soluto permitiu obter valores de K de $42,1 \text{ M}^{-1}$ a $298,15 \text{ K}$ e $34,2 \text{ M}^{-1}$ a $310,15 \text{ K}$, ou seja, há evidência de que ocorre associação entre estes solutos, e esta associação é mais fraca pelo efeito de aumento da temperatura. Os coeficientes de difusão infinitesimal obtidos por aplicação deste modelo foram: $0,344 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ e $0,436 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, valores muito próximos aos da β -CD livre, o que demonstra que a associação ocorre através de inclusão. Se estimarmos o raio hidrodinâmico da molécula de β -CD em solução aquosa na presença de KCl, utilizando a equação de Stokes-Einstein, observam-se resultados de $r(298,15 \text{ K}) = 0,74_0 \text{ nm}$ e $r(310,15 \text{ K}) = 0,71_9 \text{ nm}$. Neste sistema ocorrem alterações opostas às duas temperaturas estudadas. Enquanto a $298,15 \text{ K}$ se verifica uma diminuição no tamanho do raio hidrodinâmico da ciclodextrina (cerca de 2%), a $310,15 \text{ K}$ este aumenta em razão semelhante. Certamente a entrada em solução do KCl, à temperatura padrão, tem o efeito de desidratar a molécula de β -CD retirando-lhe moléculas de água de hidratação para a sua própria hidratação, ainda que alguns iões Cl^- possam penetrar na cavidade e formar complexos de inclusão. Como assumido previamente, a $310,15 \text{ K}$ o efeito térmico pode desfavorecer a penetração destes iões na cavidade e a sua associação ocorrer exteriormente aumentando o tamanho da molécula de β -CD.

Relativamente ao sistema KCl (1) + HP- β -CD (2)(tabela 8.5- capítulo 8), os resultados obtidos para os coeficientes de difusão principais, comparativamente aos binários, à mesma temperatura (tabela 8.3- capítulo 8 e tabela 6.18 -capítulo 6), revelam que o KCl adicionado produz alterações relativamente pequenas no coeficiente de difusão, D_{22} , da HP- β -CD (menos de 3%), enquanto a adição de HP- β -CD provoca alterações significativas no coeficiente de difusão, D_{11} , do KCl ($\leq 7\%$). Tal como no caso da β -CD, a entrada de KCl na solução aquosa pode ter o efeito de libertar para o meio moléculas de água aprisionadas nas camadas de hidratação da ciclodextrina, devido à hidratação do KCl e, portanto, diminuir o tamanho da molécula de ciclodextrina, permitindo-lhe uma maior mobilidade. Também neste caso, os iões Cl⁻ podem ser incluídos na cavidade da ciclodextrina e, tendo em conta os valores do transporte acoplado de solutos obtidos pelo quociente D_{12}/D_{22} , que representa o número de moles de KCl transportados por mole de HP- β -CD difundente, que atinge as 0,4 moles, esperar-se-iam valores elevados para a constante de inclusão.

Com efeito, obtiveram-se valores de K de 47,8 e 34,8 M⁻¹ a 298,15 K e 310,15 K, respetivamente, o que representa um aumento considerável da associação observada face à β -CD. Novamente se encontram indícios de que a associação ocorre através da inclusão, como comprovam os coeficientes de difusão a concentração infinitesimal obtidos para a espécie associada de $0,340 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ e $0,434 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, muito próximos aos da ciclodextrina livre. Ainda relativamente ao tamanho das espécies difundentes em solução, mais precisamente para a molécula de HP- β -CD, estimaram-se os valores do raio hidrodinâmico em soluções aquosas de KCl e encontraram-se valores de $r(298,15 \text{ K}) = 0,74_7 \text{ nm}$ e $r(310,15 \text{ K}) = 0,79_2 \text{ nm}$, cerca de 1,5 -2% abaixo do valor em água. Por conseguinte, o tamanho desta molécula é mais afetado pela presença de KCl que a β -CD, uma vez que esta última é menos propensa a estabelecer ligações com as moléculas de água circundantes. A diminuição do tamanho da ciclodextrina devida à presença destes iões em solução, possivelmente ocorre porque apesar de alguns iões penetrarem na cavidade, a presença doutros em solução poderá retirar moléculas de água das camadas de hidratação da ciclodextrina para a sua própria camada, sendo este resultado menos pronunciado à temperatura mais elevada devido ao efeito térmico.

4.3.3. Balanço global da presença de íões na formação de complexos ciclodextrina-fármaco: estabilização de estruturas complexas ou competição para a inclusão?

Até ao momento caracterizaram-se de forma individualizada, uma serie de sistemas aquosos que representam cada um dos compostos principais envolvidos no desenvolvimento de um sistema de libertação controlada de fármaco, aumentando-se a complexidade ao longo desta investigação com o objetivo de mimetizar, dentro da medida do possível, as condições a que estão sujeitos estes sistemas *in vivo*. Em seguida, pretende-se analisar a situação global onde estão presentes o fármaco (metilxantina), o veículo de transporte (ciclodextrina) e íões presentes em fluidos fisiológicos (aqui representados pelos íões K^+ e Cl^-) e compreender como estes compostos interagem entre si e influenciam as propriedades dos restantes. Neste sentido, estudaram-se as propriedades de transporte da cafeína e da teofilina (metilxantinas), na presença de ciclodextrina (β -CD e HP- β -CD) e de cloreto de potássio em solução aquosa, através da medida dos coeficientes de difusão de misturas quaternárias.

De uma síntese dos dados previamente obtidos, seria espectável que, em solução aquosa na presença de ciclodextrinas e íões, somente a magnitude da associação entre a cafeína e a β -CD fosse afetada pela presença de íões K^+/Cl^- , uma vez que todas as constantes de associação destes sistemas têm valores muito próximos. A 310,15 K poderia ocorrer competição para a ocupação da cavidade da ciclodextrina por íões Cl^- . Na presença de HP- β -CD a existência de competição não pareceria viável. Para o caso da teofilina em solução aquosa na presença de ciclodextrinas e íões, seria de esperar que se mantivesse a inclusão preferencial desta molécula na cavidade da HP- β -CD mas não na de β -CD, pois possivelmente seria o KCl aquele que se incluiria.

A análise teórica da dependência da concentração em sistemas de multicomponentes, como é o caso duma mistura quaternária, é complexa e, por conseguinte, a discussão que se segue será feita apenas a um nível qualitativo e apoiada nos dados obtidos para os coeficientes de difusão correspondentes aos referidos compostos obtidos anteriormente para cada uma das misturas estudadas. Para todos os sistemas em questão a numeração dos componentes foi feita na sequência: ciclodextrina (1) + KCl (2) + metilxantina (3) + água. Nestes sistemas os coeficientes de difusão principais $^{123}D_{11}$, $^{123}D_{22}$ e $^{123}D_{33}$ proporcionam os fluxos molares da ciclodextrina (1), do cloreto de potássio (2) e da metilxantina (3) conduzidos pelos seus próprios gradientes de concentração. Os coeficientes de difusão secundários representam os fluxos acoplados de um soluto dirigidos por gradientes de concentração dos outros solutos em solução, ou seja:

- $^{123}D_{21}$ e $^{123}D_{31}$ representam os fluxos acoplados de cloreto de potássio e metilxantina gerados pelo gradiente de concentração da ciclodextrina;

- $^{123}D_{12}$ e $^{123}D_{32}$ representam os fluxos acoplados de ciclodextrina e metilxantina gerados pelo gradiente de concentração de cloreto de potássio;

- $^{123}D_{13}$ e $^{123}D_{23}$ representam os fluxos acoplados de ciclodextrina e de cloreto de potássio gerados pelo gradiente de concentração de metilxantina.

Os valores dos coeficientes de difusão obtidos para estes sistemas quaternários podem ser diretamente correlacionados com os correspondentes obtidos para os mesmos compostos em solução aquosa binária e /ou ternária. Isto é, o coeficiente de difusão principal $^{123}D_{33}$, correspondente à metilxantina em solução aquosa numa mistura quaternária pode ser comparado com o coeficiente de difusão D_{33} (correspondente a mistura ternária deste composto na presença de ciclodextrina ou KCl) e com o seu coeficiente de difusão binário D (em água). Desta forma, podem avaliar-se as alterações ocorridas na difusão desta espécie, e de que forma é afetada pela introdução de outros solutos de caráter iónico e/ou molecular em solução. Também se podem relacionar os coeficientes de difusão secundários referentes à difusão numa mistura quaternária com os que lhe correspondem numa mistura ternária, isto é, $^{123}D_{31}$ e $^{123}D_{32}$ representam os fluxos de metilxantina gerados pelos gradientes de concentração da ciclodextrina e de KCl respetivamente, e estão diretamente relacionados com D_{31} (para a metilxantina na presença de ciclodextrina) e D_{32} (para a metilxantina na presença de KCl). Da mesma forma se pode aplicar esta análise aos demais componentes em solução.

4.3.3.1. Efeito do cloreto de potássio sobre as soluções aquosas de ciclodextrina-caféina

Para analisar o efeito da presença de cloreto de potássio sobre os possíveis complexos de ciclodextrina e caféina em solução aquosa, foram realizadas medidas dos coeficientes de difusão mútua de soluções aquosas de caféina na presença de β -CD e KCl e HP- β -CD e KCl a razões de concentração diferentes e à temperatura padrão (298,15 K). Os valores médios dos coeficientes de difusão obtidos para o sistema quaternário β -CD (1) + KCl (2) + caféina (3) + água a 298,15 K, são mostrados na tabela 4L [54]. A tabela 4M apresenta os valores dos coeficientes de difusão principais e secundários que estão diretamente relacionados com estas medidas.

Tabela 4L: Coeficientes de difusão quaternários do sistema β -CD (1) + KCl (2) + cafeína (3) + água, a 298,15 K e respectivos desvios padrão das medidas, S_D

	$c/(\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3})$		
	0,002	0,005	0,010
$(^{123}D_{11} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$0,322 \pm 0,025$	$0,320 \pm 0,005$	$0,311 \pm 0,020$
$(^{123}D_{12} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$-0,028 \pm 0,006$	$-0,022 \pm 0,008$	$-0,034 \pm 0,012$
$(^{123}D_{13} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$-0,002 \pm 0,017$	$0,020 \pm 0,009$	$0,055 \pm 0,040$
$(^{123}D_{21} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$0,505 \pm 0,013$	$0,210 \pm 0,017$	$-0,052 \pm 0,031$
$(^{123}D_{22} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$1,911 \pm 0,036$	$1,882 \pm 0,080$	$1,518 \pm 0,030$
$(^{123}D_{23} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$-0,121 \pm 0,042$	$-0,101 \pm 0,050$	$-0,104 \pm 0,030$
$(^{123}D_{31} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$-0,007 \pm 0,053$	$0,004 \pm 0,076$	$0,057 \pm 0,015$
$(^{123}D_{32} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$-0,030 \pm 0,040$	$0,001 \pm 0,073$	$0,141 \pm 0,026$
$(^{123}D_{33} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$0,797 \pm 0,073$	$0,770 \pm 0,029$	$0,748 \pm 0,012$

Nota: corresponde à tabela 8.6 no texto principal- capítulo 8

Tabela 4M: Comparação dos coeficientes de difusão quaternários com os correspondentes ternários e binários para o sistema β -CD (1) + KCl (2) + cafeína (3) + água, a 298,15 K

	D_{11}^f	D_{12}^f	D_{13}^f	D_{21}^f	D_{22}^f	D_{23}^f	D_{31}^f	D_{32}^f	D_{33}^f
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 2 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,322	-0,028	-0,002	0,505	1,911	-0,121	-0,007	-0,030	0,797
$D_{ij}^{(b)}$	0,324	-0,068		-0,242	1,924				
$D_{ij}^{(c)}$	0,323		-0,008				0,016		0,735
$D_{ij}^{(d)}$					1,951	-0,165		-0,056	0,746
$D_{ij}^{(e)}$	0,324				1,954				0,751
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 5 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,320	-0,022	0,020	0,210	1,882	-0,101	0,004	0,001	0,770
$D_{ij}^{(b)}$	0,317	-0,088		-0,196	1,891				
$D_{ij}^{(c)}$	0,318		-0,011				0,014		0,725
$D_{ij}^{(d)}$					1,903	-0,210		-0,112	0,731
$D_{ij}^{(e)}$	0,322				1,934				0,738
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 10 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,311	-0,034	0,055	-0,052	1,518	-0,104	0,057	0,141	0,748
$D_{ij}^{(b)}$	0,313	-0,119		-0,057	1,848				
$D_{ij}^{(c)}$	0,313		-0,014				0,013		0,695
$D_{ij}^{(d)}$					1,844	0,104		-0,282	0,688
$D_{ij}^{(e)}$	0,316				1,918				0,703

^a Coeficientes de difusão quaternários para as soluções aquosas de β -CD (1) + cafeína (2) + KCl (3) + água ; ^b Coeficientes de difusão ternários para as soluções aquosas de β -CD (1) + KCl (2); ^c Coeficientes de difusão ternários para as soluções aquosas de β -CD (1) + cafeína (2); ^d Coeficientes de difusão ternários para as soluções aquosas de KCl (1) + cafeína (2); ^e Coeficientes de difusão binários para as soluções aquosas de β -CD, KCl e cafeína; ^f Unidades de D em $10^{-9}.\text{m}^2.\text{s}^{-1}$; Corresponde a tabela 8.7 no texto principal- capítulo 8.

- Coeficientes de difusão principais $^{123}D_{11}$, $^{123}D_{22}$ e $^{123}D_{33}$

O valor do coeficiente $^{123}D_{11}$ (Tabela 4L) diminui com o aumento da concentração dos solutos, no intervalo de concentrações estudado, em cerca de 3%, e o seu valor é muito próximo ao encontrado para a ciclodextrina em água. $^{123}D_{22}$ e $^{123}D_{33}$ também variam com a concentração, sendo que a diminuição em $^{123}D_{22}$ é bastante significativa, já que atinge os 20%, e no caso de $^{123}D_{33}$ é de 6%. A ligeira diminuição do coeficiente de difusão da β -CD comparativamente ao decréscimo bastante mais expressivo encontrado nos coeficientes de difusão principais da cafeína, mas principalmente no KCl, pode indicar que as associações estabelecidas entre a ciclodextrina e os outros solutos seriam principalmente de inclusão, razão pela qual a sua mobilidade surge pouco afetada. Em princípio, a inclusão de KCl na cavidade da ciclodextrina em detrimento da cafeína poderia também afetar a mobilidade do KCl e ser uma das causas da diminuição significativa no seu coeficiente de difusão.

- Difusão impulsionada por gradientes de β -ciclodextrina

Relativamente a estes coeficientes verificamos que enquanto $^{123}D_{31}$ apresenta valores muito próximos de zero, dentro do erro experimental, os valores de $^{123}D_{21}$ são diferentes de zero e podem ser interpretados em termos da presença de possíveis interações entre a β -CD e KCl (por exemplo, os complexos cuja constante de associação estimamos anteriormente). A quantificação do transporte de KCl por efeito do gradiente de β -CD (a partir da razão $^{123}D_{21}/^{123}D_{11}$) permite verificar que, às composições utilizadas, 1 mole de β -CD difundente co-transporta até 1,6 moles de cloreto de potássio em soluções diluídas (embora este transporte diminua com o aumento da concentração de solutos).

- Difusão impulsionada por gradientes de cloreto de potássio

Os valores apresentados por $^{123}D_{12}$ e $^{123}D_{32}$ são praticamente zero dentro do erro experimental, ou seja, os gradientes de KCl são incapazes de gerar fluxos acoplados dos outros componentes em solução aquosa.

- Difusão impulsionada por gradientes de cafeína

O coeficiente de difusão $^{123}D_{13}$ é praticamente zero dentro do erro experimental. Como notado anteriormente, os gradientes de cafeína são incapazes de gerar fluxos acoplados significativos de ciclodextrina. Já $^{123}D_{23}$ apresenta valores praticamente constantes, e a partir da relação D_{23}/D_{33} nas mesmas composições, espera-se que uma mole de cafeína transporte,

no sentido oposto ao do seu gradiente de concentração, aproximadamente 0,15 moles de KCl, um valor ligeiramente inferior ao encontrado para o sistema aquoso KCl + cafeína.

Portanto, em virtude dos resultados encontrados a partir da análise dos coeficientes de difusão principais e secundários e dos fluxos gerados pela difusão destes solutos, comparativamente às misturas ternárias e aos resultados obtidos para sistemas binários, parecem existir bastantes evidências de que pode existir competição entre cafeína e KCl para entrar na cavidade da ciclodextrina. A diminuição de 20% do coeficiente de difusão de KCl, juntamente com um transporte significativo de KCl pela ciclodextrina e pela cafeína, dão indicação de que a tendência deste soluto na mistura quaternária seria de formar agregados quer com a β -CD quer com a cafeína, como evidenciado pelos valores próximos obtidos para as constantes de associação.

Tal como para o caso anterior, são analisados os valores médios dos coeficientes de difusão obtidos para o sistema quaternário HP- β -CD (1) + KCl (2) + cafeína (3) + água a 298,15 K, assim como uma relação entre estes e os correspondentes nas medidas binárias e ternárias, apresentados nas tabelas 4N e 4O.

Tabela 4N: Coeficientes de difusão quaternários do sistema HP- β -CD (1) + KCl (2) + cafeína (3) + água, a 298,15 K, e respetivos desvios padrão das medidas, S_D

	$c/(\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3})$		
	0,002	0,005	0,010
$(^{123}D_{11} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	0,313 \pm 0,008	0,315 \pm 0,010	0,309 \pm 0,007
$(^{123}D_{12} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	0,149 \pm 0,031	0,098 \pm 0,018	0,092 \pm 0,023
$(^{123}D_{13} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	-0,023 \pm 0,010	-0,009 \pm 0,005	-0,029 \pm 0,008
$(^{123}D_{21} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	0,052 \pm 0,059	0,172 \pm 0,057	0,263 \pm 0,106
$(^{123}D_{22} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	2,116 \pm 0,032	1,996 \pm 0,085	1,802 \pm 0,090
$(^{123}D_{23} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	-0,096 \pm 0,079	0,082 \pm 0,029	0,006 \pm 0,032
$(^{123}D_{31} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	0,077 \pm 0,044	0,054 \pm 0,016	0,047 \pm 0,117
$(^{123}D_{32} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	-0,595 \pm 0,144	-0,240 \pm 0,069	-0,149 \pm 0,084
$(^{123}D_{33} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	0,797 \pm 0,035	0,687 \pm 0,032	0,673 \pm 0,028

Nota: corresponde à tabela 8.8 no texto principal- capítulo 8

Tabela 40: Comparação dos coeficientes de difusão quaternários com os correspondentes ternários e binários para o sistema HP- β -CD (1) + KCl (2) + cafeína (3) + água, a 298,15 K

	D_{11}^f	D_{12}^f	D_{13}^f	D_{21}^f	D_{22}^f	D_{23}^f	D_{31}^f	D_{32}^f	D_{33}^f
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 2 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,313	0,149	-0,023	0,052	2,116	-0,096	0,077	-0,595	0,758
$D_{ij}^{(b)}$	0,324	0,012		-0,130	1,930				
$D_{ij}^{(c)}$	0,300		0,003				0,050		0,744
$D_{ij}^{(d)}$					1,951	-0,165		-0,056	0,746
$D_{ij}^{(e)}$	0,319				1,954				0,751
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 5 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,315	0,098	-0,009	0,172	1,996	0,082	0,054	-0,240	0,687
$D_{ij}^{(b)}$	0,317	-0,024		-0,089	1,808				
$D_{ij}^{(c)}$	0,293		-0,011				0,054		0,665
$D_{ij}^{(d)}$					1,903	-0,210		-0,112	0,731
$D_{ij}^{(e)}$	0,314				1,934				0,738
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 10 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,309	0,092	-0,029	0,263	1,802	0,006	0,047	-0,149	0,673
$D_{ij}^{(b)}$	0,308	-0,003		0,246	1,778				
$D_{ij}^{(c)}$	0,283		-0,021				0,103		0,640
$D_{ij}^{(d)}$					1,844	0,104		-0,282	0,688
$D_{ij}^{(e)}$	0,307				1,918				0,703

^a Coeficientes de difusão quaternários para as soluções aquosas de HP- β -CD (1) + cafeína (2) + KCl (3) + água ;

^b Coeficientes de difusão ternários para as soluções aquosas de HP- β -CD (1) + KCl (2); ^c Coeficientes de difusão ternários para as soluções aquosas de HP- β -CD (1) + cafeína (2); ^d Coeficientes de difusão ternários para as soluções aquosas de KCl (1) + cafeína (2); ^e Coeficientes de difusão binários para as soluções aquosas de HP- β -CD, KCl e cafeína; ^f Unidades de D em $10^{-9} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; Corresponde à tabela 8.9 no texto principal- capítulo 8

- Coeficientes de difusão principais $^{123}D_{11}$, $^{123}D_{22}$ e $^{123}D_{33}$

A análise da tabela 4N permite observar que o coeficiente $^{123}D_{11}$ é praticamente independente do aumento da concentração de solutos em solução aquosa, porque as suas alterações em função da concentração (1,5%) e relativamente ao valor binário correspondente (HP- β -CD em solução aquosa) estão dentro do erro experimental, ou seja entre 1 a 2%. Quanto aos coeficientes de difusão para o KCl e cafeína na mistura quaternária observamos um decréscimo, com a concentração, de 15% em $^{123}D_{22}$ para KCl e 11% em $^{123}D_{33}$ para a cafeína. Tal como no caso do sistema β -CD (1) + KCl (2) + cafeína (3) + água, a ligeira diminuição do coeficiente de difusão da HP- β -CD pode indicar que as associações estabelecidas entre a ciclodextrina e os outros solutos, se existirem, são principalmente de inclusão, razão pela qual a sua mobilidade não se vê afetada. A maior diminuição nos coeficientes de difusão principais da cafeína e do KCl proviria da sua inclusão. Dado que a

magnitude deste decréscimo é muito semelhante para ambos analisam-se em seguida o efeito do gradiente de cada um dos solutos em solução sobre os restantes, de modo a tentar estabelecer qual deles se poderia incluir na cavidade.

- Difusão impulsionada por gradientes de hidroxipropil-β-ciclodextrina

Ambos os coeficientes de difusão secundários são positivos, mas $^{123}D_{31}$ apresenta valores abaixo de $^{123}D_{21}$. O gradiente de HP-β-CD transporta, em cada caso, no mesmo sentido do seu gradiente de concentração, cafeína e KCl, mas enquanto no caso da cafeína 1 mole de HP-β-CD pode transportar perto de 0,24 moles de cafeína, para o KCl este valor pode atingir 0,85 moles, um valor inclusive maior do que o encontrado para o sistema ternário correspondente, o que pode ser interpretado em termos da presença de possíveis interações entre a HP-β-CD e o KCl (por exemplo, na forma de complexos cuja constante de associação estimamos anteriormente).

