



Facultad de Farmacia

**“Copolímeros bloque de poli(óxido de etileno)
y poli(óxido de propileno) lineales y en estrella:
propiedades de agregación y aplicaciones
en solubilización micelar de fármacos.”**

*Departamento de Química-Física
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica*

Jaime González López

Santiago de Compostela, 2010

Agradecimientos

Enfrentarse a los agradecimientos por la colaboración, ayuda, paciencia y apoyo ofrecido durante la realización de una tesis doctoral es casi tan difícil como la investigación en sí misma. Transmitirlos correctamente y adjuntarlos al texto final es el complemento perfecto para dar por terminado el trabajo. A lo largo de estos años han sido muchas las personas que han colaborado a nivel personal y profesional con en esta tesis. Sin embargo, debo decir que mi mayor gratitud la debo a aquellas personas que han sabido transmitirme de muchas maneras el estímulo necesario para perseverar en el trabajo diario. A todos vosotros, gracias.

A Carmen y Ángel, por su confianza y por enseñarme a abordar lo más complicado de una manera sencilla.

A Bebel, por orientarme de esa manera tan humana y confiar en mí desde el principio.

A Abel, porque el tiempo no deteriora tu amistad.

A mis amigos, en especial a Iria, Isabel y Susana, después de tantos cafés aguantando mi cansancio, creo que ya podré contaros para qué sirven las monocapas.

A Manuel, Teresa, Keyna, Elena y Carmen, que han sido un apoyo muy especial en los últimos años.

A mi familia, en especial a mis padres y hermanos, por su cariño e infinita paciencia.

A Salomé. No sé por dónde empezar a darte las gracias. Es realmente difícil. Necesitaría otra tesis... Me acogiste cuando estuve cansado, me animaste cuando me faltó aliento, supiste escuchar, apoyar, compartir y vivir cada página de este trabajo. Sin embargo, debo ser sincero. Lo que más debo agradecerte es que me hayas enseñado a esperar con alegría y cariño. Tu sonrisa paciente ha sido el verdadero estímulo para afrontar estos años de trabajo.

M^a ISABEL SANDEZ MACHO, PROFESORA TITULAR DE QUIMICA FÍSICA, CARMEN ALVAREZ LORENZO Y ANGEL CONCHEIRO NINE, PROFESORA TITULAR Y CATEDRÁTICO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA, DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA,

INFORMAMOS: Que la presente memoria titulada “Copolímeros bloque de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) lineales y en estrella: propiedades de agregación y aplicaciones en solubilización micelar de fármacos.” elaborada por el Licenciado en Farmacia D. Jaime González López ha sido realizada bajo nuestra dirección y, una vez concluida, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y, para que conste, expedimos y firmamos el presente informe en Santiago de Compostela a 15 de febrero de 2010.

I. Sándeiz Macho C. Álvarez Lorenzo A. Concheiro Nine

“El experimentador que no sabe lo que está buscando no comprenderá lo que encuentra.”

Claude Bernard, fisiólogo francés.

1813-1878

Índice

1	Introducción	15
1.1	Copolímeros bloque	18
1.1.1	Estructura y tipos	19
1.1.2	Poloxámeros	22
1.1.3	Poloxaminas	26
1.1.4	Toxicidad	28
1.1.5	Aplicación en formulación de medicamentos	32
1.2	Estatinas	39
1.2.1	Generalidades	39
1.2.2	Vías de administración y formas de dosificación	43
1.2.3	Problemas de formulación	43
2	Planteamiento y objetivos	49
3	Trabajos publicados	55
3.1	Tetronic micellization, gelation and drug solubilization: Influence of pH and ionic strength	57
3.2	Self-Associative Behavior and Drug-Solubilizing Ability of Poloxamine (Tetronic) Block Copolymers	69
3.3	Poloxamines and Poloxamers as Polymeric Micellar Carriers for Simvastatin: Interactions at the Air-Water Interface and in Bulk Solution	83
4	Resultados y discusión	99
4.1	Caracterización de los fenómenos de micelización y gelificación de la poloxamina T904 en medios de distinto pH y fuerza iónica	103

4.2 Caracterización de los procesos de autoagregación en medio ácido de diversas poloxaminas	114
4.3 Comportamiento de los copolímeros y sus mezclas con simvastatina en la interfase aire-agua	125
4.3.1 Isotermas π -A de las poloxaminas	125
4.3.2 Isotermas π -A de los poloxámeros	130
4.3.3 Isotermas π -A de los sistemas mixtos copolímero-simvastatina	135
4.4 Capacidad de solubilización de simvastatina	151
4.5 Estabilidad química de la simvastatina y estabilidad física de las micelas	157
5 Conclusiones	163
6 Bibliografía	167