- Difusão impulsionada por gradientes de cloreto de potássio

$^{123}D_{12}$ apresenta valores próximos de zero dentro de erro experimental e ainda que $^{123}D_{32}$ apresente valores negativos, o transporte de cafeína gerado pelo gradiente de KCl (que ocorre em sentido oposto ao do seu gradiente de concentração) tem um máximo de 0,3 moles de cafeína por mole de KCl difundente e diminui com o aumento concentração de solutos em solução, ao contrário do que acontece no sistema ternário correspondente.

- Difusão impulsionada por gradientes de cafeína

O coeficiente de difusão $^{123}D_{13}$ é muito pequeno e negativo, tal como $^{123}D_{23}$, sendo que este último tende para zero dentro do erro experimental. O gradiente de cafeína não pode gerar um fluxo acoplado significativo de ciclodextrina (não transporta mais de 0,04 moles de ciclodextrina por mole de cafeína difundente); com o aumento da concentração de solutos em solução desaparece o fluxo acoplado de KCl pelo efeito do gradiente de cafeína, situação contrário à encontrada para o sistema ternário correspondente.

Para o sistema aquoso HP-β-CD (1) + KCl (2) + cafeína (3) e a partir dos estudos anteriores realizados para os sistemas binários e ternários que compõem esta mistura, esperar-se-iam resultados que comprovassem a inclusão de cafeína em detrimento do KCl. Na verdade, a partir dos coeficientes de difusão principais observa-se que a difusão da

ciclodextrina não é afetada pela presença dos outros solutos, uma indicação de que a interação entre solutos deve ocorrer através da formação de complexos de inclusão. Com o aumento da concentração de solutos em solução, o fluxo gerado pelos gradientes de concentração destes ocorre no sentido de uma associação mais estável entre ciclodextrina e cafeína, e menos estável quer entre a ciclodextrina e o KCl quer entre a cafeína e o KCl. Inclusivamente pareceria que, em soluções mais diluídas, o KCl poderia estar sujeito a um efeito de *salting out*, como evidenciado pelos valores mais elevados apresentados pelo coeficiente de difusão principal deste soluto relativamente ao obtido em água.

4.3.3.2. Efeito do cloreto de potássio sobre as soluções aquosas de ciclodextrina-teofilina

Tal como no caso da cafeína e por forma a compreender o efeito da presença de cloreto de potássio nos agregados de ciclodextrina-teofilina em solução aquosa, foram realizadas medidas dos coeficientes de difusão mútua de soluções aquosas de teofilina na presença de β -CD e KCl e HP- β -CD e KCl, em razões de concentração diferentes e à temperatura padrão (298,15 K) e comparados com os correspondentes sistemas binários e ternários.

Os valores médios dos coeficientes de difusão encontrados para o sistema quaternário β -CD (1)+ KCl (2) + teofilina (3)+ água, a 298,15 K, são apresentados na tabela 4P e comparados na tabela 4Q com aqueles obtidos para as correspondentes soluções binárias e ternárias.

Tabela 4P: Coeficientes de difusão quaternários do sistema β -CD (1) + KCl (2) + teofilina (3) + água, a 298,15 K, e respetivos desvios padrão das medidas, S_D

	c/(mol·dm ⁻³)		
	0,002	0,005	0,010
$(^{123}D_{11} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	0,328 ± 0,002	0,304 ± 0,014	0,289 ± 0,008
$(^{123}D_{12} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	0,009 ± 0,025	0,039 ± 0,070	0,033 ± 0,056
$(^{123}D_{13} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	0,003 ± 0,018	0,029 ± 0,068	0,030 ± 0,045
$(^{123}D_{21} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	-0,052 ± 0,010	-0,176 ± 0,043	-0,143 ± 0,251
$(^{123}D_{22} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	2,011 ± 0,071	1,870 ± 0,081	1,719 ± 0,045
$(^{123}D_{23} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	0,043 ± 0,096	0,187 ± 0,240	0,347 ± 0,248
$(^{123}D_{31} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	0,029 ± 0,224	-0,020 ± 0,208	-0,275 ± 0,136
$(^{123}D_{32} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	-0,279 ± 0,128	-0,273 ± 0,079	-0,068 ± 0,086
$(^{123}D_{33} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	0,706 ± 0,034	0,631 ± 0,023	0,583 ± 0,036

Nota: corresponde à tabela 8.10 no texto principal- capítulo 8

Tabela 4Q: Comparação dos coeficientes de difusão quaternários com os correspondentes ternários e binários para o sistema β -CD (1) + KCl (2) + teofilina (3) + água, a 298,15 K

	D_{11}^f	D_{12}^f	D_{13}^f	D_{21}^f	D_{22}^f	D_{23}^f	D_{31}^f	D_{32}^f	D_{33}^f
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 2 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,328	0,009	0,003	-0,052	2,011	0,043	0,029	-0,279	0,706
$D_{ij}^{(b)}$	0,324	-0,068		-0,242	1,959				
$D_{ij}^{(c)}$	0,321		-0,003				0,004		0,721
$D_{ij}^{(d)}$					1,847	-0,024		-0,012	0,783
$D_{ij}^{(e)}$	0,324				1,954				0,785
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 5 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,304	0,039	0,029	-0,176	1,870	0,187	-0,020	-0,273	0,631
$D_{ij}^{(b)}$	0,317	-0,088		-0,196	1,937				
$D_{ij}^{(c)}$	0,316		0,005				-0,024		0,683
$D_{ij}^{(d)}$					1,842	-0,313		-0,108	0,765
$D_{ij}^{(e)}$	0,322				1,934				0,762
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 10 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,289	0,033	0,030	-0,143	1,719	0,347	-0,275	-0,068	0,583
$D_{ij}^{(b)}$	0,313	-0,119		-0,059	1,925				
$D_{ij}^{(c)}$	0,309		-0,016				-0,063		0,628
$D_{ij}^{(d)}$					1,690	-0,359		-0,103	0,736
$D_{ij}^{(e)}$	0,316				1,918				0,734

^a Coeficientes de difusão quaternários para as soluções aquosas de β -CD (1) + teofilina (2) + KCl (3) + água ;
^b Coeficientes de difusão ternários para as soluções aquosas de β -CD (1) + KCl (2); ^c Coeficientes de difusão ternários para as soluções aquosas de β -CD (1) + teofilina (2); ^d Coeficientes de difusão ternários para as soluções aquosas de KCl (1) + teofilina (2); ^e Coeficientes de difusão binários para as soluções aquosas de β -CD, KCl e teofilina; ^f Unidades de D em $10^{-9} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; Corresponde à tabela 8.11 no texto principal- capítulo 8

- Coeficientes de difusão principais $^{123}D_{11}$, $^{123}D_{22}$ e $^{123}D_{33}$

O valor de $^{123}D_{11}$ diminui cerca de 12% com o aumento da concentração de solutos, no intervalo de concentrações estudado. $^{123}D_{22}$ e $^{123}D_{33}$ também variam com a concentração, com um decréscimo em $^{123}D_{22}$ de 14,5% e em $^{123}D_{33}$ a atingir os 17,5%. Estas diminuições elevadas nos coeficientes de difusão principais poderiam ser explicadas por um lado pelo aumento da viscosidade das soluções, devido ao aumento do número de componentes em solução aquosa e, por outro lado, por uma maior interação entre os solutos. No entanto, as variações observadas nas viscosidades dos sistemas ternários correspondentes não são suficientemente elevadas para justificar uma redução nessa ordem, na mistura quaternária. A explicação mais razoável parece provir da formação de agregados entre as espécies de soluto que resultariam numa menor mobilidade, levando à diminuição dos respetivos coeficientes de difusão. Não foi possível encontrar um fator comum que permitisse prever os valores de $^{123}D_{11}$, $^{123}D_{22}$ e

$^{123}D_{33}$ a partir dos coeficientes de difusão ternários D_{11} , D_{22} e D_{33} nos respectivos sistemas, dado que as proporções entre os valores dos coeficientes de difusão quaternários e ternários correspondentes não são constantes e diminuem com o aumento da concentração de solutos em solução. Portanto, esta é uma evidência de que o tipo de interação que ocorre influencia diretamente o coeficiente de difusão, e não pode ser explicada como um simples processo de associação.

- Difusão impulsionada por gradientes de β -ciclodextrina

Ambos $^{123}D_{21}$ e $^{123}D_{31}$ aumentam em magnitude com o aumento da concentração de soluto e tornam-se mais negativos, indicando a existência de fluxos acoplados. Por conseguinte, os valores dos coeficientes de difusão secundários $^{123}D_{21}$ e $^{123}D_{31}$ podem ser interpretados em termos das eventuais variações nas interações entre β -CD e KCl ou β -CD e teofilina para soluções diluídas (complexos 1:1 acima descritos). Essas relações também poderiam explicar as grandes diminuições nos coeficientes de difusão principais. Se considerarmos que D_{21}/D_{11} dá o número de moles de cloreto de potássio transportado por mole de β -CD, impelido pelo seu próprio gradiente de concentração, pode-se considerar que nas composições utilizadas, 1 mole de β -CD transporta, em sentido oposto ao seu gradiente de concentração, até 0,6 moles de cloreto de potássio. A partir dos valores D_{31}/D_{11} nas mesmas composições, espera-se que uma mole de β -CD transporte em sentido oposto ao seu gradiente de concentração, até 0,95 mol de teofilina. Relativamente aos coeficientes de difusão nos sistemas ternários que lhes correspondem, há pouca alteração ao KCl transportado pela β -CD. Já o transporte de teofilina pela ciclodextrina na mistura quaternária é superior ao encontrado para a teofilina na presença apenas de β -CD.

- Difusão impulsionada por gradientes de cloreto de potássio

Os valores encontrados para $^{123}D_{12}$ são pequenos e próximos de zero, dentro do erro experimental, ou seja, os gradientes de KCl não são capazes de gerar fluxos acoplados de β -CD, tal como verificado noutros sistemas. No entanto, o coeficiente $^{123}D_{32}$ apresenta valores negativos e diferentes de zero, possivelmente devido à existência na solução de associação entre as moléculas de teofilina e os iões potássio. Quantitativamente, pode comprovar-se que o transporte de teofilina pelo gradiente de KCl diminui de 0,24 a 0,04 moles de teofilina contra transportados por mole de KCl difundente, no intervalo de concentrações estudado. A diminuição na quantidade de teofilina transportada pelo gradiente

de KCl pode ser devida à alteração nas interações preferenciais entre a teofilina e outros componentes em solução, especialmente a ciclodextrina.

- *Difusão impulsionada por gradientes de teofilina*

$^{123}D_{13}$ é muito pequeno e tende para zero dentro do erro experimental. Como visto anteriormente, os gradientes de teofilina são incapazes de gerar fluxos acoplados significativos de ciclodextrina. Relativamente a $^{123}D_{23}$ os seus valores aumentam com o aumento da concentração de solutos, tornando-se grandes e positivos. A partir de D_{23}/D_{33} espera-se que uma mole de teofilina difundente transporte na mesma direção do seu gradiente de concentração até 0,6 mol de KCl, uma situação inversa à encontrada no sistema aquoso KCl (1) + teofilina (2).

A partir da análise anterior dos resultados para os coeficientes de difusão principais e secundários da mistura quaternária β -CD (1) + KCl (2) teofilina + (3) + água, e dos fluxos gerados pela difusão destes solutos comparativamente a misturas ternárias e aos resultados dos sistemas binários, podem ser encontrados indícios da existência de competição entre a teofilina e KCl para a ocupação da cavidade da ciclodextrina, com eventual preferência para o KCl. O transporte de quantidades significativas de KCl pela ciclodextrina e pela teofilina, associado com a diminuição de 15% no seu coeficiente de difusão, dão convicção de que este soluto na mistura quaternária tende a associar-se preferencialmente à β -CD.

Nas tabelas 4R e 4S apresentam-se os valores médios dos coeficientes de difusão para o sistema quaternário HP- β -CD (1) + KCl (2) + teofilina (3) + água, a 298,15 K, assim como a relação entre estes e os coeficientes de difusão ternários e binários correspondentes.

Tabela 4R: Coeficientes de difusão quaternários do sistema HP- β -CD (1) + KCl (2) + teofilina (3) + água, a 298,15 K, e respectivos desvios padrão das medidas, S_D

	$c/(\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3})$		
	0,002	0,005	0,010
$(^{123}D_{11} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	0,322 \pm 0,013	0,311 \pm 0,012	0,307 \pm 0,014
$(^{123}D_{12} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	0,020 \pm 0,031	-0,015 \pm 0,010	-0,002 \pm 0,017
$(^{123}D_{13} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	-0,059 \pm 0,026	0,031 \pm 0,020	0,003 \pm 0,010
$(^{123}D_{21} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	0,149 \pm 0,117	0,180 \pm 0,093	0,393 \pm 0,375
$(^{123}D_{22} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	2,028 \pm 0,091	1,940 \pm 0,060	1,842 \pm 0,042
$(^{123}D_{23} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	0,230 \pm 0,054	0,129 \pm 0,101	0,186 \pm 0,120
$(^{123}D_{31} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	-0,013 \pm 0,097	-0,014 \pm 0,030	-0,258 \pm 0,074
$(^{123}D_{32} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	-0,470 \pm 0,168	-0,240 \pm 0,051	-0,120 \pm 0,014
$(^{123}D_{33} \pm S_D)/(10^{-9} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	0,719 \pm 0,049	0,646 \pm 0,022	0,556 \pm 0,045

Nota: corresponde à tabela 8.12 no texto principal- capítulo 8

Tabela 4S: Comparação dos coeficientes de difusão quaternários com os correspondentes ternários e binários para o sistema HP- β -CD (1) + KCl (2) + teofilina (3) + água, a 298,15 K

	D_{11}^f	D_{12}^f	D_{13}^f	D_{21}^f	D_{22}^f	D_{23}^f	D_{31}^f	D_{32}^f	D_{33}^f
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 2 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,322	0,020	-0,059	0,149	2,028	0,230	-0,013	-0,470	0,719
$D_{ij}^{(b)}$	0,324	0,012		-0,130	1,930				
$D_{ij}^{(c)}$	0,306		0,002				0,068		0,756
$D_{ij}^{(d)}$					1,847	-0,024		-0,012	0,783
$D_{ij}^{(e)}$	0,319				1,954				0,785
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 5 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,311	-0,015	0,031	0,180	1,940	0,129	-0,014	-0,240	0,646
$D_{ij}^{(b)}$	0,317	-0,024		-0,089	1,808				
$D_{ij}^{(c)}$	0,301		0,024				0,063		0,682
$D_{ij}^{(d)}$					1,842	-0,313		-0,108	0,765
$D_{ij}^{(e)}$	0,314				1,934				0,762
$c = c_1 = c_2 = c_3 = 10 \text{ mM}$									
$D_{ij}^{(a)}$	0,307	-0,002	0,003	0,393	1,842	0,186	-0,258	-0,120	0,556
$D_{ij}^{(b)}$	0,308	-0,003		0,246	1,798				
$D_{ij}^{(c)}$	0,298		-0,029				-0,009		0,548
$D_{ij}^{(d)}$					1,690	-0,359		-0,103	0,736
$D_{ij}^{(e)}$	0,307				1,918				0,734

^a Coeficientes de difusão quaternários para as soluções aquosas de HP- β -CD (1) + teofilina (2) + KCl (3) + água ;

^b Coeficientes de difusão ternários para as soluções aquosas de HP- β -CD (1) + KCl (2); ^c Coeficientes de difusão ternários para as soluções aquosas de HP- β -CD (1) + teofilina (2); ^d Coeficientes de difusão ternários para as soluções aquosas de KCl (1) + teofilina (2); ^e Coeficientes de difusão binários para as soluções aquosas de HP- β -CD, KCl e teofilina;

^f Unidades de D em $10^{-9}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$; corresponde à tabela 8.11 no texto principal- capítulo 8

- Coeficientes de difusão principais $^{123}D_{11}$, $^{123}D_{22}$ e $^{123}D_{33}$

Verifica-se que o coeficiente de difusão $^{123}D_{11}$ diminui ligeiramente, cerca de 3%, com a concentração crescente de solutos em solução. Este coeficiente de difusão é semelhante ao binário correspondente e ao coeficiente de difusão ternário encontrado para os outros sistemas em estudo (Tabela 4S) e pode ser estimado a partir destes últimos. Foi encontrado um fator comum entre o coeficiente de difusão quaternário medido, $^{123}D_{11}$, e os valores ternários D_{11} correspondentes, e.g., $^{123}D_{11}$ na mistura quaternária diminui por um fator de 0,98 relativamente ao D_{11} no sistema HP- β -CD (1) + KCl (2) e 1,03 maior do que a HP- β -CD.(1) + teofilina (2). A soma destes efeitos compensadores conduz a um valor muito próximo do valor binário, tal como foi encontrado. Em contraste, as alterações em $^{123}D_{22}$ e $^{123}D_{33}$ são maiores. No caso de $^{123}D_{22}$ há uma diminuição com a concentração crescente de solutos de 9%, embora possa ser percebido que os valores são em geral ligeiramente mais elevados do que os coeficientes de difusão binários e ternários (Tabela 4S), ou seja, para KCl aquoso ou KCl na presença de HP- β -CD. As maiores diferenças são observadas no coeficiente de difusão principal quaternário para a teofilina, $^{123}D_{33}$, com uma queda de aproximadamente 21% com o aumento da concentração e inferior ao coeficiente de difusão binário de uma solução aquosa de teofilina, e D_{33} para a teofilina na presença de KCl (alterações entre 8 e 23%). $^{123}D_{33}$ também é cerca de 5% menor do que o sistema ternário correspondente sem adição de sal (Tabela 4S). Em geral, as alterações que ocorrem em $^{123}D_{22}$ relativamente a D_{22} mostram que, dentro do erro experimental, o coeficiente de difusão quaternário é superior ao ternário por um fator de 1,05, com a exceção da concentração mais elevada. Não se encontrou um fator comum constante entre $^{123}D_{33}$ e D_{33} nos respetivos sistemas.

- Difusão impulsionada por gradientes de hidroxipropil- β -ciclodextrina

Podemos observar que ambos os coeficientes de difusão secundários crescem em magnitude com o aumento da concentração de solutos. $^{123}D_{21}$ é grande e positivo e $^{123}D_{31}$ negativo, mostrando claramente a existência de fluxo acoplado de solutos. Os valores elevados de $^{123}D_{21}$ podem ser interpretados em termos da presença de interações entre HP- β -CD e o KCl em soluções diluídas. Se considerarmos que D_{21}/D_{11} dá o número de moles de KCl transportado por mole de HP- β -CD movido pelo seu próprio gradiente de concentração, pode-se considerar que nas composições utilizadas, 1 mole de HP- β -CD difundente co-transporta 1,3 moles de cloreto de potássio. A partir dos valores D_{31}/D_{11} nas mesmas composições pode esperar-se que uma mole de HP- β -CD difundente transporte em

sentido oposto ao do seu gradiente de concentração até 0,84 moles de teofilina. Esta é uma alteração significativa no transporte de solutos relativamente ao ocorrido nos sistemas ternários correspondentes, uma vez que o transporte de teofilina, na presença de ciclodextrina, ocorria no mesmo sentido do gradiente de concentração desta última e passa a ocorrer em sentido oposto, além de que aumenta o transporte de KCl acoplado à ciclodextrina.

- Difusão impulsionada por gradientes de cloreto de potássio

Mais uma vez $^{123}D_{12}$ é muito pequeno e próximo de zero, dentro do erro experimental, não existindo fluxo acoplado de HP- β -CD produzido pelo gradiente de KCl, assim como ocorria nos sistemas ternários correspondentes. Os gradientes de KCl não produzem fluxos acoplados apreciáveis em componentes da solução de natureza não-eletrolítica, porque os iões K^+ e Cl^- têm mobilidades semelhantes e, por conseguinte, o campo elétrico gerado durante a difusão de KCl é relativamente pequeno. Relativamente a $^{123}D_{32}$ encontram-se valores negativos e diferentes de zero, e uma possível explicação para este facto pode provir de que algumas moléculas de teofilina e KCl em solução poderem existir como agregados (tais como complexos *teofilina* $\cdot K^+$). No entanto, quando se analisa o transporte de teofilina pelo gradiente de KCl, vemos que cai com o aumento da concentração de solutos, de 0,23 para 0,07 moles de teofilina, transportados no sentido oposto ao gradiente de concentração, por mole de KCl difundente, valores menores do que os encontrados no sistema teofilina+KCl.

- Difusão impulsionada por gradientes de teofilina

$^{123}D_{13}$ é muito pequeno e aproxima-se de zero dentro do erro experimental. Tal como acontece com $^{123}D_{12}$, os gradientes de teofilina são incapazes de gerar fluxos acoplados significativos de HP- β -CD. O mesmo é observado para os sistemas ternários correspondentes. $^{123}D_{23}$ apresenta valores praticamente constantes, isto é, o transporte de KCl por gradientes de teofilina não se vê afetado por variações na concentração dos demais solutos em solução.

Para o sistema aquoso HP- β -CD (1) + KCl (2) + teofilina (3) e a partir de estudos anteriores realizados para os sistemas ternários que o compõem, esperar-se-ia antever resultados que evidenciassem a inclusão da teofilina, em detrimento do KCl, na cavidade da ciclodextrina. Na verdade, a partir dos coeficientes de difusão principais notamos que a

difusão de ciclodextrina é muito pouco afetada pela presença dos outros solutos, uma indicação de que, ao existir complexos, estes seriam de inclusão, e verifica-se que, com o aumento da concentração dos solutos, os fluxos gerados pelos gradientes de concentração dos solutos na solução tendem a uma associação mais estável entre ciclodextrina e teofilina, como evidenciado pelos valores elevados e negativos. A possível associação entre a HP- β -CD e KCl seria muito fraca, mas as moléculas de teofilina livres em solução poderiam ter alguma tendência para associar ao KCl.

Em resumo, a introdução de iões em solução, na qual estejam presentes sistemas de libertação controlada de fármaco, tem efeitos sobre estes últimos, principalmente para o caso de β -CD, cuja associação com os fármacos é enfraquecida pela possível competição para ocupação da cavidade entre a molécula de fármaco e os iões. Ainda assim, a hidrofobicidade parece ser um fator importante uma vez que mesmo numa situação em que as constantes de associação em solução aquosa atingem valores semelhantes, a tendência é para seja a molécula de fármaco aquela que, em princípio, será introduzida na cavidade, ocorrendo associação com iões através da parte exposta ao meio ambiente ou com as moléculas de fármaco livre em solução.

5. Conclusões

Caracterizaram-se os sistemas de libertação controlada de fármaco, em solução aquosa, através de um modelo ciclodextrina – fármaco a partir de uma abordagem físico-química, i.e., definindo as suas propriedades termodinâmicas e de transporte. O efeito de fatores biológicos, tais como a temperatura e os iões presentes em fluidos fisiológicos foi também estudado de forma a compreender de que maneira estes sistemas podem ser influenciados num ambiente semelhante ao encontrado no corpo humano. Pretendeu-se, desta forma, obter informação ao nível das interações moleculares que possam ocorrer e que tenham aplicação na investigação farmacêutica.

Para tal utilizaram-se sistemas envolvendo dois tipos de moléculas de ciclodextrina: a β -CD e o seu derivado hidrofílico, HP- β -CD, assim como dois fármacos com solubilidade limitada (a cafeína e a teofilina) em virtude das suas aplicações farmacológicas como estimulantes do sistema nervoso central e aplicações no tratamento sintomático da asma. A utilização de dois tipos de ciclodextrinas com diferentes características físico-químicas permitiu derivar o efeito dos grupos substituintes e da solubilidade da ciclodextrina na

interação com o fármaco em questão. A introdução das variáveis temperatura e presença de iões permitiu analisar o efeito sobre a estabilidade destes sistemas em condições que se aproximam, dentro da medida do possível, às de um ambiente biológico.

O estudo destes sistemas foi realizado através da determinação das propriedades termodinâmicas (densidade e volume molar aparente) e de transporte (viscosidade e coeficientes de difusão mútua) de soluções aquosas de fármaco e ciclodextrina em 3 fases. Na primeira fase foram estudadas as soluções aquosas dos fármacos e das ciclodextrinas *per se*, numa segunda fase foram estudadas soluções aquosas de fármacos com ciclodextrinas e numa terceira fase foram estudadas soluções aquosas de fármacos, ciclodextrinas e iões. O intervalo de concentrações do estudo manteve-se, maioritariamente, entre 0,0005 a 0,01 mol kg⁻¹, numa tentativa de coincidir, tanto quanto possível, com as doses terapêuticas e o ambiente fisiológico. As medições foram realizadas a temperaturas de (298,15 ± 0,01) K e (310,15 ± 0,01) K.

O estudo das propriedades de soluções aquosas binárias de fármacos, cafeína e teofilina, permitiu verificar que, em meio aquoso, ambas as xantinas têm um comportamento semelhante no que respeita às propriedades aqui estudadas, tal como esperado, dadas as semelhanças na estrutura que estas moléculas que apresentam (diferindo na presença, no caso da cafeína, de um grupo metilo no carbono 7 do anel de purina). A ambas as temperaturas observou-se que a teofilina apresenta um valor inferior para o volume molar parcial a concentração infinitesimal. Da análise dos coeficientes da equação de Jones-Dole para a viscosidade das soluções destes fármacos verificou-se que, apesar da cafeína possuir uma maior constante de associação, as interações que ocorrem entre as moléculas da teofilina são mais fortes. Ambos os compostos têm uma capacidade organizadora da estrutura do solvente, ligeiramente superior no caso da cafeína. Os coeficientes de difusão destas espécies seguem a tendência já observada: a cafeína possui um coeficiente de difusão inferior, o que é consistente, por um lado, com a sua maior massa molecular e um maior raio hidrodinâmico e, além disso, com a sua maior tendência para a auto-associação e, por conseguinte, com uma menor mobilidade.

O estudo das propriedades das soluções aquosas de β -CD e HP- β -CD, permitiu verificar que estas ciclodextrinas exibem um comportamento diferente quando estão em meio aquoso. A ambas as temperaturas, verificou-se que as soluções de HP- β -CD são mais densas do que as de β -CD, apresentando as primeiras um volume molar parcial a concentração infinitesimal muito mais elevado. Este facto, juntamente com o sinal positivo encontrado para o declive

da representação do volume molar aparente com a concentração de HP- β -CD, sugere que o soluto interage fortemente com as moléculas de água, incorporando um número relativamente grande destas na esfera de hidratação. Para as viscosidades, verificou-se que ambos os compostos apresentam valores positivos e elevados do coeficiente B , como seria de esperar para compostos de alto peso molecular, maiores no caso da HP- β -CD, revelando que esta tem uma maior capacidade de interação com o solvente, e apoiando a ideia de uma maior hidratação. No que diz respeito ao coeficiente de difusão destas espécies, em solução aquosa, a HP- β -CD apresenta um coeficiente de difusão inferior, o que é consistente, por um lado, com uma maior massa molecular e um raio hidrodinâmico maior e, por outro lado, o facto de as suas soluções serem mais viscosas, tendo assim uma maior resistência ao movimento. Os valores encontrados para os coeficientes de difusão de ambas as ciclodextrinas são pequenos e pouco influenciados pelo aumento da concentração da solução, independentemente da temperatura. Este comportamento sugere que o grande tamanho das moléculas de ambas as ciclodextrinas e, conseqüentemente, a necessidade de encontrar espaços livres na estrutura da solução com o tamanho adequado, condicionam maioritariamente, a sua difusão através da solução. Os valores estimados para o raio hidrodinâmico, de acordo com o modelo de Stokes-Einstein, assim como os volumes hidrodinâmicos calculados a partir deles, confirmam um tamanho superior da entidade HP- β -CD em água, relativamente à β -CD, especialmente à temperatura de 310,15 K, reforçando a ideia de uma maior hidratação da ciclodextrina substituída.

Relativamente ao estudo da influência das ciclodextrinas sobre as propriedades físico-químicas dos fármacos em solução aquosa foram utilizados modelos que permitiram quantificar as interações moleculares existentes em solução, quer por meio de medidas resultantes da variação do volume aparente das espécies em solução aquosa, quer por meio da quantificação dos fluxos acoplados de solutos em solução aquosa.

Assim, as soluções aquosas de cafeína na presença de ciclodextrinas foram estudadas e foi comprovada a existência de interações entre o soluto cafeína e as ciclodextrinas em solução. No caso da cafeína em presença de HP- β -CD as interações entre estes solutos são caracterizadas por valores da constante de estabilidade superiores aos encontrados na presença de β -CD, mas apenas a 298,15 K. À temperatura fisiológica, não há evidência da ocorrência desta associação, fator de extrema importância quando se consideram as aplicações farmacológicas destes solutos. Na verdade, devido à sua elevada solubilidade, a HP- β -CD é a ciclodextrina com maior aplicação ao nível farmacológico, mas é muito

importante compreender que, à temperatura fisiológica tais complexos não são estáveis. O aumento da temperatura induzido com a entrada no organismo pode resultar em libertação antecipada do fármaco longe do local de absorção pretendido.

Analogamente, foram estudadas as soluções aquosas de teofilina, na presença de ciclodextrinas, e igualmente encontrada a evidência da existência de interações entre estas. São igualmente verificadas constantes de estabilidade mais elevadas para a teofilina na presença de HP- β -CD, a ambas as temperaturas, diminuindo K com o aumento da temperatura. No entanto, os nossos resultados sugerem a possível existência de interações que podem ocorrer dentro e fora da molécula de ciclodextrina, e que poderiam envolver mais do que uma molécula de teofilina. Considerando-se que as mudanças de volume que se encontraram no processo de complexação para a teofilina são razoavelmente superiores às encontrados para a cafeína, para além das constantes de estabilidade serem de ordem inferior, é razoável assumir que o processo de interação destes solutos com as ciclodextrinas, em solução aquosa, não é tão semelhante quanto o previsto.

Além do efeito da temperatura, pretendeu-se estudar de que maneira a presença de iões iria influenciar a estabilidade dos sistemas de libertação controlada dos fármacos em estudo. Neste sentido foram caracterizados separadamente cada um dos componentes individuais com os iões e, posteriormente, estudadas as alterações que ocorriam quando em presença de uma mistura quaternária, ou seja, uma solução aquosa onde estão simultaneamente presentes ciclodextrina, fármaco, iões e solvente.

Em termos de interação fármaco-ião, esperar-se-ia encontrar algum tipo de associação com iões K^+ do meio, dado estes poderem estabelecer ligações com os grupos carboxílicos $C=O$ e N disponíveis nas moléculas de cafeína e teofilina. Foram calculadas as constantes de associação destes solutos, em solução aquosa, e verificado que a hipótese de que a cafeína e a teofilina interagissem com os iões presentes nos fluidos fisiológicos (K^+) estava correta. Podemos comprovar que ambas apresentavam uma constante de associação cujos valores eram bastante semelhantes. Acreditamos que as pequenas alterações nos valores das constantes são de origem estrutural. Ficou também elucidado que a teofilina seria a mais afetada pela presença de um eletrólito. A estimativa dos raios hidrodinâmicos destas moléculas induzida pela presença dos iões K^+ e Cl^- na solução permitiu reforçar os dados encontrados para as constantes de associação.

Quanto à interação ciclodextrina-ião, tendo em conta a presença dos grupos hidroxilo terminais, esperaríamos igualmente verificar a existência de algum tipo de interação, neste caso através de pontes de hidrogénio, com o anião Cl^- , ou da sua inclusão na cavidade. Obtiveram-se os valores das constantes de estabilidade desta associação, assim como os raios hidrodinâmicos destas moléculas induzidas pela presença dos iões K^+ e Cl^- na solução. Observou-se que a interação do Cl^- com a HP- β -CD é mais forte do que com a β -CD, e essa associação é favorecida a temperaturas mais baixas.

Após a caracterização de cada um destes sistemas ternários foram caracterizadas as misturas quaternárias ciclodextrina + fármaco + KCl. Verificamos que a introdução de iões em solução, onde estejam presentes sistemas de libertação controlada sob a forma ciclodextrina-fármaco, tem efeito sobre estes últimos, principalmente para o caso dos fármacos em presença de β -CD, pois esta associação é enfraquecida por possível competição para ocupação da cavidade entre a molécula de fármaco e os iões presentes. Ainda assim, parece que a hidrofobicidade é o fator mais importante, uma vez que mesmo numa situação em que as constantes de associação em solução aquosa atingem valores semelhantes, a tendência é para que seja a molécula de fármaco, em princípio, introduzida na cavidade. A associação do fármaco com os iões poderia ocorrer através da parte exposta ao meio circundante ou entre as moléculas livres de fármaco e os iões livres em solução.

Desta forma, acreditamos que os resultados apresentados nesta dissertação contribuem para dar um maior entendimento e clareza dos fatores envolvidos nas interações entre as ciclodextrinas e os fármacos e de que forma são afetados por fatores fisiológicos, como temperatura e presença de iões.

6. Referências

- [1] Gallardo V. C., Ceja J. P. M., Arroyo M. H., Aureoles G. A., Galván D. E., Landa J. F. R., “*Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas*”, Rev Biomed, 15 (2004) 123- 136.
- [2] Kinghorn A. D., “*Human medicinal agents from plants*”, Balandrin M. F. (ed.) ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington DC (1993).
- [3] Lee K.-H., “*Discovery and Development of Natural Product-Derived Chemotherapeutic Agents Based on a Medicinal Chemistry Approach*”, J. Nat. Prod., 73 (3) (2010) 500–516.

-
- [4] Prentis R. A.; Lis Y.; Walker S. R. Br., “*Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985)*”, J. Clin. Pharmacol., 25 (1988) 387–396.
- [5] Schuster D., Laggner C., Langer T., “*Why Drugs Fail - A Study on Side Effects in New Chemical Entities*”, Curr. Pharm. Design, 11 (27) (2005) 3545-3559.
- [6] DiMasi J. A., “*Risks in new drug development: Approval success rates for investigational drugs*”, Clin. Pharmacol. Ther., 69 (2001) 297–307.
- [7] DiMasi J. A., Hansen R. W., Grabowski H. G., “*The price of innovation: new estimates of drug development costs*”, J. Health Econ., 22 (2) (2003) 151–185.
- [8] Wu-Pong S., Rojanasakul Y., “*Biopharmaceutical Drug Design and Development*”, 2nd edition, Humana Press (2008).
- [9] Han C., Wang B., “*Drug Delivery: Principles and Applications*”, Wiley Interscience (2005) chp. 1, 1-15.
- [10] “*Monografías de formas farmacéuticas. Formas farmacéuticas*”, in: Real Farmacopea Española; 3.^a edición. Ministerio de Sanidad y Consumo; Madrid (2005) 645.
- [11] Thomas G., “*Medicinal Chemistry: An Introduction*”, 2nd Edition, Wiley Interscience, (2007) 44-46.
- [12] Zhou H., “*Water insoluble drug formulation*”, CRC Press, (2008) chp. 5, 91-100.
- [13] Uekama K., Hirayama F., Irie T., “*Cyclodextrin Drug Carrier Systems*”, Chem. Rev., 98 (1998) 2045-2076.
- [14] Saltão R., Veiga F., “*Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos*”, Rev. Bras. Cien. Farm., 37 (1) (2001) 1-17.
- [15] Singh M., Sharma R., Banerjee U.C., “*Biotechnological applications of cyclodextrins*”, Biotechnol. Adv., 20 (2002) 341–359.
- [16] Davis M. E., Brewster M. E., “*Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future*”, Nat. Rev. Drug Discov., 3 (2004) 1023-1035.
- [17] Loftsson T., Duchêne D., “*Cyclodextrins and their pharmaceutical applications*”, Int. J. Pharm., 329 (2007) 1–11.
- [18] Vyas A., Saraf S., “*Cyclodextrin based novel drug delivery systems*”, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem., 62 (2008) 23–42.
- [19] Li J., Loh X. J., “*Cyclodextrin-based supramolecular architectures: Syntheses, structures, and applications for drug and gene delivery*”, Adv. Drug Deliver Rev., 60 (2008) 1000–1017.
- [20] Szejtli J., “*Comprehensive Supramolecular Chemistry*”, Pergamon: Oxford (1996) Vol. 3.
-

- [21] Bender M. L., Momiyama M., “*Cyclodextrin Chemistry*”, Springer: Berlin (1978).
- [22] Jones S. P., Grant D. J. W., Hadgraft J., Parr D., “*Cyclodextrins in the pharmaceutical sciences Part 1. Preparation, structure, and properties of cyclodextrins and cyclodextrin inclusion compounds*”, *Acta Pharm. Tech.*, 30 (3) (1984) 213-223.
- [23] Duchene D., Wouessidjewe D., “*The current state of β -cyclodextrin in pharmaceuticals*”, *Acta Pharm. Tech.*, 36 (1990) 1-6.
- [24] Duchene D., Vaution C., Glomot F., “*Cyclodextrins, their value in pharmaceutical technology*”, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 12 (1986) 2193-2215.
- [25] Liu L., Guo Q. X., “*The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins*”, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 42 (2002) 1–14.
- [26] Loftsson T., Brewster, M.E., “*Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization*”, *J. Pharm. Sci.*, 85 (1996) 1017–1025.
- [27] Stella V. J., Rajewski R. A., “*Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery*”, *Pharm. Res.*, 14 (1997) 556–567.
- [28] Loftsson T., Másson M., Brewster M. E., “*Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes*”, *J. Pharm. Sci.*, 93 (5) (2004) 1091-1099.
- [29] Loftsson T., Másson M., Brewster M. E., “*Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs*”, *J. Pharm. Sci.*, 91 (11) (2002) 2307-2316.
- [30] Gilbert R.M., “*Caffeine Consumption*”, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 158 (1984) 185-213.
- [31] Ashihara H., Crozier A., “*Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants*”, *Adv Bot Res.*, 30 (1999) 117-205.
- [32] *The Merck Index*; 14th Edition; (2006).
- [33] Spiro M., Grandoso D. M., “*Protonation constant of caffeine in aqueous solution*”, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.I*, 85 (1989) 4529-426.
- [34] Fredholm B. B., Battig K., Holmen J., Nehlig A., Zvartau E. E., “*Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use*”, *Pharmacol. Rev.*, 51 (1999) 83-133.
- [35] Moratalla R., “*Neurobiología de las metilxantinas*”, *Trastornos Adictivos*, 10(3) (2008) 201-207.
- [36] Rogers P. J., Richardson N. J., Dernoncourt C., “*Caffeine use: is there a net benefit for mood and psychomotor performance?*”, *Neuropsychobiology*, 31 (1995) 195-199.

- [37] Arnaud M.J., Welsch C. “*Theophylline and caffeine metabolism in man*” in: Woodcock B. G., Staib A. H., Rietbrock N. (eds), “*Methods in clinical pharmacology, 3: theophylline and other methylxanthines*”, Vieweg, Brunswick, (1982) 135-148.
- [38] Arnaud M. J., “*Products of metabolism of caffeine*”, in: Dews P. B. (ed), “*Caffeine*”, Springer, Berlin (1984) 3-38.
- [39] Arnaud M. J., “*The pharmacology of caffeine*”, Prog. Drug Res., 31 (1987) 273-313.
- [40] Arnaud M. J., “*Metabolism of caffeine and other components of coffee*”, in: Garattini S., (ed), “*Caffeine, coffee and heart*”, New York Raven Press (1993) 45-95.
- [41] Arnaud M. J., “*Pharmacokinetics and metabolism of caffeine*”. in: Snel J., Lorist M. M. (eds), “*Nicotine, caffeine and social drink, behaviour and brain function*”, Harwood, Amsterdam (1998) 153-165.
- [42] Dews, P. B., “*Caffeine: Perspectives from Recent Research*”, Berlin: Springer-Verlag (1984).
- [43] Sawynok J., “*Pharmacological rationale for the clinical use of caffeine*”, Drugs, 49 (1) (1995) 37-50.
- [44] Nishijo J., Yonetani I., “*The Interaction of Theophylline with Benzylamine in Aqueous Solution*”, Chem. Pharm. Bull., 30 (1982) 4507-4511.
- [45] Peck C. C., Nichols A. I., Baker J., Lenert L. L., Ezra D., “*Clinical pharmacodynamics of theophylline*”, J. Allergy Clin. Immunol., 76 (1985) 292-297.
- [46] Sharron H. F., Konjeti R. S., Hengming K., Jackie D. C., “*Inhibition of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases by Methylxanthines*”, in: “*Methylxanthines, Handbook of Experimental Pharmacology*”, Fredholm B. B. (ed), Springer Verlag Berlin Heidelberg (2011) 93-134.
- [47] Hendeles L., Massanari M. J., Weinberger M., “*Theophylline*”, in: Evans W. E., Schentag J. J., Jusko W. J. (eds), “*Applied pharmacokinetics*”, 2nd edition, Applied Therapeutics, San Francisco (1986) 1105-1188.
- [48] Ogilvie R.I., “*Clinical pharmacokinetics of theophylline*”, Clin. Pharmacokinet., 3(4) (1978) 267-293.
- [49] Rottier B. L., Duiverman E. J., “*Anti-inflammatory drug therapy in asthma*”, Paediatr. Respir. Rev., 10(4) (2009) 214-219.
- [50] Press N. J., Gessi S., Borea P. A., Polosa R., “*Therapeutic potential of adenosine receptor antagonists and agonists*”, Expert Opin. Ther. Pat., 17(8) (2007) 979-991.

- [51] Odajima Y., Okada K., Kato T., Nakano H., “*A clinical review of patients with convulsions during theophylline administration II: points to consider in administration and prognosis as determined in patients with theophylline toxicosis*”, *Arerugi.*, 56(7) (2007) 691-698.
- [52] Szentmiklósi A. J., Cseppentő A., Gesztelyi R., Zsuga J., Körtvély A., Harmati G., Nánási P. P., “*Xanthine derivatives in the heart: blessed or cursed?*”, *Curr. Med. Chem.*, 18 (24) (2011) 3695-3706.
- [53] Barnes P. J., Pauwels R. A., “*Theophylline in the management of asthma: time for reappraisal?*”, *Eur. Respir J.*, 7 (1994) 579–591.
- [54] Barnes P. J., “*Theophylline: New Perspectives for an Old Drug*“, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 167 (2003) 813–818.
- [55] Masson D. O., “*Solute molecular volumes in relation to solvation and ionization*”, *Phil. Mag.*, 8 (7) (1929) 218-235.
- [56] Redlich O., “*Molar volumes of solute IV*”, *J. Phys. Chem.*, 44 (5) (1940) 619-629.
- [57] Terekhova I. V., De Lisi R., Lazzara G., Milioto S., Muratore N., “*Volume And Heat Capacity Studies To Evidence Interactions Between Cyclodextrins And Nicotinic Acid In Water*”, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 92 (1) (2008) 285–290.
- [58] Terekhova I. V., “*Volumetric and calorimetric study on complex formation of cyclodextrins with aminobenzoic acid*”, *Mendeleev Commun.*, 19 (2009) 110-112.
- [59] Young T. F., Smith M. B., “*Thermodynamics properties of electrolytes in aqueous solution*”, *J. Phys. Chem.*, 58 (1954) 716-724.
- [60] Jones G., Dole M., “*The viscosity of aqueous solutions of strong electrolytes with special reference to barium chloride*”, *J. Am. Chem. Soc.*, 51 (1929) 2950–2964.
- [61] Thomas D. G., “*Transport characteristics of suspension: VIII. A note on the viscosity of Newtonian suspensions of uniform spherical particles*“, *J. Colloid Sci.*, 20 (1965) 267-277.
- [62] Donald H., Jenkins B., Marcus Y., “*Viscosity B-coefficients of ions in solution*”, *Chem. Rev.*, 95 (8) (1995) 2695-2724.
- [63] Tibor E. G., *Transport Phenomena in Aqueous Solutions*, Adam Hilger, London (1974).
- [64] Tyrrel H. J. V., Harris K. R., “*Diffusion in Liquids*”, Butterworths, London (1984).
- [65] Tyrrel H. J. V., “*The origin and present status of Pick's diffusion law*”, *J. Chem. Ed.*, 41 (1964) 397-400.
- [66] Hartley G.S., Crank J., “*Some fundamental definitions and concepts in diffusion processes*”, *Trans. Faraday Soc.*, 45 (1949) 801-818.