Índice de figuras

<i>Figura 1. Tipos de copolímeros: (a) con disposición aleatoria de los monómeros, (b) dibloque, (c) tribloque con dos bloques iguales, (d) bloque de injerto y (e) bloque en estrella.</i>	<i>20</i>
<i>Figura 2. Estructura general de un poloxámero secuencial (A) y de un poloxámero reverso (B). ...</i>	<i>22</i>
<i>Figura 3. Dependencia de las propiedades de los Pluronic® respecto del peso molecular medio de los bloques hidrofóbicos (BASF enero 2010).</i>	<i>23</i>
<i>Figura 4. Tipos de agregados de copolímeros tribloque en un medio líquido: (a) macromolécula libre o unímero, (b) micela esférica formada en un medio disolvente de los bloques terminales, (c) micela esférica en un disolvente del bloque central, y (d) formación de una red en un disolvente en el que es soluble el bloque central (Pasquali y col. 2005).</i>	<i>25</i>
<i>Figura 5. Estructura general de los Tetronic® (A) y Tetronic® R (B).</i>	<i>27</i>
<i>Figura 6. Relación entre el coeficiente de reparto micela-agua del pireno y la CMC de poloxámeros (Kozlov y col. 2000).</i>	<i>35</i>
<i>Figura 7. Estructura de algunas estatinas utilizadas en la práctica clínica.</i>	<i>41</i>
<i>Figura 8. Esquema del mecanismo de acción de las estatinas.</i>	<i>42</i>
<i>Figura 9. Formas hidroxilado y lactona de las estatinas.</i>	<i>44</i>
<i>Figura 10. Solubilidad de la atorvastatina sódica frente al pH.</i>	<i>45</i>
<i>Figura 11: Mecanismo de interconversión de la forma hidroxilada en lactona.</i>	<i>46</i>
<i>Figura 12. Dependencia de las constantes de equilibrio de la atorvastatina con el pH (Kearney y col. 1993).</i>	<i>47</i>
<i>Figura 13. Perfil potenciométrico de la valoración de T904 con NaOH.</i>	<i>105</i>
<i>Figura 14. Concentración de especies de T904 en función del pH a 25°C.</i>	<i>106</i>
<i>Figura 15. Perfiles calorimétricos del proceso de demicelización del T904 a 37°C en diferentes medios: agua (círculos abiertos), tampón pH 7.4 (triángulos invertidos llenos), tampón pH 5.8 (triángulos llenos), HCl 0.1 M (cuadrados llenos), HCl 0.01 M (triángulos abiertos) y HCl 0.01 M con NaCl 0.9% (triángulo invertido vacío).</i>	<i>107</i>
<i>Figura 16. Microfotografías TEM de T904 al 30% en diferentes medios.</i>	<i>111</i>
<i>Figura 17. Dependencia del módulo de pérdida (G'') del T904 al 30% en medios de distinto pH a 20°C respecto de la frecuencia angular. Agua (círculos), HCl 0.1 M (cuadrados), tampón fosfato pH 7.4 (triángulos) y NaOH 0.02 M (triángulos invertidos).</i>	<i>112</i>
<i>Figura 18. Dependencia de los módulos de almacenamiento (G', símbolos llenos) y pérdida (G'', símbolos vacíos) del T904 al 30% con respecto a la temperatura, para una velocidad angular de 1</i>	