- [67] Miller D. G., Albright J. G., “*Measurements of the transport properties of fluids: experimental thermodynamics*”, in Wakeham W. A., Nagashima A., Sengers J. V. (eds), Blackwell, Oxford (1991).
- [68] Leaist D. G., Noulty R. A., “*Quaternary Diffusion in Aqueous KCl-KH₂PO₄-H₃PO₄ Mixtures*”, J. Phys. Chem., 91 (1987) 1655-1658.
- [69] Leaist D. G., Hao L., “*Quaternary Diffusion Coefficients of NaCl-MgCl₂-Na₂SO₄-H₂O Synthetic Seawaters by Least-Squares Analysis of Taylor Dispersion Profiles*”, J. Sol. Chem., 22 (3) (1993) 263-277.
- [70] Ribeiro, A. C. F., Santos C. I. A. V., Lobo V. M. M., Estes M. A., “*Quaternary diffusion coefficients of β -cyclodextrin + KCl+ Caffeine+ Water at 298.15 K using a Taylor Dispersion Method*”, J. Chem. Eng. Data, 55 (7) (2010) 2610–2612.
- [71] Vitagliano V., Sartorio R., “*Some aspects of diffusion in ternary systems*”, J. Phys. Chem., 74 (1970) 2949-2956.
- [72] Paduano L., Sartorio R., Vitagliano V., Castronuovo G., “*Calorimetric and diffusional behavior of the system alpha-cyclodextrin l-phenylalanine in aqueous-solution*”, Thermochem. Acta, 162 (1990) 155-161.
- [73] Paduano, L., Sartorio R., Vitagliano, V., Costantino L., “*Diffusion-coefficients in systems with inclusion-compounds. 2. alpha-cyclodextrin-(dl)norleucine-water at 25degrees C.*”, Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 94 (7) (1990) 741-745.
- [74] Paduano L., Sartorio R., Vitagliano V., “*Diffusion Coefficients of the Ternary System α -Cyclodextrin–Sodium Benzenesulfonate–Water at 25 °C: The Effect of Chemical Equilibrium and Complex Formation on the Diffusion Coefficients of a Ternary System*”, J. Phys. Chem. B, 102 (1998) 5023-5028.
- [75] Leaist D. G., “*Coupled Tracer Diffusion Coefficients of Solubilizates in Ionic Micelle Solutions from Liquid Chromatography*”, J. Sol. Chem., 20 (2) (1991) 175-186.
- [76] Leaist D. G., “*Ternary diffusion coefficients of 18-crown-6 ether–KCl–water by direct least-squares analysis of Taylor dispersion measurements*”, J. Chem. Soc. Faraday Trans., 87 (1991) 597-601.
- [77] Leaist D. G., “*Simplified theory of diffusion of mixed electrolytes with simultaneous chemical reactions. Application to glycine + HCl + H₂O mixtures*”, J. Chem. Soc. Faraday Trans. I, 78 (1982) 3069-3079.
- [78] Hartley G. S., Crank J., “*Some fundamental definitions and concepts in diffusion processes*”, Trans. Faraday Soc., 45 (1949) 801-818.

- [79] Miller D. G., Albright J. G., “*Measurements of the transport properties of fluids: experimental thermodynamics*”, in Wakeham W. A., Nagashima A., Sengers J. V. (eds), Blackwell, Oxford (1991).
- [80] Cussler E. L., *Diffusion Mass Transfer In Fluid Systems*, University of Minnesota (1984).
- [81] Loh W., “*A técnica de dispersão de Taylor para estudos de difusão em líquidos e suas aplicações*”, Quimica Nova, 20 (5) (1997) 541-545.
- [82] Leaist D. G., “*Determination of Ternary Diffusion Coefficients by the Taylor Dispersion Method*”, J. Phys. Chem., 94 (1990) 5180-5183.
- [83] Callendar R., Leaist D. G., “*Diffusion Coefficients for Binary, Ternary and Polydisperse Solutions from Peak Width Analysis of Taylor Dispersion Profiles*”, J. Sol. Chem., 35 (3) (2006) 353-379.
- [84] Saltzman W. M., “*Drug Delivery- Engineering principles for drug therapy*”, Oxford University Press (2001).
- [85] Cesaro A., Russo E., Crescenzi V., “*Thermodynamics of caffeine aqueous solutions*”, J. Phys. Chem., 80 (1976) 335-339.
- [86] Falk M., Gil M., Iza N., “*Self-association of caffeine in aqueous solution: an FT-IR study*”, Can. J. Chem., 68 (1990) 1293–1299.
- [87] Franks F., Smith H. T., “*Volumetric properties of alcohols in dilute aqueous solutions*”, Trans. Faraday Soc., 64 (1968) 2962-2972.
- [88] Franks F., Smith H. T., “*Precision densities of dilute aqueous solutions of the isomeric butanols*”, J. Chem. Eng. Data, 13 (1968) 538-541.
- [89] Franks F., Desnoyers J. E., in “*Water Science Review*”, N. 1. F. Franks and J.E. Desnoyers, Eds., Cambridge Univ. Press (1985) 171-232.
- [90] Frank H. S., Evans M. W., “*Free volume and entropy in condensed systems. III. Entropy in binary liquid mixtures; partial molal entropy in dilute solutions; structure and thermodynamics in aqueous electrolytes*”, J. Chem. Phys., 13 (1945) 507-532.
- [91] Keronei P. K., “*Intermolecular Interactions in Aqueous Binary Mixtures of Non-electrolytes*”. Thesis, University of Auckland, New Zealand, (1995)
<http://researchspace.auckland.ac.nz>
- [92] Franks F., Reid D. S., in “*Water: A Comprehensive Treatise*”, Vol. 2. F. Franks, Ed. Plenum Press, New York (1973) 330-374.

- [93] Sinha B., Roy P. K., Sarkar B. K., Brahman D., Roy M. N., “*Apparent molar volumes and viscosity B-coefficients of caffeine in aqueous thorium nitrate solutions at $T = (298.15, 308.15$ and $318.15) K$* ”, J. Chem. Thermodyn., 42 (2010) 380-386.
- [94] Price W. E., Trickett K. A., Harris K. R., “*Association of caffeine in aqueous solution. Effects on caffeine intradiffusion*”, J. Chem. Soc. Faraday Trans. I, 85 (1989) 3281-3288.
- [95] Zhao H., “*Viscosity B-coefficients and standard partial molar volumes of amino acids, and their roles in interpreting the protein (enzyme) stabilization*”, Biophys. Chem., 122 (2006) 157–183.
- [96] Thompson P. T., Fisher B., Wood R. H., “*Viscosities of Solutions of Electrolytes and Non-Electrolytes in Ethylene Carbonate at 40 °C*”, J. Sol. Chem., 11 (1982) 1-15.
- [97] Nishijo J., Yonetani I., Tagahara K., Suzuta Y., Iwamoto E., “*Influence of temperature and ionization on self association of theophylline in aqueous solution. Studies by $^1\text{-HRMN}$* ”, Chem. Pharm. Bull., 34 (11) (1986) 4451-4456.
- [98] Paduano L., Sartorio R., Vitagliano V., Costantino L., “*Diffusion properties of cyclodextrins in aqueous solution at 25° C*”, J. Sol. Chem., 19 (1990) 31-39.
- [99] Nightingale E. R., in “*Chemical Physics of electrolyte solutions*”, B.E. Conway and R.G. Barradas, Eds., Wiley, New York, (1966) 87.
- [100] Milioto S., Bakshi M. S., Crisantino R., De Lisi R., “*Thermodynamic properties of water- β -cyclodextrin-dodecylsurfactant ternary systems*”, J. Sol. Chem., 24 (2) (1995) 103-120.
- [101] Stezowski J. J., Jogun K. H., Eckle E., Bartels K., “*Dimeric β -cyclodextrin complexes may mimic membrane diffusion transport*”, Nature, 274 (1978) 617-619.
- [102] Marcus Y., “*Effect of ions on the structure of water: Structure making and breaking*”, Chem. Rev., 109 (2009) 1346-1370.
- [103] Castronuovo G., Niccoli M., “*The influence of cosolvents on hydrophilic and hydrophobic interactions. Calorimetric studies of parent and alkylated cyclomaltooligosaccharides in concentrated aqueous solutions of ethanol or urea*”, Carbohydrate Research, 343 (16) (2008) 2771–2775.
- [104] Ribeiro A. C. F., Leais D. G., Lobo V. M. M., Estes M. A., Valente A. J. M., Santos C. I. A.V., Cabral A. M. T. D. P. V., Veiga F. J. B., “*Binary mutual diffusion coefficients of aqueous solutions of β -cyclodextrin at temperatures from 298.15 K to 312.15 K*”, J. Chem. Eng. Data, 51 (2006) 1368-1371.
- [105] Glasstone S., Laidler K. J., Eyring H., “*Theory of Rate Processes*”, McGraw-Hill, New York (1941) chp. 9.

- [106] Longworth. L. G., “*Temperature dependence of diffusion in aqueous solutions*”, J. Phys. Chem., 58 (1954) 770-773.
- [107] Evans D. F., Tominaga T., Chan C., “*Diffusion of symmetrical and spherical solutes in protic, aprotic and hydrocarbon solvents*”, J. Sol. Chem., 8 (1979) 461-478.
- [108] Ribeiro A. C. F., Valente A. J. M., Santos C. I. A. V., Prazeres P. M. R. A., Lobo V. M. M., Burrows H. D., Estes M. A., Cabral A. M. T. D. P. V., Veiga F. J. B., “*Binary mutual diffusion coefficients of aqueous solutions of α -cyclodextrin, 2-hydroxypropyl- α -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin at temperatures from 298.15 to 312.15 K*”, J. Chem. Eng. Data, 52 (2007) 586-590.
- [109] Wei Y. L., Ding L. H., Dong C., Niu W. P., Shuang, S. M., “*Study on inclusion complex of cyclodextrin with methyl xanthine derivatives by fluorimetry*”, Spectrochim. Acta, Part A., 59 (2003) 2697-2703.
- [110] Terekhova I. V., Kulikov O. V., “*Calorimetric study of the molecular recognition of nucleic acid bases by β -cyclodextrin in aqueous solution*”, Mendeleev Commun., 12 (2002) 245-246.
- [111] Terekhova I. V., Kumeev R. S., Alper G. A., “*The interaction of caffeine with substituted cyclodextrins in water*”, Russian J. Phys. Chem. A, 81 (2007) 1071-1075.
- [112] Krishnamoorthy R., Mitra A. K., “*Complexation of weak acids and bases with cyclodextrins: Effects of substrate ionization on the estimation and interpretation of association constants*”, Int. J. Pharm. Adv., 1 (3) (1996) 329.
- [113] Aicart E., Junquera E., “*Complex formation between purine derivatives and cyclodextrins: a fluorescence spectroscopy study*”, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem., 47 (2003) 161-165.
- [114] Pina M. E., Veiga F., “*The influence of diluent on the release of theophylline from hydrophilic matrix tablets*”, Drug Dev. Ind. Pharm., 26 (10) (2000) 1125-1128.
- [115] Terekhova I. V., Volkova T. V., Perlovich G.L., “*Interactions of theophylline with cyclodextrins in water*”, Mendeleev Commun., 17 (2007) 244–246.
- [116] Friedman H. L., Krishnan C. V., “*Water: a Comprehensive Treatise*”, in: F. Franks (Ed.), Vol. 3, Plenum Press, New York (1973) chp. 1.
- [117] Bhat R., Kishore N., Ahluwalia J. C., J. Chem. Soc. Faraday Trans I, 88 (1988) 2651-2665.
- [118] Rekharsky M. V., Inoue Y., “*Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins*”, Chem. Rev., 98 (1998) 1875-1917.

- [119] Wilson L. D., Verrall R. E., "A Volumetric Study of Cyclodextrin- α,ω -Alkyl Dicarboxylate Anion Complexes in Aqueous Solutions", *J. Phys. Chem. B*, 104 (2000) 1880-1886.
- [120] Wilson L. D., Verrall R. E., "A Volumetric Study of β -cyclodextrin/Hydrocarbon and β -Cyclodextrin/Fluorocarbon Surfactant Inclusion Complexes in Aqueous Solutions", *J. Phys. Chem. B*, 101 (1997) 9270-9279.
- [121] Spildo K., Hoiland H., "Complex Formation Between Alkane- α,ω -Diols and Cyclodextrins Studied by Partial Molar Volume and Compressibility Measurements", *J. Sol. Chem.*, 31 (2002) 149-164.
- [122] Gianni P., Lepori L., "Partial Molar Volumes of Ionic and Nonionic Organic Solutes in Water: A Simple Additivity Scheme Based on the Intrinsic Volume Approach", *J. Sol. Chem.*, 29 (2000) 405-447.
- [123] Zhao C., Ma P., Li J., "Partial molar volumes and viscosity B-coefficients of arginine in aqueous glucose, sucrose and L-ascorbic acid solutions at $T = 298.15\text{ K}$ ", *J. Chem. Thermodynamics*, 37 (2005) 37-42.
- [124] Ribeiro A. C. F., Santos C. I. A. V., Lobo V. M. M., Cabral A. M. T. D. P. V., Veiga F. J. B., Estes M. A., "Diffusion coefficients of the ternary system β -Cyclodextrin + caffeine + water at 298.15 K ", *J. Chem. Eng. Data*, 54 (2009) 115-117.
- [125] Ribeiro A. C. F., Santos C. I. A. V., Lobo V. M. M., Cabral A. M. T. D. P. V., Veiga F. J. B., Estes M. A., "Interactions between 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and Caffeine as seen by Diffusion at 25°C ", *J. Chem. Thermodynamics*, 41 (2009) 1324-1328.
- [126] Ribeiro A. C. F., Santos C. I. A. V., Lobo V. M. M., Estes M. A., "Diffusion of caffeine in different aqueous media at physiological temperature", to be published in "Food and Nutritional Components in Focus", Royal Society of Chemistry (2012)
- [127] Horiuchi Y., Abe K., Hirayama F., Uekama K., "Release control of theophylline by β -cyclodextrin derivatives: hybridizing effect of hydrophilic, hydrophobic and ionizable β -cyclodextrin complexes", *J. Control. Release*, 15 (2) (1991) 177-183.
- [128] Ammar H. O., Ghorab M., El-nahhas S. A., Omar S. M., Ghorab M. M., "Improvement of some pharmaceutical properties of drugs by cyclodextrin complexation. 5. Theophylline", *Pharmazie*, 51 (1) (1996) 42-46.
- [129] Santos C. I. A. V., Estes M. A., Sartorio R., Ortona O., Sobral A. J. N., Arranja C. T., Lobo V. M. M., Ribeiro A. C. F., "A Comparison between the Diffusion Properties of Theophylline/ β -Cyclodextrin and Theophylline/2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin in Aqueous Systems", *J. Chem. Eng. Data*, Article ASAP (2012).

- [130] Mochida K., Kagita A., Matsui Y., Date Y., “*Effects of Inorganic Salts on the Dissociation of a Complex of β -Cyclodextrin with an Azo Dye in an Aqueous Solution*”, Bull. Chem. Soc. Jpn., 46 (1973) 3703–3707.
- [131] Dey J., Roberts E. L., Warner I. M., “*Effect of Sodium Perchlorate on the Binding of 2-(4'-Aminophenyl)- and 2-(4'-(N,N'-Dimethylamino)phenyl)benzothiazole with β -Cyclodextrin in Aqueous Solution*”, J. Phys. Chem. A, 102 (1998) 301–305.
- [132] Yi Z., Zhao C., Huang Z., Chen H. Y., “*Investigation of buffer-cyclodextrin systems*”, Phys. Chem. Chem. Phys., 1 (1999) 441–444.
- [133] Maaieh A. Al., Flanagan D. R., “*Salt effects on caffeine solubility, distribution and self association*”, J. Pharm. Sci., 91 (2002) 1000-1008.
- [134] Nafisi S., Monajemi M., Ebrahimi S., “*The effects of mono- and divalent metal cations on the solution structure of caffeine and theophylline*”, J. Mol. Struct., 705 (2004) 35-39.
- [135] Santos C. I. A. V., Lobo V. M. M., Estes M. A., Ribeiro, A. C. F., “*Effect of Potassium Chloride on Diffusion of Theophylline at $T = 298.15\text{ K}$* ”, J. Chem. Thermodynamics, 43 (2011) 873-875.
- [136] Tu A. T., Reinoso J. A., “*The Interaction of Silver Ion with Guanosine, Guanosine Monophosphate, and Related Compounds. Determination of Possible Sites of Complexing*”, Biochemistry, 5 (1966) 3375-3383.
- [137] Mochida K., Kagita A., Matsui Y., Date Y., “*Effects of Inorganic Salts on the Dissociation of a Complex of β -Cyclodextrin with an Azo Dye in an Aqueous Solution*”, Bull. Chem. Soc. Jpn., 46 (1973) 3703.
- [138] Matsui Y., Ono M., Tokunaga S., “*NMR Spectroscopy of Cyclodextrin–Inorganic Anion Systems*”, Bull. Chem. Soc. Jpn., 70 (1997) 535-541.
- [139] Sanemasa I., Fujiki M., Deguchi T., “*A new method for determining cyclodextrin complex formation constants with electrolytes in aqueous medium*”, Bull. Chem. Soc. Jpn., 61 (1998) 2663-2665.
- [140] Kano K., Tanaka N., Minamizono H., Kawakita Y., “*Tetraarylporphyrins as Probes for Studying Mechanism of Inclusion-complex Formation of Cyclodextrins. Effect of Microscopic Environment on Inclusion of Ionic Guests*”, Chem. Lett., 25 (11) (1996) 925-926.

Anexo I

Programas de adquisición y tratamiento de
datos

1. Programa de adquisición de datos

Programa 1DET

```

10 LOAD BIN "HPIBS;DEV hpi7 TIME 3"
20 PRINT " PROGRAM 1DET:"
30 PRINT " *****"
40 PRINT " "
50 PRINT "COLLECT TAYLOR DISPERSION DATA
FROM ONE DETECTOR ONLY"
60 PRINT " "
70 OPTION BASE 1
80 ! SEPARATE ALPHA FROM GRAPHICS
90 REAL
V(9000),T(9000),Dt,T0,Ti,Xmin1,Xmax1,Ymin1,Ymax1
,Xp,Yp
100 REAL
Vi(50),Vj(4,50),Tj(4,50),Xmina(4),Xmaxa(4),Ymina(4),Y
maxa(4)
110 INTEGER
Npl,Nav,Ndisc,Nd,I,J,Jend,Np,Jmin1,Ndi(4),Jmax1,Na
vt,li
120 !
130 PRINT " "
140 PRINT " ***** PUT DATA DISC IN RIGHT-
HAND DRIVE ****"
150 PRINT " "
160 MASS STORAGE IS "C:\DATA"
170 PRINT " "
180 PRINT "TYPE DATE (E.G. WED01MAY1990)"
190 PRINT " "
200 INPUT B$
210 Ndi(1)=1
220 GOTO 360
230 Ndi(2)=0
240 Ndi(3)=0
250 Ndi(4)=0
260 !
270 ! USE DETECTOR 1?
280 !
290 PRINT " "
300 PRINT "TYPE J = 1 TO TAKE READINGS
FROM DETECTOR 1 (CHANNEL 400)"
310 PRINT " "
320 INPUT Ndi(1)
330 IF Ndi(1)=1 THEN GOTO 360
340 Ndi(1)=0
350 GOTO 480
360 PRINT " "
370 PRINT "NAME OF DATA FILE FOR DETECTOR
1 (E.G. 01MAY)"
380 PRINT " "
390 INPUT F1$
400 PRINT " "
410 PRINT "TYPE TITLE OF FILE FOR DETECTOR
1 (E.G. 1.0MNACL-401)"
420 PRINT " "
430 INPUT T1$
440 GOTO 1020
450 !
460 ! USE DETECTOR 2?
470 !
480 PRINT " "
490 PRINT "TYPE J = 1 TO TAKE READINGS
FROM DETECTOR 2 (CHANNEL 403)"
500 PRINT " "
510 INPUT Ndi(2)
520 IF Ndi(2)=1 THEN GOTO 550
530 Ndi(2)=0
540 GOTO 670
550 PRINT " "
560 PRINT "TYPE NAME OF DATA FILE FOR
DETECTOR 2 (E.G. 01MAY)"
570 PRINT " "
580 INPUT F2$
590 PRINT " "
600 PRINT "TYPE TITLE OF FILE FOR DETECTOR
2 (E.G. 1.0MNACL-430)"
610 PRINT " "
620 INPUT T2$
630 GOTO 1020
640 !
650 ! USE DETECTOR 3?
660 !
670 PRINT " "
680 PRINT "TYPE J = 1 TO TAKE READINGS
FROM DETECTOR 3 (CHANNEL 406)"
690 PRINT " "
700 INPUT Ndi(3)
710 IF Ndi(3)=1 THEN GOTO 750
720 Ndi(3)=0
730 GOTO 870
740 PRINT " "
750 PRINT "TYPE NAME OF DATA FILE FOR
DETECTOR 3 (E.G. 01MAY)"
760 PRINT " "
770 INPUT F3$
780 PRINT " "
790 PRINT "TYPE TITLE OF FILE FOR DETECTOR
3 (E.G. 1.0MNACL-1847A)"
800 PRINT " "
810 INPUT T3$
820 PRINT " "
830 GOTO 1020
840 !
850 ! USE DETECTOR 4?
860 !
870 PRINT " "
880 PRINT "TYPE J = 1 TO TAKE READINGS
FROM DETECTOR 4 (CHANNEL 409)"
890 PRINT " "
900 INPUT Ndi(4)
910 IF Ndi(4)=1 THEN GOTO 950
920 Ndi(4)=0
930 GOTO 1030
940 PRINT " "
950 PRINT "TYPE NAME OF DATA FILE FOR
DETECTOR 4 (E.G. 01MAY)"
960 PRINT " "
970 INPUT F4$
980 PRINT " "
990 PRINT "TYPE TITLE OF FILE FOR DETECTOR
4 (E.G. 1.0MNACL-410)"
1000 PRINT " "
1010 INPUT T4$
1020 !
1030 ON KEY 8 LABEL "END RUN" GOSUB Endit
1040 IF Ndi(1)=0 THEN GOTO 1110
1050 CREATE F1$,1
1060 ASSIGN @Path_1 TO F1$;FORMAT ON
1070 ! CONTROL @Path_1;9;0
1080 OUTPUT @Path_1;T1$
1090 OUTPUT @Path_1;B$
1100 ON KEY 1 LABEL "INJ DET 1" GOSUB Tzer1
1110 IF Ndi(2)=0 THEN GOTO 1170
1120 CREATE BDAT F2$,250,128
1130 ASSIGN @Path_2 TO F2$
1140 OUTPUT @Path_2;T2$
1150 OUTPUT @Path_2;B$
1160 ON KEY 6 LABEL "INJ DET 2" GOSUB Tzer2
1170 IF Ndi(3)=0 THEN GOTO 1230
1180 CREATE BDAT F3$,250,128
1190 ASSIGN @Path_3 TO F3$
1200 OUTPUT @Path_3;T3$
1210 OUTPUT @Path_3;B$
1220 ON KEY 7 LABEL "INJ DET 3" GOSUB Tzer3
1230 IF Ndi(4)=0 THEN GOTO 1290
1240 CREATE BDAT F4$,250,128
1250 ASSIGN @Path_4 TO F4$
1260 OUTPUT @Path_4;T4$
1270 OUTPUT @Path_4;B$
1280 ON KEY 8 LABEL "INJ DET 8" GOSUB Tzer4
1290 !
1300 ! NDISC = NO. OF POINTS READ TO DISC
PER BATCH
1310 ! NPL = MINIMUM NO. OF POINTS
PLOTTED
1320 ! NAV = NO. OF READINGS AVERAGED
PER POINT
1330 ! DT = WAITING TIME WHILE
VOLTMETER IS IDLE
1340 !
1350 Ndisc=25 ! OR 10 OR 25 OR 100
1360 Npl=10
1370 J=Ndi(1)+Ndi(2)+Ndi(3)+Ndi(4) ! J = NUMBER
OF ACTIVE DETECTORS
1380 IF J<1 THEN GOTO 4140

```

```

1390 IF J>1 THEN GOTO 4140
1400 IF J=1 THEN Dt=8.
1410 IF J=1 THEN Nav=5
1420 IF J=2 THEN Dt=1.
1430 IF J=2 THEN Nav=16
1440 IF J=3 THEN Dt=1.
1450 IF J=3 THEN Nav=10
1460 IF J=4 THEN Dt=1.
1470 IF J=4 THEN Nav=10
1480 IF J>4 THEN GOTO 4140
1490 PRINT " "
1500 PRINT "WAIT TIME/S, NO. TO DISC, MIN. NO.
PLOTTED, NO. AVGD, NO. DET"
1510 PRINT " "
1520 PRINT Dt,Ndisc,Npl,Nav-2,J
1530 PRINT " "
1540 !
1550 !                               SET UP DIGITAL
VOLTMETER
1560 !
1570 !OUTPUT 709;"CRESET 1,2,3,4"
1580 !OUTPUT 709;"CMON 4"
1590 ASSIGN @Dmm TO 722
1600 PRINT "CLEAR DVM AND HP-IB"
1610 CLEAR 7
1620 OUTPUT @Dmm;"RST"
1630 WAIT 1
1640 !PRINT "SEND CONF:VOLT:DC"
1650 !OUTPUT @Dmm;"CONF:VOLT:DC"
1660 !OUTPUT @Dmm;"VOLT:DC:NPLC 100"
1670 T0=TIMEDATE
1680 Nd=0
1690 Jend=-1
1700 I=0
1710 PRINT " "
1720 !
1730 !                               START TAKING READINGS
1740 !
1750 IF Jend>0 THEN GOTO 3650
1760 !
1770 I=I+1
1780 Nd=Nd+1
1790 Nav=1
1800 !
1810 FOR Ii=1 TO 4
1820 !PRINT " I, ND, Ii: ",I,Nd,Ii
1830 !
1840 IF Ndi(Ii)=0 THEN GOTO 3360
1850 !
1860 !IF Ii=1 THEN OUTPUT 709;"CLOSE 400"
1870 !IF Ii=2 THEN OUTPUT 709;"CLOSE 403"
1880 !IF Ii=3 THEN OUTPUT 709;"CLOSE 406"
1890 !IF Ii=4 THEN OUTPUT 709;"CLOSE 409"
1900 WAIT 1
1910 !
1920 Ti=TIMEDATE-T0
1930 FOR J=1 TO Nav
1940 OUTPUT @Dmm;"RST",
1950 OUTPUT @Dmm;"CLS"
1960 OUTPUT @Dmm;"CONF:VOLT:DC"
1970 OUTPUT @Dmm;"VOLT:DC:NPLC 100"
1980 OUTPUT @Dmm;"MEASURE:VOLT:DC?
10.V.,00001V"
1990 ENTER @Dmm;Vi(J)
2000 NEXT J
2010 Ti=.5*(TIMEDATE-T0+Ti)
2020 Tj(Ii,Nd)=Ti
2030 T(I)=Ti
2040 !
2050 !IF Ii=1 THEN OUTPUT 709;"OPEN 400"
2060 !IF Ii=2 THEN OUTPUT 709;"OPEN 403"
2070 !IF Ii=3 THEN OUTPUT 709;"OPEN 406"
2080 !IF Ii=4 THEN OUTPUT 709;"OPEN 409"
2090 !
2100 !                               TAKE AVERAGE OF NAV
READINGS
2110 !                               (WITH THE LOWEST AND HIGHEST
VALUES DELETED)
2120 !
2130 Xmax1=-1.E+100
2140 Xmin1=1.E+100
2150 !
2160 FOR J=1 TO Nav
2170 IF Vi(J)<Xmin1 THEN Jmin1=J
2180 IF Vi(J)<Xmin1 THEN Xmin1=Vi(J)
2190 IF Vi(J)>Xmax1 THEN Jmax1=J
2200 IF Vi(J)>Xmax1 THEN Xmax1=Vi(J)
2210 NEXT J
2220 !
2230 Vj(Ii,Nd)=0.
2240 !
2250 IF I=1 THEN PRINT " "
2260 IF I=1 THEN PRINT "DETECTOR ",Ii
2270 IF I=1 THEN PRINT " "
2280 FOR J=1 TO Nav
2290 IF I=1 THEN PRINT J,Vi(J)
2300 IF J=Jmax1 THEN GOTO 2330
2310 IF J=Jmin1 THEN GOTO 2330
2320 Vj(Ii,Nd)=Vj(Ii,Nd)+Vi(J)
2330 NEXT J
2340 !
2350 Vj(Ii,Nd)=Vj(Ii,Nd)/(Nav-2)
2360 IF Jmax1=Jmin1 THEN Vj(Ii,Nd)=(Nav-
2)*Vj(Ii,Nd)/(Nav-1)
2370 V(I)=Vj(Ii,Nd)
2380 IF I=1 THEN PRINT "AVERAGE (- HI AND LO
VALUES): ",Vj(Ii,Nd)
2390 !
2400 !                               WRITE BATCH OF NDISC
POINTS TO DISC
2410 !
2420 IF Nd<Ndisc THEN GOTO 2770
2430 PRINT " "
2440 PRINT " DATA WRITTEN TO DISC"
2450 PRINT " "
2460 PRINT " I T(I) V(I)"
2470 PRINT " "
2480 IF Ii=1 THEN GOTO 2700
2490 IF Ii=2 THEN GOTO 2640
2500 IF Ii=3 THEN GOTO 2580
2510 !
2520 FOR J=1 TO Ndisc
2530 OUTPUT @Path_4;Tj(4,J),Vj(4,J)
2540 PRINT "> FILE 4: ",Tj(4,J),Vj(4,J)
2550 NEXT J
2560 GOTO 2770
2570 !
2580 FOR J=1 TO Ndisc
2590 OUTPUT @Path_3;Tj(3,J),Vj(3,J)
2600 PRINT "> FILE 3: ",Tj(3,J),Vj(3,J)
2610 NEXT J
2620 GOTO 2770
2630 !
2640 FOR J=1 TO Ndisc
2650 OUTPUT @Path_2;Tj(2,J),Vj(2,J)
2660 PRINT "> FILE 2: ",Tj(2,J),Vj(2,J)
2670 NEXT J
2680 GOTO 2770
2690 !
2700 FOR J=1 TO Ndisc
2710 OUTPUT @Path_1;Tj(1,J),Vj(1,J)
2720 PRINT "> FILE 1: ",Tj(1,J),Vj(1,J)
2730 NEXT J
2740 !
2750 !                               PLOT POINTS
2760 !
2770 IF I<Npl THEN GOTO 3330
2780 FOR J=1 TO 30
2790 PRINT " "
2800 NEXT J
2810 PLOTTER IS 3,"INTERNAL"
2820 GINIT
2830 GRAPHICS OFF
2840 GRAPHICS ON
2850 WINDOW 0,130,0,100
2860 IF I=Npl THEN GOTO 3070
2870 !
2880 IF Ii=1 THEN PRINT T1$
2890 IF Ii=2 THEN PRINT T2$
2900 IF Ii=3 THEN PRINT T3$
2910 IF Ii=4 THEN PRINT T4$
2920 PRINT " "
2930 PRINT "DETECTOR ",Ii
2940 PRINT " "
2950 PRINT "POINT ",I
2960 PRINT " "
2970 PRINT "TIME ",Ti
2980 PRINT " "
2990 PRINT " ",Vj(Ii,Nd)," VOLTS"
3000 PRINT " "
3010 !
3020 IF Ti<Xmina(Ii) THEN Xmina(Ii)=Ti
3030 IF Ti>Xmaxa(Ii) THEN Xmaxa(Ii)=Ti
3040 IF Vj(Ii,Nd)<Ymina(Ii) THEN Ymina(Ii)=Vj(Ii,Nd)
3050 IF Vj(Ii,Nd)>Ymaxa(Ii) THEN Ymaxa(Ii)=Vj(Ii,Nd)
3060 GOTO 3180
3070 !
3080 Xmaxa(Ii)=-1.E+100
3090 Xmina(Ii)=1.E+100
3100 Ymina(Ii)=1.E+100
3110 Ymaxa(Ii)=-1.E+100
3120 FOR J=1 TO I
3130 IF Tj(Ii,J)<Xmina(Ii) THEN Xmina(Ii)=Tj(Ii,J)
3140 IF Tj(Ii,J)>Xmaxa(Ii) THEN Xmaxa(Ii)=Tj(Ii,J)
3150 IF Vj(Ii,J)<Ymina(Ii) THEN Ymina(Ii)=Vj(Ii,J)
3160 IF Vj(Ii,J)>Ymaxa(Ii) THEN Ymaxa(Ii)=Vj(Ii,J)
3170 NEXT J
3180 Scxa=129./(Xmaxa(Ii)-Xmina(Ii))
3190 Scya=79./(Ymaxa(Ii)-Ymina(Ii))
3200 FOR J=1 TO I

```

```

3210 Xp=Scxa*(T(J)-Xmina(li))
3220 Yp=20.+(Scya*(V(J)-Ymina(li)))
3230 MOVE Xp,Yp
3240 PLOT Xp,Yp
3250 NEXT J
3260 !
3270 !IF I<3000 THEN GOTO 3160
3280 GOTO 3360
3290 FOR J=1 TO 1000-Ndisc
3300 V(J)=V(J+Ndisc)
3310 NEXT J
3320 !
3330 PRINT " "
3340 PRINT "FROM DETECTOR ",li," Tl = ",Tj(li,Nd),"
VI = ",Vj(li,Nd)
3350 PRINT " "
3360 NEXT li
3370 !
3380 IF Nd<Ndisc THEN GOTO 3490
3390 Nd=0
3400 !IF I<1000 THEN GOTO 3280
3410 GOTO 3490
3420 !
3430 FOR J=1 TO 1000-Ndisc
3440 T(J)=T(J+Ndisc)
3450 NEXT J
3460 !
3470 I=1000-Ndisc
3480 !
3490 WAIT Dt*.1
3500 WAIT Dt*.1
3510 WAIT Dt*.1
3520 WAIT Dt*.1
3530 WAIT Dt*.1
3540 WAIT Dt*.1
3550 WAIT Dt*.1
3560 WAIT Dt*.1
3570 WAIT Dt*.1
3580 WAIT Dt*.1
3590 GOTO 1750
3600 !
3610 !
3620 !           CLOSE DOWN
3630 !           WRITE REMAINING POINTS TO
DISC, WITH -9999 AT END OF FILES
3640 !
3650 PRINT " "
3660 PRINT "POINTS WRITTEN TO DISC:"

3670 PRINT " "
3680 !
3690 Xp=-9999.
3700 !
3710 IF Ndi(1)=0 THEN GOTO 3790
3720 FOR J=1 TO Nd
3730 OUTPUT @Path_1;Tj(1,J),Vj(1,J)
3740 PRINT "TO FILE 1: ",Tj(1,J),Vj(1,J)
3750 NEXT J
3760 OUTPUT @Path_1;Xp,Xp
3770 ASSIGN @Path_1 TO *
3780 !
3790 IF Ndi(2)=0 THEN GOTO 3870
3800 FOR J=1 TO Nd
3810 OUTPUT @Path_2;Tj(2,J),Vj(2,J)
3820 PRINT "TO FILE 2: ",Tj(2,J),Vj(2,J)
3830 NEXT J
3840 OUTPUT @Path_2;Xp,Xp
3850 ASSIGN @Path_2 TO *
3860 !
3870 IF Ndi(3)=0 THEN GOTO 3950
3880 FOR J=1 TO Nd
3890 OUTPUT @Path_3;Tj(3,J),Vj(3,J)
3900 PRINT "TO FILE 3: ",Tj(3,J),Vj(3,J)
3910 NEXT J
3920 OUTPUT @Path_3;Xp,Xp
3930 ASSIGN @Path_3 TO *
3940 !
3950 IF Ndi(4)=0 THEN GOTO 4140
3960 FOR J=1 TO Nd
3970 OUTPUT @Path_4;Tj(4,J),Vj(4,J)
3980 PRINT "TO FILE 4: ",Tj(4,J),Vj(4,J)
3990 NEXT J
4000 OUTPUT @Path_4;Xp,Xp
4010 ASSIGN @Path_4 TO *
4020 !
4030 GOTO 4140
4040 Tzer1: OUTPUT @Path_1;-99.,TIMEDATE-T0
4050 RETURN
4060 Tzer2: OUTPUT @Path_2;-99.,TIMEDATE-T0
4070 RETURN
4080 Tzer3: OUTPUT @Path_3;-99.,TIMEDATE-T0
4090 RETURN
4100 Tzer4: OUTPUT @Path_4;-99.,TIMEDATE-T0
4110 RETURN
4120 Endit: Jend=1
4130 RETURN
4140 END

```

2. Programa de tratamiento de datos binarios

Programa FIT4D

```

10 !           FIT.BAS
20 !           *****
30 !
40 !           FIT TAYLOR PEAKS TO DETERMINE
BINARY DIFFUSION COEFFICIENTS
50 !
60 OPTION BASE 1
70                                     REAL
V(5100),T(5100),A(5),R,Xn,Yn,Tz(100),L,Flwrt,D0,Tr0,
X(1000),Y(1000)
80                                     REAL
B(5,5),C(5),Da(5),Sdev,Ex,Bi(5,5),Xmin,Xmax,Ymin,Y
max,Dev,Yc(1000)
90 INTEGER I,J,K,Lz,lp,lmin,lmax,N
100 !
101 !SEPARATE ALPHA FROM GRAPHICS
102 MERGE ALPHA WITH GRAPHICS
110 PRINT " "
120 PRINT " ***** PUT DATA DISC IN RIGHT-
HAND DRIVE *****"
130 PRINT " "
140 MASS STORAGE IS "A:"
150 PRINT " TYPE NAME OF DATA FILE (E.G.
BE10)"
160 INPUT Vtt$
170 ASSIGN @Path_1 TO Vtt$,FORMAT ON
180 PRINT " "
190 ENTER @Path_1;At$
200 ENTER @Path_1;Ct$
210 PRINT " "
220 PRINT "DATA TITLE: ",At$
230 PRINT " "
240 PRINT Ct$
250 PRINT " "
251 PRINT "TYPE MAX. POINT NUMBER IF
NEEDED ( 0 OTHERWISE):"
252 PRINT " "
253 INPUT lmax
254 IF lmax<1 THEN lmax=20000
260 lz=0
270 l=0
280 l=l+1
290 ENTER @Path_1;T(l),V(l)
291 IF l>lmax THEN T(l)=-9999.
300 IF T(l)>0. THEN GOTO 280
310 IF T(l)<-1000. THEN GOTO 360
320 lz=lz+1
330 Tz(lz)=V(l)
340 l=l-1
350 GOTO 280
360 lp=1
370 ASSIGN @Path_1 TO *
380 IF lz>0 THEN GOTO 640
390 PRINT " "
400 PRINT " TYPE NAME OF TIME ZERO FILE
(E.G. BE10Z)"
410 PRINT " "
420 INPUT Vttz$
430 ASSIGN @Path_2 TO Vttz$
440 !
450 ENTER @Path_2;Bt$
460 ENTER @Path_2;Td$
470 PRINT " "
480 PRINT "DATA TITLE: ",Bt$
490 PRINT " "
500 PRINT Td$
510 PRINT " "
520 !           READ INJECTION TIMES
530 !
540 lz=0
550 PRINT " I           T(INJECTION)"
560 PRINT " "
570 FOR l=1 TO 100
580 ENTER @Path_2;Tz(l)
590 PRINT I,Tz(l)
600 IF Tz(l)<0. THEN GOTO 630
610 lz=lz+1
620 NEXT I
630 ASSIGN @Path_2 TO *
640 PRINT " "
650 PRINT "THERE ARE ",lp," POINTS AND ",lz,"
INJECTIONS"
660 PRINT " "
670 !
680 PRINT "TYPE TUBE LENGTH/CM, RADIUS/CM,
RETENTION TIME/CM "
681 PRINT " "
682 PRINT "ASSUMING 2 CM/HR CHART SPEED"
683 PRINT " "
690 PRINT " "
700 PRINT "E.G. 3117., 0.04515, 11.3"
710 PRINT " "
720 INPUT L,R,Flwrt
730 lTr0=3.141592654*60.*R*L/Flwrt
731 Tr0=Flwrt*3600/2.
732 Flwrt=3.141592654*R*L*60./Tr0
740 PRINT " "
750 PRINT "LENGTH, RADIUS, FLOW RATE,
RETENTION TIME "
760 PRINT " "
770 PRINT L,R,Flwrt,Tr0
780 PRINT " "
790 !
800 !           PLOT POINTS IMIN TO
IMAX
810 !
820 PRINT "TYPE IMIN, IMAX TO PLOT POINTS IN
THIS RANGE (IMIN < 0 TO EXIT)"
830 PRINT " (THERE ARE ",lp," POINTS)"
840 PRINT " "
850 INPUT lmin,lmax
860 PRINT " "
870 IF lmin>lmax THEN GOTO 820
880 IF lmax>lp THEN GOTO 820
890 IF lmin<0 THEN GOTO 1300
900 FOR J=1 TO 30
910 PRINT " "
920 NEXT J
930 PRINT At$
940 PRINT Ct$
950 PRINT "POINTS ",lmin," TO ",lmax
960 PLOTTER IS 3,"INTERNAL"
970 GINIT
980 GRAPHICS OFF
990 GRAPHICS ON
1000 WINDOW 0,130,0,100
1010 Xmax=-1.E+100
1020 Xmin=1.E+100
1030 Ymin=1.E+100
1040 Ymax=-1.E+100
1050 FOR J=lmin TO lmax
1060 IF T(J)<Xmin THEN Xmin=T(J)
1070 IF T(J)>Xmax THEN Xmax=T(J)
1080 IF V(J)<Ymin THEN Ymin=V(J)
1090 IF V(J)>Ymax THEN Ymax=V(J)
1100 NEXT J
1110 Scx=129./(Xmax-Xmin)
1120 Scy=40./(Ymax-Ymin)
1130 FOR J=lmin TO lmax
1140 Xp=Scx*(T(J)-Xmin)
1150 Yp=40.+(Scy*(V(J)-Ymin))
1160 MOVE Xp,Yp
1170 PLOT Xp,Yp
1180 !PRINT J
1190 NEXT J
1200 PRINT " "
1210 PRINT "POINTS ",lmin," TO ",lmax
1220 PRINT " "
1230 PRINT "TYPE J > 0 TO PLOT MORE POINTS"
1240 PRINT " "
1250 INPUT J
1260 IF J>0 THEN GOTO 820
1270 !
1280 !           FIT CURVE
1290 ! IDENTIFY TIME ZERO:
1300 !
1310 GRAPHICS OFF
1320 PRINT " "
1330 PRINT "TO SHOULD BE NEAR ",-
Tr0+(.5*(T(lmin)+T(lmax)))
1340 PRINT " "
1350 PRINT "LIST OF TO VALUES:"
1360 PRINT " "
1370 FOR J=1 TO lz

```

```

1380 PRINT Tz(J)
1390 NEXT J
1400 PRINT " "
1410 PRINT "TYPE T0:"
1420 PRINT " "
1430 INPUT T0
1440 PRINT " "
1450 !
1460 N=lmax-lmin+1
1470 FOR J=lmin TO lmax
1480 l=J-lmin+1
1490 X(l)=T(J)-T0
1500 Y(l)=V(J)
1510 !PRINT J,X(l),Y(l)
1520 NEXT J
1530 !
1540 ! ESTIMATE INITIAL PARAMETER
VALUES
1550 !
1560 PRINT " "
1570 PRINT "TYPE ESTIMATE OF D / 10 E-5 CM2 S-
1 (E.G. 0.5 FOR SUCROSE)"
1580 INPUT D0
1590 PRINT " "
1600 A(5)=(Y(N)-Y(1))*Tr0/(X(N)-X(1))
1610 A(4)=Y(1)-(A(5)*X(1)/Tr0)
1620 A(2)=1.2E-4*D0/(R*R)
1630 !
1640 Ymax=-1.E+100
1650 Ymin=A(4)+A(5)
1660 FOR J=1 TO N
1670 IF (Y(J)-Ymin)^2>Ymax THEN GOTO 1690
1680 GOTO 1710
1690 Jmax=J
1700 Ymax=(Y(J)-Ymin)^2
1710 NEXT J
1720 A(1)=Y(Jmax)-Ymin
1730 A(3)=1.E-5*X(Jmax)
1740 !
1750 PRINT " 1760 !
1770 ! CALCULATE PARAMETER
IMPROVEMENTS
1780 !
1790 Sdev=0.
1800 MAT B=(0)
1810 MAT C=(0)
1820 Da(4)=1.
1830 !
1840 FOR J=1 TO N
1850 Ex=EXP((-A(2))*((X(J)-(1.E+5*A(3)))^2)/X(J))
1860 Dev=Y(J)-A(4)-(A(5)*X(J)/Tr0)-
(A(1)*Ex*SQR(Tr0/X(J)))
1870 Yc(J)=Y(J)-Dev
1880 Sdev=Sdev+(Dev*Dev)
1890 Da(3)=SQR(Tr0/X(J))
1900 Da(1)=Da(3)*Ex
1910 Da(2)=-A(1)*Da(3)*((X(J)-
(1.E+5*A(3)))^2)*Ex/X(J)
1920 Da(3)=Da(3)*A(1)*A(2)*2.E+5*(X(J)-
(1.E+5*A(3)))^2*Ex/X(J)
1930 Da(5)=X(J)/Tr0
1940 !
1950 FOR l=1 TO 5
1960 C(l)=C(l)+(Dev*Da(l))
1970 FOR K=l TO 5
1980 B(l,K)=B(l,K)+(Da(l)*Da(K))
1990 NEXT K
2000 IF l=K THEN GOTO 2010
2010 NEXT l
2020 !
2030 FOR l=2 TO 5
2040 FOR K=1 TO l-1
2050 B(l,K)=B(K,l)
2060 NEXT K
2070 NEXT l
2080 !
2090 NEXT J
2100 !
2110 ! PLOT MEASURED AND
FITTED POINTS
2120 !
2130 FOR l=1 TO 35
2140 PRINT " "
2150 NEXT l
2160 GINIT
2170 PLOTTER IS 3,"INTERNAL"
2180 GRAPHICS ON
2190 WINDOW 0,130,0,100
2200 Xmax=-1.E+100
2210 Xmin=1.E+100
2220 Ymax=-1.E+100
2230 Ymin=1.E+100
2240 FOR J=1 TO N
2250 IF X(J)>Xmax THEN Xmax=X(J)
2260 IF X(J)<Xmin THEN Xmin=X(J)
2270 IF Y(J)>Ymax THEN Ymax=Y(J)
2280 IF Y(J)<Ymin THEN Ymin=Y(J)
2290 NEXT J
2300 Scx=129./(Xmax-Xmin)
2310 Scy=85./(Ymax-Ymin)
2320 FOR J=1 TO N
2330 Xp=Scx*(X(J)-Xmin)
2340 Yp=10.+(Scy*(Y(J)-Ymin))
2350 MOVE Xp-.5,Yp
2360 DRAW Xp+.5,Yp
2370 MOVE Xp,Yp-.5
2380 DRAW Xp,Yp+.5
2390 MOVE Xp-.5,Yp-.5
2400 DRAW Xp+.5,Yp-.5
2410 MOVE Xp+.5,Yp-.5
2420 DRAW Xp+.5,Yp+.5
2430 MOVE Xp+.5,Yp+.5
2440 DRAW Xp-.5,Yp+.5
2450 MOVE Xp-.5,Yp+.5
2460 DRAW Xp-.5,Yp-.5
2470 NEXT J
2480 !
2490 FOR J=1 TO N
2500 Xp=Scx*(X(J)-Xmin)
2510 Yp=(Scy*(Yc(J)-Ymin))+10.
2520 IF J>1 THEN GOTO 2550
2530 MOVE Xp,Yp
2540 GOTO 2560
2550 PLOT Xp,Yp
2560 NEXT J
2570 WAIT 3
2580 GRAPHICS OFF
2590 !
2600 !
2610 Sdev=SQR(Sdev/N)
2620 MAT Bi=INV(B)
2630 MAT Da=Bi*C
2640 PRINT " "
2650 PRINT "PARAMETER CHANGE %
STAND. DEV."
2660 FOR l=1 TO 5
2670 PRINT
l,A(l),Da(l),(SQR(N*Bi(l,l))*Sdev*100/A(l))
2680 NEXT l
2690 PRINT " "
2700 !
2710 !FOR J=1 TO N
2720 !Dev=Y(J)-Yc(J)
2730 !PRINT J,X(J),Y(J),100.*(Y(J)-Yc(J))/A(1)
2740 !NEXT J
2750 PRINT " "
2760 PRINT At$
2770 PRINT Ct$
2780 PRINT " "
2790 PRINT "STANDARD DEVIATION IN VOLTAGE
READINGS (AS % OF MAX VOLTAGE)"
2800 PRINT 100.*Sdev/SQR(A(1)*A(1))
2810 PRINT " "
2820 PRINT " D / 10E-5 CM2 S-1 ",A(2)*R/1.2E-
4
2830 PRINT " "
2840 PRINT "% CHANGE IN D
",100.*Da(2)/A(2)
2850 PRINT " "
2860 PRINT " ST. DEV. (D/10E-5
CM2/S*(SQR(N*Bi(2,2)))*Sdev*100./A(2)
2870 PRINT " "
2880 PRINT "TR0, TR, ST. DEV.(TR) / SEC"
2890 PRINT
Tr0,1.E+5*A(3),1.E+5*Sdev*SQR(N*Bi(3,3))
2900 PRINT " "
2910 PRINT "VMAX, ST. DEV.(VMAX) / VOLT "
2920 PRINT A(1),Sdev*SQR(N*Bi(1,1))
2930 PRINT " "
2940 !
2950 ! ITERATE?
2960 !
2970 PRINT " TYPE J > 0 TO ITERATE"
2980 PRINT " "
2990 INPUT J
3000 IF J<1 THEN GOTO 3060
3010 FOR l=1 TO 5
3020 A(l)=A(l)+Da(l)
3030 NEXT l
3040 GOTO 1790
3050 !
3060 PRINT " "
3070 PRINT " TYPE J > 0 TO PLOT FIT OTHER
POINTS"
3080 PRINT " "
3090 INPUT J
3100 IF J>0 THEN GOTO 820
3110 !
3120 END