rad/s. Agua (círculos), HCl 0.1 M (cuadrados), tampón fosfato pH 7.4 (triángulos) y NaOH 0.02 M (triángulos invertidos).	112
Figura 19. Solubilidad de griseofulvina en medios de diferente pH (símbolos vacíos) y fuerza iónica (símbolos llenos) en T904 10%. Leyenda: HCl 0.1 M (cuadrados), tampón fosfato pH 5.8 (triángulos), tampón fosfato pH 7.4 (triángulos invertidos), agua (círculos) y disolución NaCl 0.9% (diamantes).	113
Figura 20. Variación del pH con la concentración de poloxamina.	115
Figura 21. Tensión superficial de poloxaminas en HCl 10 mM a 25 °C.	116
Figura 22. Variación de $I_{\text{I}}/I_{\text{III}}$ con la concentración de poloxamina.....	119
Figura 23. Tensión superficial de poloxámeros en HCl 10 mM a 25 °C.....	120
Figura 24. Dependencia de $I_{\text{I}}/I_{\text{III}}$ respecto de la concentración de poloxámero.....	121
Figura 25. Dependencia del logaritmo de la CMC obtenida de los ensayos de fluorescencia frente a la longitud total del segmento hidrofóbico de las poloxaminas (cuatro veces la longitud del segmento PPO de un brazo).	123
Figura 26. Microfotografías TEM de las disoluciones de poloxaminas al 10% en HCl 10 mM previamente tratadas con ácido fosfotúngstico.	125
Figura 27. Isotermas π -A de las poloxaminas empleando HCl 10 mM como subfase.....	126
Figura 28. Isotermas π -A del T901, T904 y T908.	127
Figura 29. Isotermas π -A del T904, T901, T1301 y T150R1.	130
Figura 30. Isotermas π -A de los poloxámeros.	131
Figura 31. Esquema de plegamiento de los poloxámeros en monocapa.	132
Figura 32. Módulo de compresibilidad de monocapas de poloxámeros.	135
Figura 33. Isoterma π -A de la simvastatina pura.	137
Figura 34. Imágenes BAM de la isoterma de simvastatina pura.	137
Figura 35. Estimación de la conformación más estable de la simvastatina en la interfase aire-agua según las predicciones del estudio ab initio-semiempírico.	138
Figura 36. Monocapas mixtas de simvastatina con poloxámeros (a) y áreas de exceso estimadas para las mezclas de poloxámeros con simvastatina (b).	142
Figura 37. Energía libre de exceso estimada para las mezclas de poloxámeros-SV.....	144
Figura 38. Imágenes BAM de monocapas de Pluronic® F87, F127 y P123.	146
Figura 39. Monocapas mixtas de simvastatina con poloxaminas (a) y áreas de exceso estimadas para las mezclas de poloxaminas-SV (b).	147

<i>Figura 40. Energía libre de exceso estimada para las mezclas de poloxamina-SV.</i>	<i>149</i>
<i>Figura 41. Imágenes BAM de mezclas poloxamina-SV.</i>	<i>150</i>
<i>Figura 42. Solubilidad de la simvastatina en disoluciones de poloxámeros.</i>	<i>154</i>
<i>Figura 43. Solubilidad de la simvastatina en disoluciones de poloxaminas.</i>	<i>155</i>
<i>Figura 44. Efecto de la dilución sobre la solubilidad de SV en sistemas micelares de poloxaminas.</i>	<i>159</i>
<i>Figura 45. Efecto de la dilución sobre la solubilidad de la SV en sistemas micelares de poloxámeros.</i>	<i>160</i>

1 Introducción

En los últimos años se está intensificando la búsqueda de sistemas de administración adaptados a las características fisicoquímicas de cada fármaco y capaces de hacer frente a requerimientos terapéuticos específicos. El hecho de que una buena parte de los fármacos considerados como esenciales por la Organización Mundial de la Salud y la gran mayoría de las nuevas entidades químicas candidatas a convertirse en fármacos presenten una baja hidrosolubilidad (Lipinsky 2002; Takagi y col. 2006), supone un importante obstáculo para avanzar en el desarrollo de sistemas de liberación eficaces. Esto explica que la exploración de nuevas estrategias dirigidas a incrementar la solubilidad de moléculas hidrofóbicas, de manera que se puedan alcanzar las concentraciones requeridas en el lugar de absorción, constituya una de las áreas de trabajo más activas, tanto en el ámbito académico como el de la industria farmacéutica.

Entre los procedimientos a los que se suele acudir para abordar un problema de deficiente hidrosolubilidad, cabe citar el uso de cosolventes orgánicos, la micronización, la preparación de dispersiones sólidas, de liposomas o de microemulsiones, la complejación con ciclodextrinas y la preparación de sistemas micelares (Liu 2008). El hecho de que las micelas se formen espontáneamente en medio acuoso hacen particularmente atractiva esta última aproximación. Se trata además de una técnica que no requiere el uso de disolventes orgánicos, respetuosa por lo tanto con el medio ambiente, y que resulta relativamente fácil de implementar a gran escala (Mallick y col. 2007). La incorporación de un fármaco a micelas de tensoactivos de bajo peso molecular conduce a una solubilidad aparente mayor, dando lugar a un gradiente de concentración que facilita el paso a través de las membranas biológicas. Sin embargo, la elevada concentración crítica micelar (CMC) de estos agentes tensoactivos (Rangel-Yagui y col. 2005) obliga a incorporarlos en la formulación