```

3. Programa de tratamiento de datos ternarios

Programa DIK03SL

```

10  Mainsub
20  END
30  SUB Mainsub
40  PRINT " "
50  PRINT " "
60  !           DIK03.BAS
70  PRINT " "
80  PRINT " "
90  PRINT " "
100 !
110 PRINT " FIT TAYLOR PEAKS TO DETERMINE TERNARY
DIFFUSION COEFFICIENTS"
120 PRINT " USING EIGENVALUES AND PRE-EXPONENTIAL
FACTORS"
130 PRINT " "
140 PRINT " "
150 !
160 OPTION BASE 1
170 REAL
V(9000),T(9000),Tz(l),L,Flwrt,Tr,Tr0,Sdev,R1,R2,D11,D12,D21,D22
180 REAL
Xmin,Xmax,Ymin,Ymax,M1i,M2i,DD,M1(5),M2(5),TO,F,Fp,Xp,Yp,Ti
190 REAL
B(24,24),C(24),Da(24),A(24),Bi(24,24),X(5,1999),Y(5,1999),Yc(5,1999)
200 REAL
F11,F12,F21,F22,A1,A2,D1,D2,Am(2,2),Ak(2),Ri(2),Ar(5),Ami(2,2)
210 REAL
Ex1,Ex2,A1,W1,W2,Dm(2,2),Cm(2,2),Ymaxx,Sq1,Sq2,Cf,Wd1,Wd2,Wa,Wb
220 REAL Dc1(2),Dc2(2)
230 INTEGER
I,J,K,Lz,lp,lmin,lmax,N,Npk,Nk(5),Kk,Jmax,Jj,Jden,Jcou,lflag
240 !
250 lflag=-1
251 lflagpr=1
260 !SEPARATE ALPHA FROM GRAPHICS
270 PRINT " "
280 PRINT " ***** PUT DATA DISC IN RIGHT-HAND DRIVE ****"
290 PRINT " "
300 MASS STORAGE IS "c:\hpbasic\data"
310 PRINT " "
320 PRINT " TYPE NAME OF DATA FILE (E.G. BE10)"
330 PRINT " "
340 INPUT Vtt$
350 ASSIGN @Path_1 TO Vtt$;FORMAT ON
360 ENTER @Path_1;At$
370 ENTER @Path_1;Ct$
380 PRINT " "
390 PRINT "DATA TITLE ",At$
400 PRINT " "
410 PRINT Ct$
420 PRINT " "
430 !
440 !           READ DATA FROM FILES
450 !
460 lz=0
470 l=0
480 l=l+1
490 ENTER @Path_1;T(l),V(l)
500 !PRINT I
510 IF T(l)>0. THEN GOTO 480
520 IF T(l)<-1000. THEN GOTO 560
530 lz=lz+1
540 Tz(lz)=V(l)
550 GOTO 490
560 lp=l-1
570 ASSIGN @Path_1 TO "
580 IF lz>0 THEN GOTO 810
590 PRINT " "
600 PRINT "TYPE NAME OF TZERO FILE: "
610 PRINT " "
620 INPUT Vttz$
630 ASSIGN @Path_2 TO Vttz$
640 ENTER @Path_2;Bt$
650 ENTER @Path_2;Td$
660 PRINT " "
670 PRINT "DATA TITLE: ",Bt$
680 PRINT " "
690 PRINT Td$
700 PRINT " "
710 lz=0
720 PRINT " I           TZERO(l)"
730 PRINT " "
740 FOR l=1 TO 100
750 ENTER @Path_2;Tz(l)

760 IF Tz(l)<0. THEN GOTO 800
770 lz=lz+1
780 PRINT I,Tz(l)
790 NEXT I
800 ASSIGN @Path_2 TO "
810 PRINT " "
820 PRINT "THERE ARE ",lp," POINTS AND ",lz," INJECTIONS"
830 PRINT " "
840 !
850 PRINT "TYPE TUBE LENGTH/CM, RADIUS/CM, RETENTION
TIME/CM"
860 PRINT " "
870 PRINT "(ASSUMING 2 CM PER HOUR CHART SPEED)"
880 PRINT " "
890 PRINT "E.G. 3117., 0.04515, 11.2 "
900 PRINT " "
910 INPUT L,R,Flwrt
920 !Tr0=3.141592654*60.*R*L/Flwrt
930 Tr0=3600.*Flwrt/2.
940 Flwrt=3.141592654*R*R*L*60/Tr0
950 PRINT " "
960 PRINT "LENGTH, RADIUS, FLOW RATE, RETENTION TIME "
970 PRINT " "
980 PRINT L,R,Flwrt,Tr0
990 PRINT " "
1000 PRINT "TYPE MOLAR REFRACTIVITIES R1, R2 (IF KNOWN, OR
1., 1.)"
1010 PRINT " "
1020 INPUT R1,R2
1030 PRINT " "
1040 PRINT
1050 PRINT
1060 PRINT "type DC1, DC2 for peak I: "
1070 PRINT
1080 INPUT Dc1(1),Dc2(1)
1090 PRINT
1100 PRINT
1110 PRINT "type DC1, DC2 for peak II:"
1120 PRINT
1130 INPUT Dc1(2),Dc2(2)
1140 PRINT
1150 PRINT
1160 !
1170 !           PLOT POINTS IMIN TO IMAX
1180 !
1190 Npk=0
1200 Nk(3)=0
1210 Nk(4)=0
1220 Nk(5)=0
1230 PRINT "TYPE IMIN, IMAX TO PLOT POINTS IN THIS RANGE (IMIN
< 0 TO EXIT)"
1240 PRINT " (THERE ARE ",lp," POINTS)"
1250 PRINT " "
1260 INPUT lmin,lmax
1270 PRINT " "
1280 IF lmin>lmax THEN GOTO 1230
1290 IF lmax>lp THEN GOTO 1230
1300 IF lmin<0 THEN GOTO 1770
1310 FOR J=1 TO 30
1320 PRINT " "
1330 NEXT J
1340 PRINT At$
1350 PRINT Ct$
1360 PRINT "POINTS ",lmin," TO ",lmax
1361 GINIT
1362 GCLEAR
1363 KEY LABELS OFF
1370 PLOTTER IS 3,"INTERNAL";COLOR MAP
1410 WINDOW 0,130,0,100
1411 WAIT 1
1412 AREA PEN 1
1413 MOVE 0,0
1414 RECTANGLE 130,100,FILL
1415 WAIT 1
1417 PEN 0
1420 Xmax=-1.E+100
1430 Xmin=1.E+100
1440 Ymin=1.E+100
1450 Ymax=-1.E+100
1460 FOR J=lmin TO lmax
1470 IF T(J)<Xmin THEN Xmin=T(J)
1480 IF T(J)>Xmax THEN Xmax=T(J)
1490 IF V(J)<Ymin THEN Ymin=V(J)
1500 IF V(J)>Ymax THEN Ymax=V(J)
1510 NEXT J

```

```

1520 Scx=129./(Xmax-Xmin)
1530 Scy=85./(Ymax-Ymin)
1540 !
1550 FOR J=lmin TO lmax
1560 Xp=Scx*(T(J)-Xmin)
1570 Yp=15.+(Scy*(V(J)-Ymin))
1580 MOVE Xp,Yp
1590 PLOT Xp,Yp
1600 !PRINT " "
1610 !PRINT J
1620 !PRINT " "
1630 NEXT J
1640 !
1641 WAIT 2
1642 IF lflagpr<0 THEN GOTO 1660
1644 PRINT
1645 PRINT "type j > 0 to print peaks"
1646 PRINT
1647 INPUT J
1648 IF J<1 THEN lflagpr=-1
1649 IF lflagpr<0 THEN GOTO 1660
1650 KEY LABELS OFF
1651 CLEAR SCREEN
1652 ASSIGN @lii TO 10
1653 OUTPUT @lii;"screen dump"
1654 OUTPUT @lii
1655 DUMP GRAPHICS
1657 WAIT 30
1660 PRINT " "
1670 PRINT "POINTS ",lmin," TO ",lmax
1680 PRINT " "
1690 PRINT "TYPE J > 0 TO PLOT MORE POINTS, J = 0 TO FIT THESE
POINTS"
1700 PRINT " (MAX. 500 POINTS PER PEAK)"
1710 PRINT " "
1720 INPUT J
1730 IF J>0 THEN GOTO 1230
1740 !
1750 ! CHOOSE NPK PEAKS TO BE FITTED
1760 ! IDENTIFY TIME ZERO:
1770 !
1780 GRAPHICS OFF
1790 PRINT " "
1800 PRINT "TO SHOULD BE NEAR ",-Tr0+(.5*(T(lmin)+T(lmax)))
1810 PRINT " "
1820 PRINT "LIST OF T0 VALUES:"
1830 PRINT " "
1840 FOR J=1 TO lz
1850 PRINT Tz(J)
1860 NEXT J
1870 PRINT " "
1880 PRINT "TYPE T0:"
1890 PRINT " "
1900 INPUT T0
1910 PRINT " "
1920 Npk=Npk+1
1930 !PRINT "PEAK ",Npk
1940 IF Npk=5 THEN PRINT "THIS IS THE LAST PEAK!"
1950 IF Npk>5 THEN PRINT "TOO MANY PEAKS!"
1960 !
1970 N=lmax-lmin+1
1980 Nk(Npk)=N
1990 FOR J=lmin TO lmax
2000 l=J-lmin+1
2010 X(Npk,l)=T(J)-T0
2020 Y(Npk,l)=V(J)
2030 !PRINT J,X(Npk,l),Y(Npk,l)
2040 NEXT J
2050 !
2060 !PRINT " "
2070 !PRINT "DELTA C1(0), DELTA C2(0) (ARBITRARY UNITS)"
2080 !PRINT " "
2090 !INPUT M1(Npk),M2(Npk)
2100 PRINT
2110 PRINT
2120 PRINT "type injection solution number (1 or 2): "
2130 PRINT
2140 INPUT J
2150 PRINT
2160 PRINT
2170 M1(Npk)=Dc1(J)
2180 M2(Npk)=Dc2(J)
2190 PRINT
2200 PRINT
2210 PRINT " "
2220 PRINT "TYPE J > 0 TO ENTER MORE PEAKS, J = 0 TO FIT PEAKS
(MAX. 5)"
2230 PRINT " "
2240 INPUT J
2250 IF J>0 THEN GOTO 1230
2260 !
2270 ! ESTIMATE INITIAL PARAMETER VALUES
2280 !
2290 PRINT " "
2300 PRINT "TYPE D1, D2, A, B ESTIMATES (E.G. .5, 1.7, 0., 1.)"
2310 PRINT " "
2320 INPUT A(1),A(2),A(4),A(3)
2330 PRINT " "
2340 !
2350 ! ESTIMATE PARAMETERS FOR EACH OF THE NPK PEAKS
2360 !
2370 ! A(4K+1) = RETENTION TIME OF PEAK K
2380 ! A(4K+2) = PEAK HEIGHT
2390 ! A(4K+3) = BASELINE
2400 ! A(4K+4) = BASELINE SLOPE
2410 !
2420 FOR K=1 TO Npk
2430 Kk=4*K
2440 A(Kk+4)=(Y(K,Nk(K))-Y(K,1))*Tr0/(X(K,Nk(K))-X(K,1))
2450 A(Kk+3)=Y(K,1)-(A(Kk+4)*X(K,1)/Tr0)
2460 Ymin=A(Kk+3)+A(Kk+4)
2470 Ti=0.
2480 Tr=0.
2490 Ymax=0.
2500 FOR J=1 TO Nk(K)
2510 Xmin=A(Kk+3)+(A(Kk+4)*X(K,J)/Tr0)
2520 Xp=((Y(K,J)-Xmin)^2)^.5
2530 Ti=Ti+(J*Xp)
2540 Tr=Tr+(X(K,J)*Xp)
2550 Ymax=Ymax+Xp
2560 NEXT J
2570 Tr=Tr/Ymax
2580 A(Kk+1)=1.E-5*Tr
2590 Ti=Ti/Ymax
2600 Jmax=Ti
2610 A(Kk+2)=Y(K,Jmax)-A(Kk+3)-(A(Kk+4)*X(K,Jmax)/Tr0)
2620 NEXT K
2630 PRINT " "
2640 PRINT "INITIAL PARAMETER VALUES"
2650 PRINT " "
2660 FOR J=1 TO 4*(Npk+1)
2670 PRINT J,A(J)
2680 NEXT J
2690 !
2700 ! CALCULATE PARAMETER IMPROVEMENTS
2710 !
2720 Sdev=0.
2730 MAT B=(0)
2740 MAT Bi=(0)
2750 MAT C=(0)
2760 Jden=Nk(1)+Nk(2)+Nk(3)+Nk(4)+Nk(5)
2770 Jc0u=0
2780 !
2790 !
2800 Sq1=SQR(A(1))
2810 Sq2=SQR(A(2))
2820 FOR K=1 TO Npk
2830 !
2840 MAT Da=(0.)
2850 Kk=4*K
2860 Da(Kk+3)=1.
2870 M1=M1(K)
2880 M2=M2(K)
2890 Tr=1.E+5*A(Kk+1)
2900 Al=(R1*M1)/((R1*M1)+(R2*M2))
2910 W1=A(4)+(Al*A(3))
2920 Cf=.5/(((Sq1*W1)+(Sq2*(1.-W1))))^2
2930 Wd1=W1*W2*Cf*Sq2/Sq1
2940 Wd2=(Wd1*A(1)/A(2))
2950 Wa=2.*Cf*Sq1*Sq2
2960 Wb=Wa*Al
2970 W1=(Sq1*W1)/((Sq1*W1)+(Sq2*(1.-W1)))
2980 W2=1.-W1
2990 !
3000 FOR J=1 TO Nk(K)
3010 Ti=X(K,J)
3020 Da(Kk+4)=Ti/Tr0
3030 Ymin=A(Kk+2)*SQR(Tr0/Ti)
3040 Xmin=1.2E-4*(Ti-Tr)*(Tr-Ti)/(R*R*Ti)
3041 Ex1=0.
3043 IF Xmin*A(1)<-230. THEN GOTO 3051
3050 Ex1=Ymin*EXP(Xmin*A(1))
3051 Ex2=0.
3052 IF Xmin*A(2)<-230. THEN GOTO 3070
3060 Ex2=Ymin*EXP(Xmin*A(2))
3070 Da(1)=(Xmin*Ex1*W1)+((Ex1-Ex2)*Wd1)
3080 Da(2)=(Xmin*Ex2*W2)+((Ex1-Ex2)*Wd2)
3090 Da(3)=Al*(Ex1-Ex2)*Wb
3100 Da(4)=(Ex1-Ex2)*Wa
3110 Yc(K,J)=(W1*Ex1)+(W2*Ex2)
3120 Da(Kk+2)=Yc(K,J)/A(Kk+2)
3130 Yc(K,J)=Yc(K,J)+A(Kk+3)+(A(Kk+4)*Ti/Tr0)
3140 Da(Kk+1)=24.*(Ti-Tr)*((W1*A(1)*Ex1)+(W2*A(2)*Ex2))/(R*R*Ti)
3150 Ymax=Y(K,J)-Yc(K,J)
3160 Sdev=Sdev+(Ymax*Ymax)
3170 !
3180 FOR l=1 TO 4
3190 C(l)=C(l)+(Da(l)*Ymax)
3200 C(l+Kk)=C(l+Kk)+(Ymax*Da(l+Kk))
3210 FOR J=l TO 4

```

```

3220 B(I,J)=B(I,J)+(Da(I)*Da(J))
3230 B(I+Kk,J+Kk)=B(I+Kk,J+Kk)+(Da(I+Kk)*Da(J+Kk))
3240 NEXT J
3250 NEXT I
3260 FOR I=1 TO 4
3270 FOR J=Kk+1 TO Kk+4
3280 B(I,J)=B(I,J)+(Da(I)*Da(J))
3290 NEXT J
3300 NEXT I
3310 !
3320 !
3330 Jcou=Jcou+1
3340 !J=(100.*Jcou)/Jden
3350 !PRINT J
3360 NEXT J
3370 !
3380 NEXT K
3390 !
3400 FOR I=2 TO 4*(1+Npk)
3410 FOR J=1 TO I-1
3420 B(I,J)=B(J,I)
3430 NEXT J
3440 NEXT I
3450 IF Npk=5 THEN GOTO 3500
3460 FOR I=4*(Npk+1)+1 TO 24
3470 C(I)=1.
3480 B(I,I)=1.
3490 NEXT I
3500 PRINT " "
3510 PRINT "LEAST SQUARES MATRIX ASSEMBLED"
3520 PRINT " "
3530 !          PLOT MEASURED AND FITTED POINTS
3540 !
3550 !          CLEAR SCREEN
3560 !
3570 FOR I=1 TO 35
3580 !PRINT " "
3590 NEXT I
3600 GINIT
3610 PLOTTER IS 3,"INTERNAL"
3620 GRAPHICS ON
3630 WINDOW 0,130,0,100
3640 !
3650 !
3660 !
3670 !PRINT " "
3680 Xmax=-1.E+100
3690 Xmin=1.E+100
3700 Ymax=-1.E+100
3710 Ymin=1.E+100
3720 FOR K=1 TO Npk
3730 FOR J=1 TO Nk(K)
3740 IF X(K,J)>Xmax THEN Xmax=X(K,J)
3750 IF X(K,J)<Xmin THEN Xmin=X(K,J)
3760 IF Y(K,J)>Ymax THEN Ymax=Y(K,J)
3770 IF Y(K,J)<Ymin THEN Ymin=Y(K,J)
3780 NEXT J
3790 NEXT K
3800 !          SCALE DATA FOR PLOT
3810 Scx=129./(Xmax-Xmin)
3820 Scy=85./(Ymax-Ymin)
3830 Ymax=-2100.
3840 FOR J=1 TO 41
3850 Ymax=Ymax+100.
3860 Xp=64.5+(Scx*Ymax)
3870 MOVE Xp,10.
3880 DRAW Xp,12.
3890 NEXT J
3900 !PRINT " "
3910 !PRINT "TICKS 100 SECONDS APART"
3920 !PRINT " "
3930 FOR K=1 TO Npk
3940 !PRINT " "
3950 !PRINT "PEAK ",K
3960 !PRINT " "
3970 FOR J=1 TO Nk(K)
3980 Xp=64.5+(Scx*(X(K,J)-(1.E+5*A((4*K)+1))))
3990 Yp=10.+(Scy*(Y(K,J)-Ymin))
4000 MOVE Xp-.1,Yp
4010 DRAW Xp+.1,Yp
4020 MOVE Xp,Yp-.1
4030 DRAW Xp,Yp+.1
4040 MOVE Xp-.1,Yp-.1
4050 DRAW Xp+.1,Yp-.1
4060 MOVE Xp+.1,Yp-.1
4070 DRAW Xp+.1,Yp+.1
4080 MOVE Xp+.1,Yp+.1
4090 DRAW Xp-.1,Yp+.1
4100 MOVE Xp-.1,Yp+.1
4110 DRAW Xp-.1,Yp-.1
4120 NEXT J
4130 !
4140 FOR J=1 TO Nk(K)
4150 Xp=64.5+(Scx*(X(K,J)-(1.E+5*A((4*K)+1))))
4160 Yp=(Scy*(Yc(K,J)-Ymin))+10.
4170 IF J>1 THEN GOTO 4200
4180 MOVE Xp,Yp
4190 GOTO 4210
4200 PLOT Xp,Yp
4210 NEXT J
4220 WAIT 1
4230 NEXT K
4240 !
4250 WAIT 2
4260 !
4270 !          PLOT RESIDUALS
4280 !
4290 FOR J=1 TO 35
4300 PRINT " "
4310 NEXT J
4320 GRAPHICS OFF
4330 !
4340 !          CLEAR SCREEN
4350 !
4360 FOR I=1 TO 35
4370 !PRINT " "
4380 NEXT I
4390 GINIT
4400 PLOTTER IS 3,"INTERNAL"
4410 GRAPHICS ON
4420 WINDOW 0,130,0,100
4430 !
4440 !
4450 !
4460 !PRINT " "
4470 Xmax=-1.E+100
4480 Xmin=1.E+100
4490 Ymax=-1.E+100
4500 Ymin=1.E+100
4510 FOR K=1 TO Npk
4520 FOR J=1 TO Nk(K)
4530 IF X(K,J)>Xmax THEN Xmax=X(K,J)
4540 IF X(K,J)<Xmin THEN Xmin=X(K,J)
4550 IF Y(K,J)-Yc(K,J)>Ymax THEN Ymax=Y(K,J)-Yc(K,J)
4560 IF Y(K,J)-Yc(K,J)<Ymin THEN Ymin=Y(K,J)-Yc(K,J)
4570 NEXT J
4580 NEXT K
4590 !          SCALE DATA FOR PLOT
4600 Scx=129./(Xmax-Xmin)
4610 Scy=85./(Ymax-Ymin)
4620 Ymax=-2100.
4630 FOR J=1 TO 41
4640 Ymax=Ymax+100.
4650 Xp=64.5+(Scx*Ymax)
4660 MOVE Xp,10.
4670 DRAW Xp,12.
4680 NEXT J
4690 !PRINT " "
4700 !PRINT "TICKS 100 SECONDS APART"
4710 !PRINT " "
4720 FOR K=1 TO Npk
4730 !PRINT " "
4740 !PRINT "PEAK ",K
4750 !PRINT " "
4760 FOR J=1 TO Nk(K)
4770 Xp=64.5+(Scx*(X(K,J)-(1.E+5*A((4*K)+1))))
4780 Yp=10.+(Scy*(Y(K,J)-Yc(K,J)-Ymin))
4790 MOVE Xp-.1,Yp
4800 DRAW Xp+.1,Yp
4810 MOVE Xp,Yp-.1
4820 DRAW Xp,Yp+.1
4830 MOVE Xp-.1,Yp-.1
4840 DRAW Xp+.1,Yp-.1
4850 MOVE Xp+.1,Yp-.1
4860 DRAW Xp+.1,Yp+.1
4870 MOVE Xp+.1,Yp+.1
4880 DRAW Xp-.1,Yp+.1
4890 MOVE Xp-.1,Yp+.1
4900 DRAW Xp-.1,Yp-.1
4910 NEXT J
4920 !
4930 !FOR J=1 TO Nk(K)
4940 !Xp=64.5+(Scx*(X(K,J)-(1.E+5*A((4*K)+1))))
4950 !Yp=(Scy*(Yc(K,J)-Ymin))+10.
4960 !IF J>1 THEN GOTO 4377
4970 !MOVE Xp,Yp
4980 !GOTO 4378
4990 !PLOT Xp,Yp
5000 !NEXT J
5010 WAIT 1
5020 NEXT K
5030 !
5040 WAIT 2
5050 FOR J=1 TO 35
5060 PRINT " "
5070 NEXT J
5080 GRAPHICS OFF
5090 !
5100 !
5110 N=0

```

```

5120 FOR J=1 TO Npk
5130 N=N+Nk(J)
5140 NEXT J
5150 Sdev=SQR(Sdev/N)
5160 PRINT ""
5170 PRINT "INVERTING LEAST SQUARES MATRIX"
5180 PRINT ""
5190 MAT Bi=INV(B)
5200 PRINT "INVERSION COMPLETE"
5210 PRINT ""
5220 MAT Da=Bi*C
5230 PRINT ""
5240 PRINT "    PARAMETER      CHANGE      % STAND. DEV."
5250 FOR I=1 TO 4*(1+Npk)
5260 IF Bi(I,I)<0 THEN GOTO 5300
5270 IF A(I)=0. THEN GOTO 5300
5280 PRINT I,A(I),Da(I),(SQR(Bi(I,I)*N))*Sdev*100/A(I)
5290 GOTO 5310
5300 PRINT "-----"
5310 NEXT I
5320 !
5330 GOTO 5460
5340 FOR K=1 TO Npk
5350 PRINT ""
5360 PRINT " PEAK ",K
5370 PRINT ""
5380 !
5390 PRINT " I      X(I)      Y(I)      % DEV      "
5400 FOR J=1 TO Nk(K)
5410 Dev=Y(K,J)-Yc(K,J)
5420 PRINT J,X(K,J),Y(K,J),100.*(Y(K,J)-Yc(K,J))/A((4*K)+2)
5430 NEXT J
5440 !
5450 NEXT K
5460 PRINT ""
5470 PRINT A$
5480 PRINT C$
5490 PRINT ""
5500 PRINT "STANDARD DEVIATION IN VOLTAGE READINGS "
5510 PRINT Sdev
5520 !
5530 !          CALCULATE DIFFUSION COEFFICIENTS FROM D1,
D2, A, B
5540 !
5550 Al=(1.-A(4))/A(3)
5560 Am(1,1)=Al/R1
5570 Am(2,1)=(1.-Al)/R2
5580 Al=(A(4)/A(3))
5590 Am(1,2)=Al/R1
5600 Am(2,2)=(1.-Al)/R2
5610 MAT Ami=INV(Am)
5620 Dm(1,1)=A(1)
5630 Dm(1,2)=0.
5640 Dm(2,1)=0.
5650 Dm(2,2)=A(2)
5660 MAT Cm=Am*Dm
5670 MAT Dm=Cm*Ami
5680 D11=Dm(1,1)
5690 D12=Dm(1,2)
5700 D21=Dm(2,1)
5710 D22=Dm(2,2)
5720 !
5730 PRINT ""
5740 PRINT "D1, D2, B, A          (STANDARD DEVIATIONS)
CHANGES"
5750 PRINT ""
5760 FOR I=1 TO 4
5770 Ymax=SQR(Bi(I,I)*Bi(I,I))
5780 PRINT A(I),(" ",Sdev*SQR(Ymax*N),")",Da(I)
5790 NEXT I
5800 PRINT ""
5810 PRINT "RETENTION TIMES FOR EACH PEAK"
5820 PRINT ""
5830 FOR I=1 TO Npk
5840 PRINT A((4*I)+1)
5850 NEXT I
5860 PRINT ""
5870 PRINT "D11, D12, D21, D22:"
5880 PRINT D11,D12,D21,D22
5890 PRINT ""
5900 !
5910 !          ITERATE?
5920 !
5930 PRINT " TYPE J > 0 TO ITERATE"
5940 PRINT ""
5950 INPUT J
5960 IF J>0 THEN GOTO 6040
5970 PRINT

5980 PRINT "TYPE J > 0 TO RESTART FITTING WITH NEW INITIAL
PARAMETER ESTIMATES"
5990 PRINT
6000 INPUT J
6010 IF J>0 THEN GOTO 2290
6020 GOTO 6150
6030 !
6040 A(1)=A(1)+Da(1)
6050 A(2)=A(2)+Da(2)
6060 A(3)=A(3)+Da(3)
6070 A(4)=A(4)+Da(4)
6080 FOR I=5 TO 4*(Npk+1)
6090 A(I)=A(I)+Da(I)
6100 NEXT I
6110 GOTO 2720
6120 !
6130 !          ESTIMATE R2/R1 FROM PEAK AREAS
6140 !
6150 PRINT ""
6160 PRINT "TYPE J > 0 TO ESTIMATE R1/R2 "
6170 INPUT J
6180 IF J<1 THEN GOTO 6730
6190 PRINT ""
6200 PRINT "INJECTED VOLUMES AND DETECTOR SENSITIVITY ARE
ASSUMED CONSTANT"
6210 PRINT ""
6220 D2=SQR(1.+(4.*D12*D21/((D11-D22)^2)))
6230 D1=.5*(D11+D22+((D11-D22)*D2))
6240 D2=D11+D22-D1
6250 MAT Am=(0.)
6260 MAT Ak=(0.)
6270 FOR K=1 TO Npk
6280 M1=M1(K)
6290 M2=M2(K)
6300 A1=(R1*((D22-D1)*M1)-(D12*M2))+R2*((D11-D1)*M2)-
(D21*M1))
6310 A1=A1*SQR(D1)
6320 A2=(R2*((D2-D1)*M2)+(D21*M1))+R1*((D2-
D22)*M1)+(D12*M2))
6330 A2=A2*SQR(D2)
6340 A1=A1/(A1+A2)
6350 Ar(K)=A((4*K)+2)*(A1/SQR(D1))+((1.-A1)/SQR(D2))
6360 Am(1,1)=Am(1,1)+(M1*M1)
6370 Am(1,2)=Am(1,2)+(M1*M2)
6380 Am(2,2)=Am(2,2)+(M2*M2)
6390 Ak(1)=Ak(1)+(M1*Ar(K))
6400 Ak(2)=Ak(2)+(M2*Ar(K))
6410 NEXT K
6420 Am(2,1)=Am(1,2)
6430 MAT Ami=INV(Am)
6440 MAT Ri=Ami*Ak
6450 PRINT ""
6460 PRINT "PEAK      M1      M2      AREA      AREA(CALC)"
6470 FOR K=1 TO Npk
6480 PRINT K,M1(K),M2(K),Ar(K),(Ri(1)*M1(K))+(Ri(2)*M2(K))
6490 NEXT K
6500 !
6510 R1=1.
6520 R2=Ri(2)/Ri(1)
6530 IF Iflag>0 THEN GOTO 6600
6540 PRINT
6550 PRINT "repeat initial fit using an accurate R2/R1 ratio calculated from
the peak areas"
6560 PRINT
6570 Iflag=1
6580 GOTO 2720
6590 !
6600 PRINT ""
6610 PRINT "R2/R1 = ",Ri(2)/Ri(1)
6620 PRINT ""
6630 PRINT "*****"
6640 PRINT ""
6650 PRINT "CORRECTED COEFFICIENTS (USING MEASURED R1, R2
VALUES):"
6660 PRINT ""
6670 PRINT "D11, D12: ",D11,D12*R1*Ri(2)/(R2*Ri(1))
6680 PRINT ""
6690 PRINT "D21, D22: ",D21*R2*Ri(1)/(R1*Ri(2)),D22
6700 PRINT ""
6710 PRINT "*****"
6720 PRINT ""
6730 PRINT " TYPE J > 0 TO PLOT AND FIT OTHER POINTS"
6740 PRINT ""
6750 INPUT J
6760 IF J>0 THEN GOTO 1190
6770 !
6780 SUBEND

```

4. Programa de tratamiento de datos quaternarios

Programa QUA7

```

10 PRINT "          QUA7"
20 PRINT " "
30 !          ****
40 !
50 PRINT " FIT TAYLOR PEAKS TO DETERMINE QUATERNARY
DIFFUSION COEFFICIENTS"
51 PRINT "          (and eigenvalues)"
60 PRINT " BY OPTIMIZING EIGENVALUES AND PRE-EXPONENTIAL
FACTORS"
70 PRINT " "
80 !
90 OPTION BASE 1
100 REAL R,Ri(3),Tr,M(3),D(3,3),G(3,3),Di(3),Ti,Pe(3),W(3,3)
110 REAL V(20000),T(20000),Tz(15),L,Flwrt,Tr0,Sdev,R1,R2,R3,Xp,Yp
120 REAL
Xmin,Xmax,Ymin,Ymax,M1i,M2i,M3i,DD,M1(3),M2(3),M3(3),T0,F,Fp
130 REAL
B(21,21),C(21),Da(21),A(21),Bi(21,21),X(3,1800),Y(3,1800),Yc(3,1800)
140 REAL
A1,A2,A3,D1,D2,D3,Am(3,3),Ak(3),Ar(3),Ami(3,3),F1,F2,U(3),S(3),Aik(3,3)
150 REAL
Ex1,Ex2,Ex3,W1,W2,W3,Cm(3,3),Al1,Al2,Sq1,Sq2,Sq3,B1,B2,B3,Db1,Db2,
Bik(3,3),Diagm(3,3)
160 REAL
Db11,Db21,Db12,Db22,Db13,Db23,Db14,Db24,Db15,Db25,Db16,Db26,Vi(2
),Kv(2),Kvv(2)
170 REAL
Db17,Db27,Db18,Db28,Db19,Db29,Eig1,Eig2,Eig3,Ev(2,2),Evi(2,2),Eigv1(3
),Eigv2(3),Eigv3(3)
180 INTEGER I,J,K,Lz,lp,lmin,lmax,N,Npk,Nk(5),Kk,Jmax,li,Jj,lit,lct,lpc
190 !
200 PRINT " "
210 PRINT " ***** PUT DATA DISC IN MASS STORAGE DRIVE
*****"
220 PRINT " "
230 MASS STORAGE IS "c:\hpbasic\data"
240 !MASS STORAGE IS "A:\ "
250 PRINT " TYPE NAME OF DATA FILE (E.G. BE10)"
260 INPUT Vtt$
270 ASSIGN @Path_1 TO Vtt$;FORMAT ON
280 PRINT " "
290 !
300 ENTER @Path_1;At$
310 ENTER @Path_1;Ct$
320 PRINT "DATA TITLE ",At$
330 PRINT "DATE ",Ct$
340 PRINT " "
350 !
360 !          READ DATA FROM FILES
370 !
380 PRINT "MAXIMUM OF 9000 POINTS"
390 PRINT " "
400 !PRINT " I          T(I)          V(I)          "
410 lp=0
420 lz=0
430 FOR l=1 TO 20000
440 lp=lp+1
450 ENTER @Path_1;T(lp),V(lp)
460 IF T(lp)>0 THEN GOTO 510
470 IF T(lp)<-5000 THEN GOTO 520
480 lz=lz+1
490 Tz(lz)=V(lp)
500 lp=lp-1
510 NEXT l
520 lp=-1
530 PRINT " "
540 PRINT "THERE ARE ",lp," POINTS AND ",lz," INJECTIONS"
550 PRINT " "
560 ASSIGN @Path_1 TO *
570 !
580 PRINT "TYPE TUBE LENGTH/CM, RADIUS/CM, RETENTION
TIME/cm"
590 PRINT "          (assuming 2 cm/hr chart speed)"
600 PRINT
610 PRINT "E.G. 3117., 0.04515, 3.4"
620 PRINT " "
630 INPUT L,R,Flwrt
640 Tr0=Flwrt*.5*3600.
650 Flwrt=(3.1415927*R*R*L*60.)/Tr0
660 !Tr0=3.141592654*60.*R*R*L/Flwrt
670 PRINT " "
680 PRINT "LENGTH/CM, RADIUS/CM, FLOW RATE/mL per min,
RETENTION TIME/s "
690 PRINT " "
700 PRINT L,R,Flwrt,Tr0
710 PRINT " "
720 PRINT "TYPE MOLAR REFRACTIVITIES R1, R2, R3 (ARBITRARY
UNITS)"
730 PRINT " "
740 INPUT R1,R2,R3
750 Ri(1)=R1
760 Ri(2)=R2
770 Ri(3)=R3
780 A(4)=0.
790 A(5)=1.
800 A(6)=0.
810 A(7)=0.
820 A(8)=0.
830 A(9)=1.
840 !
850 !
860 !          PLOT POINTS IMIN TO IMAX
870 !
880 Npk=0
890 Nk(4)=0
900 Nk(5)=0
910 PRINT "TYPE IMIN, IMAX TO PLOT POINTS IN THIS RANGE (IMIN
< 0 TO EXIT)"
920 PRINT " (THERE ARE ",lp," POINTS)"
930 PRINT " "
940 INPUT lmin,lmax
950 PRINT " "
960 IF lmin>lmax THEN GOTO 910
970 IF lmax<lp THEN GOTO 910
980 IF lmin<0 THEN GOTO 1440
990 CLEAR SCREEN
1000 PRINT At$
1010 PRINT Ct$
1020 PRINT "POINTS ",lmin," TO ",lmax
1030 PLOTTER IS 3,"INTERNAL"
1040 GINIT
1050 GRAPHICS OFF
1060 GRAPHICS ON
1070 WINDOW 0,130,0,100
1080 Xmax=-1.E+100
1090 Xmin=1.E+100
1100 Ymin=1.E+100
1110 Ymax=-1.E+100
1120 FOR J=lmin TO lmax
1130 IF T(J)<Xmin THEN Xmin=T(J)
1140 IF T(J)>Xmax THEN Xmax=T(J)
1150 IF V(J)<Ymin THEN Ymin=V(J)
1160 IF V(J)>Ymax THEN Ymax=V(J)
1170 NEXT J
1180 Scx=129./(Xmax-Xmin)
1190 Scy=85./(Ymax-Ymin)
1200 l=1
1210 !
1220 FOR J=lmin TO lmax
1230 Xp=Scx*(T(J)-Xmin)
1240 Yp=15.+(Scy*(V(J)-Ymin))
1250 MOVE Xp,Yp
1260 PLOT Xp,Yp
1270 l=l+1
1280 !IF l>0 THEN GOTO 1420
1290 !PRINT J
1300 NEXT J
1310 !
1320 WAIT 2.
1330 PRINT " "
1340 PRINT "POINTS ",lmin," TO ",lmax
1350 PRINT " "
1360 PRINT "TYPE J > 0 TO PLOT MORE POINTS, J = 0 TO FIT THESE
POINTS"
1370 PRINT "          (MAX. 200 POINTS PER PEAK)"
1380 PRINT " "
1390 INPUT J
1400 IF J>0 THEN GOTO 910
1410 !
1420 !          CHOOSE NPK PEAKS TO BE FITTED
1430 ! IDENTIFY TIME ZERO:
1440 !
1450 GRAPHICS OFF
1460 PRINT " "
1470 PRINT "TO SHOULD BE NEAR ",-Tr0+(.5*(T(lmin)+T(lmax)))
1480 PRINT " "
1490 PRINT "LIST OF TO VALUES:"
1500 PRINT " "