en proporciones altas, lo que puede dar lugar a problemas de toxicidad. Además, las micelas convencionales tienen tendencia a desagregarse rápidamente cuando se diluyen en los fluidos biológicos, dando lugar a la precipitación del fármaco. Los tensoactivos poliméricos permiten soslayar estos inconvenientes puesto que conducen a la formación, a concentraciones relativamente bajas, de estructuras micelares núcleo-corona que cuentan con una elevada estabilidad termodinámica y cinética, y se mantienen como tales durante tiempos prolongados incluso cuando experimentan una dilución extrema (Kabanov y Alakhov 2002; Chiappetta y Sosnik 2007). Los núcleos hidrofóbicos pueden servir como reservorios de fármacos lipofílicos, mientras que las coronas hidrofílicas confieren estabilidad estérica y proporcionan una interfase adecuada para la interacción con el medio biológico. Si la afinidad del fármaco por el núcleo es suficientemente alta, las micelas pueden actuar como sistemas de cesión sostenida. Por otra parte, la corona se puede funcionalizar con grupos que hagan que la micela responda a cambios microambientales (proporcionando sistemas sensibles a estímulos) y/o con moléculas que permite un direccionamiento activo de la micela hacia áreas concretas del organismo (Alvarez-Lorenzo y Concheiro 2008). Recientemente se ha demostrado la utilidad de las micelas poliméricas para mejorar la biodisponibilidad oral de fármacos de baja hidrosolubilidad (Aliabadi y col. 2008; Mondon y col. 2008).

1.1 Copolímeros bloque

Los polímeros bloque ocupan una posición destacada entre los polímeros tensoactivos. La primera referencia a la síntesis de copolímeros bloque data de 1956, acto en el que el investigador de origen polaco Michael Szwarc observó que, en la polimerización aniónica del estireno, las cadenas poliméricas crecían hasta consumir el monómero y que, si se añadía más monómero, el crecimiento

se reanudaba. Szwarc (Szwarc y col. 1956) llamó a estos materiales “polímeros vivientes” porque en el proceso de polimerización no se llega a alcanzar la etapa de terminación. Cuando se agrega un monómero diferente se forma un polímero con bloques monoméricos distintos. Este tipo de macromoléculas con una organización lineal y/o radial de dos o más bloques con diferente composición monomérica recibe el nombre de “copolímero bloque” (IUPAC 1997).

Los avances en los procedimientos de síntesis de polímeros bloque y la creciente capacidad para modular su arquitectura y sus propiedades, los convirtieron en materiales con un enorme potencial en aplicaciones industriales muy diversas (detergentes, estabilizadores de dispersiones, espumantes, emulsificantes, lubricantes) y de manera especial, en la industria farmacéutica (Celso y col. 2002; Chang y col. 2002; Yan-Lei y Hui-Zhou 2003; Iddon y Armes 2006). Las propiedades de biocompatibilidad, emulsificación y gelificación (Hunter y col. 1981; Dumitriu y col. 1990; Almgren y col. 1995; Byeongmoon y col. 1997; Kwon y Okano 1999; Luo y Eisenberg 2001; Nie y col. 2003; Pasquali y col. 2005; Fusco y col. 2006) de algunos copolímeros bloque han llevado a plantear su utilización como estabilizantes de proteínas como componentes de sistemas de liberación de medicamentos y, en el ámbito de la ingeniería genética, para proteger microorganismos frente a daños mecánicos o para vehicular genes (Oishi y Nagasaki 2009).

1.1.1 Estructura y tipos

Los copolímeros bloque suelen estar formados por bloques unidos linealmente de tipo AB, ABA o BAB, siendo A y B cada uno de los bloques. También son posibles otras arquitecturas, como las resultantes de la repetición de unidades formadas por dos bloques (AB) o de la incorporación de una tercera cadena a un polímero de dos bloques (ABC). Otro tipo de copolímeros bloque

son los injertados (*graft copolymer*) y los estrella (*star copolymer*). Los copolímeros injertados están formados por una cadena principal de la que cuelgan bloques laterales de uno o más monómeros. La configuración de las cadenas laterales puede ser distinta a la de la cadena principal. Los copolímeros estrella presentan un punto a partir del cual se ramifican diferentes cadenas lineales (Pasquali y col. 2005).