```

```

1510 FOR J=1 TO lz
1520 PRINT Tz(J)
1530 NEXT J
1540 PRINT " "
1550 PRINT "TYPE T0:"
1560 PRINT " "
1570 INPUT T0
1580 PRINT " "
1590 Npk=Npk+1
1600 PRINT "PEAK ",Npk
1610 !
1620 N=Imax-Imin+1
1630 Nk(Npk)=N
1640 FOR J=Imin TO Imax
1650 I=J-Imin+1
1660 X(Npk,I)=T(J)-T0
1670 Y(Npk,I)=V(J)
1680 !PRINT J,X(Npk,I),Y(Npk,I)
1690 NEXT J
1700 PRINT " "
1710 PRINT "DELTA C1(0), DELTA C2(0), DELTA C3(0) (ARBITRARY
UNITS)"
1720 PRINT " "
1730 INPUT M1(Npk),M2(Npk),M3(Npk)
1740 PRINT " "
1750 PRINT "TYPE J > 0 TO ENTER MORE PEAKS, J = 0 TO FIT PEAKS
(MAX. 5)"
1760 PRINT " "
1770 INPUT J
1780 IF J>0 THEN GOTO 910
1790 !
1800 ! ESTIMATE PARAMETERS FOR EACH OF THE NPK PEAKS
1810 !
1820 ! A1 - A9 = EIGENVALUES AND PRE-EXPONENTIAL
FACTORS
1830 ! A(4K+6) = RETENTION TIME OF PEAK K/1.E5
1840 ! A(4K+7) = PEAK HEIGHT
1850 ! A(4K+8) = BASELINE
1860 ! A(4K+9) = BASELINE SLOPE
1870 !
1880 ! EIGENVALUE INITIAL ESTIMATES
1890 !
1900 PRINT
1910 PRINT "TYPE J > 0 TO GIVE OR TO CHANGE Eigenvalue
ESTIMATES: "
1920 PRINT
1930 INPUT J
1940 IF J<1 THEN GOTO 1990
1950 PRINT
1960 PRINT "TYPE D1, D2, D3 ESTIMATES (E.G. 0.5, 1.2, 1.9)"
1970 PRINT
1980 INPUT A(1),A(2),A(3)
1990 PRINT
2000 PRINT "TYPE J > 0 FOR DEFAULT ESTIMATES OF A4 THROUGH
A9 (0. 1. 0. 0. 0. 1.)"
2010 PRINT
2020 INPUT J
2030 IF J<1 THEN GOTO 2110
2040 A(4)=0.
2050 A(5)=1.
2060 A(6)=0.
2070 A(7)=0.
2080 A(8)=0.
2090 A(9)=1.
2100 GOTO 2200
2110 PRINT
2120 PRINT "TYPE J > 0 TO GIVE OR TO CHANGE ESTIMATES OF A4
THROUGH A9:"
2130 INPUT J
2140 IF J<1 THEN GOTO 2200
2150 PRINT
2160 PRINT "TYPE A4, A5, A6, A7, A8, A9:"
2170 PRINT
2180 INPUT A(4),A(5),A(6),A(7),A(8),A(9)
2190 PRINT
2200 !
2210 FOR K=1 TO Npk
2220 Kk=4*K
2230 A(Kk+9)=(Y(K,Nk(K))-Y(K,1))*Tr0/(X(K,Nk(K))-X(K,1))
2240 A(Kk+8)=Y(K,1)-(A(Kk+9)*X(K,1)/Tr0)
2250 Ymin=A(Kk+8)+A(Kk+9)
2260 Ti=0.
2270 Tr=0.
2280 Ymax=0.
2290 FOR J=1 TO Nk(K)
2300 Xmin=A(Kk+8)+(A(Kk+9)*X(K,J)/Tr0)
2310 Xp=((Y(K,J)-Xmin)^2)^.5
2320 Ti=Ti+(J*Xp)
2330 Tr=Tr+(X(K,J)*Xp)
2340 Ymax=Ymax+Xp
2350 NEXT J
2360 Tr=Tr/Ymax
2370 A(Kk+6)=1.E-5*Tr
2380 Ti=Ti/Ymax
2390 Jmax=Ti
2400 A(Kk+7)=Y(K,Jmax)-A(Kk+8)-(A(Kk+9)*X(K,Jmax)/Tr0)
2410 NEXT K
2420 PRINT " "
2430 PRINT "INITIAL PARAMETER VALUES"
2440 PRINT " "
2450 FOR J=1 TO 9+(4*Npk)
2460 PRINT J,A(J)
2470 NEXT J
2480 !
2490 ! CALCULATE PARAMETER IMPROVEMENTS
2500 !
2510 Sdev=0.
2520 MAT B=(0.)
2530 MAT Bi=(0.)
2540 MAT C=(0.)
2550 Sq1=SQR(A(1))
2560 Sq2=SQR(A(2))
2570 Sq3=SQR(A(3))
2580 !
2590 FOR K=1 TO Npk
2600 !
2610 MAT Da=(0.)
2620 Kk=4*K
2630 Da(Kk+8)=1.
2640 M1i=M1(K)
2650 M2i=M2(K)
2660 M3i=M3(K)
2670 M(1)=M1i
2680 M(2)=M2i
2690 M(3)=M3i
2700 Tr=1.E+5*A(Kk+6)
2710 Al2=(R1*M1i)+(R2*M2i)+(R3*M3i)
2720 Al1=R1*M1i/Al2
2730 Al2=R2*M2i/Al2
2740 W1=A(4)+(Al1*A(5))+(Al2*A(6))
2750 W2=A(7)+(Al1*A(8))+(Al2*A(9))
2760 W3=1.-W1-W2
2770 Yp=(W1*Sq1)+(W2*Sq2)+(W3*Sq3)
2780 B1=W1*Sq1/Yp
2790 B2=W2*Sq2/Yp
2800 B3=1.-B1-B2
2810 Xp=.5/(Yp*Yp)
2820 Db11=W1*Xp*((W2*Sq2)+(W3*Sq3))/Sq1
2830 Db21=-W1*W2*Sq2*Xp/Sq1
2840 Db12=-W1*W2*Sq1*Xp/Sq2
2850 Db22=W2*Xp*((W1*Sq1)+(W3*Sq3))/Sq2
2860 Db13=-W1*W3*Sq1*Xp/Sq3
2870 Db23=-W2*W3*Sq2*Xp/Sq3
2880 Xmax=1./(Yp*Yp)
2890 Db14=Xmax*Sq1*(Yp-(W1*(Sq1-Sq3)))
2900 Db24=Xmax*W2*Sq2*(Sq3-Sq1)
2910 Db15=Xmax*Al1*Sq1*(Yp-(W1*(Sq1-Sq3)))
2920 Db25=Xmax*W2*Sq2*Al1*(Sq3-Sq1)
2930 Db16=Xmax*Al2*Sq1*(Yp-(W1*(Sq1-Sq3)))
2940 Db26=Xmax*W2*Sq2*Al2*(Sq3-Sq1)
2950 Db17=Xmax*W1*Sq1*(Sq3-Sq2)
2960 Db27=Xmax*Sq2*(Yp-(W2*(Sq2-Sq3)))
2970 Db18=Xmax*W1*Sq1*Al1*(Sq3-Sq2)
2980 Db28=Xmax*Al1*Sq2*(Yp-(W2*(Sq2-Sq3)))
2990 Db19=Xmax*W1*Sq1*Al2*(Sq3-Sq2)
3000 Db29=Xmax*Al2*Sq2*(Yp-(W2*(Sq2-Sq3)))
3010 !
3020 FOR J=1 TO Nk(K)
3030 Ti=X(K,J)
3040 Ymin=A(Kk+7)*SQR(Tr0/Ti)
3050 Xmin=1.2E-4*(Tr-Ti)*(Ti-Tr)/(R*R*Ti)
3060 Ex1=0.
3070 Ex2=0.
3080 Ex3=0.
3090 IF ABS(Xmin*A(1))<100. THEN Ex1=Ymin*EXP(Xmin*A(1))
3100 IF ABS(Xmin*A(2))<100. THEN Ex2=Ymin*EXP(Xmin*A(2))
3110 IF ABS(Xmin*A(3))<100. THEN Ex3=Ymin*EXP(Xmin*A(3))
3120 Yc(K,J)=(B1*Ex1)+(B2*Ex2)+(B3*Ex3)
3130 Da(1)=(Db11+(Xmin*B1))*Ex1+(Db21*Ex2)-(Db11+Db21)*Ex3
3140 Da(2)=(Db12*Ex1)+(Db22+(Xmin*B2))*Ex2-(Db12+Db22)*Ex3
3150 Da(3)=(Db13*Ex1)+(Db23*Ex2)-((Db13+Db23)-(B3*Xmin))*Ex3
3160 Da(4)=(Db14*Ex1)+(Db24*Ex2)-((Db14+Db24)*Ex3)
3170 Da(5)=(Db15*Ex1)+(Db25*Ex2)-((Db15+Db25)*Ex3)
3180 Da(6)=(Db16*Ex1)+(Db26*Ex2)-((Db16+Db26)*Ex3)
3190 Da(7)=(Db17*Ex1)+(Db27*Ex2)-((Db17+Db27)*Ex3)
3200 Da(8)=(Db18*Ex1)+(Db28*Ex2)-((Db18+Db28)*Ex3)
3210 Da(9)=(Db19*Ex1)+(Db29*Ex2)-((Db19+Db29)*Ex3)
3220 Da(Kk+6)=24.*(Ti-
Tr)/(B1*A(1)*Ex1+(B2*A(2)*Ex2)+(B3*A(3)*Ex3))/(R*R*Ti)
3230 Da(Kk+7)=Yc(K,J)/(A(Kk+7))
3240 Da(Kk+9)=Ti/Tr0
3250 Yc(K,J)=Yc(K,J)+A(Kk+8)+(A(Kk+9)*Ti/Tr0)
3260 Ymax=Y(K,J)-Yc(K,J)
3270 Sdev=Sdev+(Ymax*Ymax)
3280 !
3290 FOR I=1 TO 9
3300 C(I)=C(I)+(Da(I)*Ymax)
3310 FOR J=I TO 9
3320 IF ABS(Da(I))<1.E-100 THEN GOTO 3350
3330 IF ABS(Da(J))<1.E-100 THEN GOTO 3350

```

```

3340 B(I,Jj)=B(I,Jj)+(Da(I)*Da(Jj))
3350 NEXT Jj
3360 NEXT I
3370 FOR I=Kk+6 TO Kk+9
3380 C(I)=C(I)+(Da(I)*Ymax)
3390 FOR Jj=1 TO Kk+9
3400 B(I,Jj)=B(I,Jj)+(Da(I)*Da(Jj))
3410 NEXT Jj
3420 NEXT I
3430 FOR I=1 TO 9
3440 FOR Jj=Kk+6 TO Kk+9
3450 B(I,Jj)=B(I,Jj)+(Da(I)*Da(Jj))
3460 NEXT Jj
3470 NEXT I
3480 !
3490 NEXT J
3500 !
3510 NEXT K
3520 !
3530 FOR I=2 TO 9+(4*Npk)
3540 FOR Jj=1 TO I-1
3550 B(I,Jj)=B(Jj,I)
3560 NEXT Jj
3570 NEXT I
3580 !          PLOT MEASURED AND FITTED POINTS
3590 !
3600 !
3610 CLEAR SCREEN
3620 GINIT
3630 PLOTTER IS 3."INTERNAL"
3640 GRAPHICS ON
3650 WINDOW 0,130,0,100
3660 !
3670 !
3680 !
3690 Xmax=-1.E+100
3700 Xmin=-1.E+100
3710 Ymax=-1.E+100
3720 Ymin=-1.E+100
3730 FOR K=1 TO Npk
3740 FOR J=1 TO Nk(K)
3750 IF X(K,J)>Xmax THEN Xmax=X(K,J)
3760 IF X(K,J)<Xmin THEN Xmin=X(K,J)
3770 IF Y(K,J)>Ymax THEN Ymax=Y(K,J)
3780 IF Y(K,J)<Ymin THEN Ymin=Y(K,J)
3790 NEXT J
3800 NEXT K
3810 !          SCALE DATA FOR PLOT
3820 Scx=129./(Xmax-Xmin)
3830 Scy=85./(Ymax-Ymin)
3840 Ymax=-2100.
3850 FOR J=1 TO 41
3860 Ymax=Ymax+100.
3870 Xp=64.5+(Scx*Ymax)
3880 MOVE Xp,10.
3890 DRAW Xp,12.
3900 NEXT J
3910 PRINT "
3920 PRINT "TICKS 100 SECONDS APART"
3930 PRINT "
3940 Ti=-2.
3950 FOR K=1 TO Npk
3960 Ti=Ti+3.
3970 PRINT "
3980 PRINT "PEAK ",K
3990 PRINT "
4000 FOR J=1 TO Nk(K)
4010 Xp=64.5+(Scx*(X(K,J)-(1.E+5*A((4*K)+6))))
4020 Yp=Ti+(Scy*(Y(K,J)-Ymin))
4030 MOVE Xp,Yp
4040 DRAW Xp,Yp
4050 GOTO 4180
4060 MOVE Xp-.1,Yp
4070 DRAW Xp+.1,Yp
4080 MOVE Xp,Yp-.1
4090 DRAW Xp,Yp+.1
4100 MOVE Xp-.1,Yp-.1
4110 DRAW Xp+.1,Yp-.1
4120 MOVE Xp+.1,Yp-.1
4130 DRAW Xp+.1,Yp+.1
4140 MOVE Xp+.1,Yp+.1
4150 DRAW Xp-.1,Yp+.1
4160 MOVE Xp-.1,Yp+.1
4170 DRAW Xp-.1,Yp-.1
4180 NEXT J
4190 !
4200 FOR J=1 TO Nk(K)
4210 Xp=64.5+(Scx*(X(K,J)-(1.E+5*A((4*K)+6))))
4220 Yp=(Scy*(Yc(K,J)-Ymin))+Ti
4230 IF J>1 THEN GOTO 4260
4240 MOVE Xp,Yp
4250 GOTO 4270
4260 PLOT Xp,Yp
4270 NEXT J
4280 WAIT 1
4290 NEXT K
4300 !
4310 WAIT 1
4320 CLEAR SCREEN
4330 GRAPHICS OFF
4340 !
4350 !
4360 N=0
4370 FOR J=1 TO Npk
4380 N=N+Nk(J)
4390 NEXT J
4400 Sdev=SQR(Sdev/N)
4410 MAT Bi=INV(B)
4420 PRINT "
4430 MAT Da=Bi*C
4440 PRINT "
4450 PRINT "    PARAMETER    CHANGE    STAND. DEV."
4460 FOR I=1 TO 9+(4*Npk)
4470 IF Bi(I,I)<0 THEN GOTO 4510
4480 IF A(I)=0. THEN GOTO 4510
4490 PRINT I,A(I),Da(I),(SQR(Bi(I,I)/N))*Sdev
4500 GOTO 4520
4510 PRINT "-----"
4520 NEXT I
4530 !
4540 GOTO 4670
4550 FOR K=1 TO Npk
4560 PRINT "
4570 PRINT " PEAK ",K
4580 PRINT "
4590 !
4600 PRINT " I          X(I)          Y(I)          % DEV  "
4610 FOR J=1 TO Nk(K)
4620 Dev=Y(K,J)-Yc(K,J)
4630 PRINT J,X(K,J),Y(K,J),100.*(Y(K,J)-Yc(K,J))/A((4*K)+2)
4640 NEXT J
4650 !
4660 NEXT K
4670 PRINT "
4680 PRINT At$
4690 PRINT Ct$
4700 PRINT "
4710 PRINT "STANDARD DEVIATION IN VOLTAGE READINGS "
4720 PRINT Sdev
4730 PRINT "
4740 PRINT "PARAMETER          (STANDARD DEVIATIONS)
CHANGES"
4750 PRINT "
4760 FOR I=1 TO 9
4770 Ymax=SQR(Bi(I,I)*Bi(I,I))
4780 PRINT A(I),(" ",Sdev*SQR(Ymax/N)," "),Da(I)
4790 NEXT I
4800 PRINT "
4810 PRINT "RETENTION TIMES FOR EACH PEAK"
4820 !PRINT "
4830 FOR I=1 TO Npk
4840 PRINT A((4*I)+6)*1.E+5
4850 NEXT I
4860 PRINT "
4870 !
4880 !          CALCULATE DIK COEFFICIENTS FROM EIGENVALUES
AND VECTORS
4890 !
4900 !PRINT "EIGENCONCENTRATIONS: "
4910 !PRINT "
4920 Xp=(A(5)*A(9))-(A(6)*A(8))
4930 Al1=((1.-A(4)*A(9))+(A(6)*A(7)))/Xp
4940 Al2=((A(4)-1)*A(8))-(A(5)*A(7))/Xp
4950 Am(1,1)=Al1/R1
4960 Am(2,1)=Al2/R2
4970 Am(3,1)=(1.-Al1-Al2)/R3
4980 Yp=1.
4990 !PRINT "FOR D1: ",Yp,Am(2,1)/Am(1,1),Am(3,1)/Am(1,1)
5000 !PRINT "
5010 !
5020 Al1=((A(7)-1)*A(6))-(A(4)*A(9))/Xp
5030 Al2=((A(5)*(1.-A(7)))+(A(4)*A(8)))/Xp
5040 Am(1,2)=Al1/R1
5050 Am(2,2)=Al2/R2
5060 Am(3,2)=(1.-Al1-Al2)/R3
5070 !PRINT "FOR D2: ",Am(1,2)/Am(2,2),Yp,Am(3,2)/Am(2,2)
5080 !PRINT "
5090 !
5100 Al1=((A(6)*A(7))-(A(4)*A(9)))/Xp
5110 Al2=((A(4)*A(8))-(A(5)*A(7)))/Xp
5120 Am(1,3)=Al1/R1
5130 Am(2,3)=Al2/R2
5140 Am(3,3)=(1.-Al1-Al2)/R3
5150 !PRINT "FOR D3: ",Am(1,3)/Am(3,3),Am(2,3)/Am(3,3),Yp
5160 !PRINT "
5170 MAT D=(0.)
5180 D(1,1)=A(1)
5190 D(2,2)=A(2)
5200 D(3,3)=A(3)
5210 MAT Cm=Am*D

```

```

5220 MAT Ami=INV(Am)
5230 MAT D=Cm*Ami
5240 PRINT "D11,D12,D13: ",D(1,1),D(1,2),D(1,3)
5250 PRINT " "
5260 PRINT "D21,D22,D23: ",D(2,1),D(2,2),D(2,3)
5270 PRINT " "
5280 PRINT "D31,D32,D33: ",D(3,1),D(3,2),D(3,3)
5290 !
5300 PRINT " "
5310 !
5320 ! ITERATE?
5330 !
5331 PRINT
5332 IF A(1)+(.*Da(1))<0. THEN PRINT "Warning! Iterated eigenvalue 1
negative."
5333 IF A(2)+(.*Da(2))<0. THEN PRINT "Warning! Iterated eigenvalue 2
negative."
5334 IF A(3)+(.*Da(3))<0. THEN PRINT "Warning! Iterated eigenvalue 3
negative."
5335 PRINT
5340 PRINT
5350 PRINT " TYPE J > 0 TO ITERATE"
5360 PRINT " "
5370 INPUT J
5380 IF J<1 THEN GOTO 5540
5390 !
5400 !J=0
5410 !FOR I=1 TO 9
5420 !IF Da(I)*Da(I)>.00000004 THEN J=1
5430 !NEXT I
5440 !
5450 FOR I=1 TO 9+(4*Npk)
5460 A(I)=A(I)+(.*Da(I))
5470 NEXT I
5480 !
5490 !IF J=0 THEN GOTO 5350
5500 GOTO 2510
5510 !
5520 ! ESTIMATE R1,R2,R3 FROM PEAK AREAS
5530 !
5540 PRINT
5550 !BEEP
5560 PRINT
5570 PRINT "TYPE J > 0 TO ESTIMATE R1,R2,R3"
5580 PRINT
5590 INPUT J
5600 IF J<1 THEN GOTO 6230
5610 PRINT
5620 PRINT "INJECTED VOLUMES AND DETECTOR SENSITIVITY ARE
ASSUMED CONSTANT"
5630 PRINT
5640 MAT Ak=(0.)
5650 MAT Am=(0.)
5660 !
5670 FOR K=1 TO Npk
5680 Kk=4*K
5690 Tr=1.E+5*A(Kk+6)
5700 Ti=Tr0
5710 M(1)=M1(K)
5720 M(2)=M2(K)
5730 M(3)=M3(K)
5740 Al2=(R1*M1(K))+(R2*M2(K))+(R3*M3(K))
5750 Al1=R1*M1(K)/Al2
5760 Al2=R2*M2(K)/Al2
5770 Pe(1)=(A(4)+(Al1*A(5))+(Al2*A(6)))*SQR(A(1))
5780 Pe(2)=(A(7)+(Al1*A(8))+(Al2*A(9)))*SQR(A(2))
5790 !Pe(3)=(1.-Pe(1)-Pe(2))*SQR(A(3))
5800 Pe(3)=(1.-A(4)-A(7)-(Al1*(A(5)+A(8)))-(Al2*(A(6)+A(9))))*SQR(A(3))
5810 Xp=1./(Pe(1)+Pe(2)+Pe(3))
5820 Pe(1)=Xp*Pe(1)
5830 Pe(2)=Xp*Pe(2)
5840 Pe(3)=Xp*Pe(3)
5850 Ar(K)=0.
5860 FOR J=1 TO 3
5870 Ar(K)=Ar(K)+(Pe(J)/SQR(A(J)))
5880 NEXT J
5890 Ar(K)=Ar(K)*A(Kk+7)
5900 FOR I=1 TO 3
5910 Ak(I)=Ak(I)+(M(I)*Ar(K))
5920 FOR J=1 TO 3
5930 Am(I,J)=Am(I,J)+(M(I)*M(J))
5940 NEXT J
5950 NEXT I
5960 NEXT K
5970 !
5980 MAT Ami=INV(Am)
5990 MAT U=Ami*Ak
6000 PRINT " "
6010 PRINT "PEAK M1 M2 M3 AREA AREA(CALC)"
6020 FOR K=1 TO Npk
6030 PRINT
K,M1(K),M2(K),M3(K),Ar(K),(U(1)*M1(K))+(U(2)*M2(K))+(U(3)*M3(K))
6040 NEXT K
6050 PRINT " "
6060 PRINT "NORMALIZED RI VALUES: "
6070 Xp=1.
6080 PRINT Xp,U(2)/U(1),U(3)/U(1)
6090 PRINT " "
6100 PRINT " "
6110 PRINT "*****"
6120 PRINT " "
6130 PRINT "DIK VALUES USING MEASURED R1, R2, R3 VALUES:"
6140 PRINT " *****"
6150 PRINT " "
6160 PRINT
D(1,1),D(1,2)*U(2)*Ri(1)/(U(1)*Ri(2)),D(1,3)*U(3)*Ri(1)/(U(1)*Ri(3))
6170 PRINT " "
6180 PRINT
D(2,1)*U(1)*Ri(2)/(U(2)*Ri(1)),D(2,2),D(2,3)*U(3)*Ri(2)/(U(2)*Ri(3))
6190 PRINT " "
6200 PRINT
D(3,1)*U(1)*Ri(3)/(U(3)*Ri(1)),D(3,2)*U(2)*Ri(3)/(U(3)*Ri(2)),D(3,3)
6210 PRINT " "
6220 PRINT "*****"
6230 PRINT
6240 PRINT "TYPE J > 0 TO TRY REFITTING THE PEAKS WITH
DIFFERENT INITIAL PARAMETER VALUES"
6250 PRINT
6260 INPUT J
6270 IF J>0 THEN GOTO 1900
6271 PRINT
6272 PRINT "TYPE J > 0 TO CALCULATE EIGEN_CONCENTRATIONS"
6273 PRINT
6274 INPUT J
6275 IF J<1 THEN GOTO 6351
6276 !
6277 PRINT
6278 PRINT "TYPE EIGENVALUES D1, D2, D3: "
6279 PRINT
6280 INPUT Eig1,Eig2,Eig3
6281 !
6282 Ev(1,1)=D(2,2)-Eig1
6283 Ev(1,2)=D(2,3)
6284 Ev(2,1)=D(3,2)
6285 Ev(2,2)=D(3,3)-Eig1
6286 MAT Evi=INV(Ev)
6287 Kv(1)=-D(2,1)
6288 Kv(2)=-D(3,1)
6289 MAT Kvv=Evi*Kv
6290 Eigv1(1)=1
6291 Eigv1(2)=Kvv(1)
6292 Eigv1(3)=Kvv(2)
6293 !
6294 Ev(1,1)=D(1,1)-Eig2
6295 Ev(2,1)=D(3,1)
6296 Ev(1,2)=D(1,3)
6297 Ev(2,2)=D(3,3)-Eig2
6298 MAT Evi=INV(Ev)
6299 Kv(1)=-D(1,2)
6300 Kv(2)=-D(3,2)
6301 MAT Kvv=Evi*Kv
6302 Eigv2(1)=Kvv(1)
6303 Eigv2(2)=1.
6304 Eigv2(3)=Kvv(2)
6305 !
6306 Ev(1,1)=D(1,1)-Eig3
6307 Ev(2,1)=D(2,1)
6308 Ev(1,2)=D(1,2)
6309 Ev(2,2)=D(2,2)-Eig3
6310 MAT Evi=INV(Ev)
6311 Kv(1)=-D(1,3)
6312 Kv(2)=-D(2,3)
6313 MAT Kvv=Evi*Kv
6314 Eigv3(1)=Kvv(1)
6315 Eigv3(2)=Kvv(2)
6316 Eigv3(3)=1.
6317 !
6318 PRINT
6320 PRINT "CONCENTRATION EIGENVECTORS V1, V2, V3 IN
COLUMNS:"
6321 PRINT
6322 PRINT Eigv1(1),Eigv2(1),Eigv3(1)
6323 PRINT
6324 PRINT Eigv1(2),Eigv2(2),Eigv3(2)
6325 PRINT
6326 PRINT Eigv1(3),Eigv2(3),Eigv3(3)
6327 PRINT
6328 PRINT
6329 Bik(1,1)=Eigv1(1)
6330 Bik(2,1)=Eigv1(2)
6331 Bik(3,1)=Eigv1(3)
6332 Bik(1,2)=Eigv2(1)
6333 Bik(2,2)=Eigv2(2)
6334 Bik(3,2)=Eigv2(3)
6335 Bik(1,3)=Eigv3(1)
6336 Bik(2,3)=Eigv3(2)
6337 Bik(3,3)=Eigv3(3)
6338 MAT Aik=INV(Bik)
6339 MAT Diagr=Aik*D
6340 MAT Aik=Diagr

```

```
6341 MAT Diagm=Aik*Bik
6342 PRINT "TEST DIAGONALIZATION: "
6343 PRINT
6344 PRINT Diagm(1,1),Diagm(1,2),Diagm(1,3)
6345 PRINT Diagm(2,1),Diagm(2,2),Diagm(2,3)
6346 PRINT Diagm(3,1),Diagm(3,2),Diagm(3,3)
6347 PRINT
6348 PRINT
6350 !
6351 PRINT
6352 PRINT " TYPE J > 0 TO PLOT AND FIT OTHER POINTS"
6353 PRINT
6354 INPUT J
6355 IF J>0 THEN GOTO 880
6356 !
6357 END
```