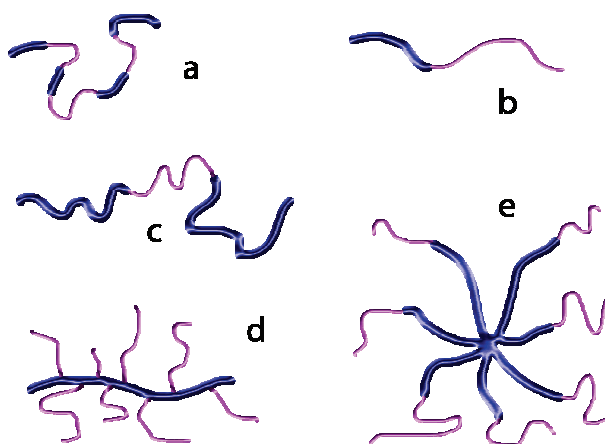


Figura 1. Tipos de copolímeros: (a) con disposición aleatoria de los monómeros, (b) dibloque, (c) tribloque con dos bloques iguales, (d) bloque de injerto y (e) bloque en estrella.

La naturaleza y la organización de los bloques (arquitectura polimérica) condicionan las propiedades del copolímero y en particular, su comportamiento en disolución.

El estudio de las dispersiones coloidales de copolímeros bloque se desarrolló a partir de las primeras observaciones de Merret y Molau en la década de 1960 hasta alcanzar un importante desarrollo en la actualidad (Merret 1954; Molau 1971). Las contribuciones experimentales y teóricas al conocimiento de estos copolímeros han sido objeto de amplias revisiones

(Helfand y Wasserman 1980; Alexandridis y col. 1994; Tuzar 1995; Hong-Quan y Dong 1999; Riess 2003; Chiappetta y Sosnik 2007; Oishi y Nagasaki 2009). El creciente interés por los copolímeros bloque se debe, en buena medida, a sus peculiares propiedades de asociación que se derivan del carácter anfifílico de muchos de ellos. Cuando el copolímero se dispersa en un disolvente favorable termodinámicamente para la solubilización de uno de los bloques y desfavorable para el otro, se produce la asociación de cadenas del copolímero, de manera que el bloque con más baja afinidad por el disolvente minimiza su contacto con éste. Cuando la concentración es baja, el bloque menos afín promueve que el copolímero se disponga en la interfase disolvente-aire. Si se supera un cierto valor de concentración, la concentración crítica micelar (CMC), se forman agregados micelares parecidos a los que originan los tensoactivos de bajo peso molecular. Cuando el disolvente es el agua, las micelas están constituidas por un núcleo de bloques hidrofóbicos rodeado por una corona de bloques hidrofílicos. Estas micelas suelen ser esféricas y presentan una distribución de tamaños bastante homogénea (Riess 2003). Por encima de la CMC, las micelas están en equilibrio con las cadenas individualizadas de copolímero (unímeros).

La dependencia de la CMC respecto de la arquitectura del copolímero se estudió en copolímeros con segmentos de poli(óxido de etileno) (PEO) y poli(óxido de butileno) (PBO). Desde un punto de vista entrópico, la formación de micelas es más favorable para los copolímeros dibloque que para los tribloque, debido a que los copolímeros dibloque no necesitan adoptar una conformación plegada para formar las estructuras núcleo-corona (Alexandridis y col. 1994).

Las propiedades físico-químicas de los copolímeros bloque dependen de las características de cada bloque y de su disposición espacial. Se pueden

Los copolímeros Pluronic® se designan mediante claves formadas por una letra, que hace referencia a la forma física que presentan a temperatura ambiente (“L” para líquidos, “P” para pastas y “F” para escamas sólidas), seguida de un número (Figura 3). Multiplicando por 300 el primer dígito, o los dos primeros en los números con tres dígitos, se obtiene la masa molecular de la parte lipofílica. El último dígito, multiplicado por 10, indica aproximadamente el porcentaje de masa molecular que corresponde a la parte hidrofílica. Por ejemplo, el Pluronic® F68 es un copolímero sólido con una parte hidrofóbica de masa molecular de aproximadamente 1800 (6 x 300) y en el que la masa de la parte hidrofílica es aproximadamente el 80% (8 x 10) (Pasquali y col. 2005).

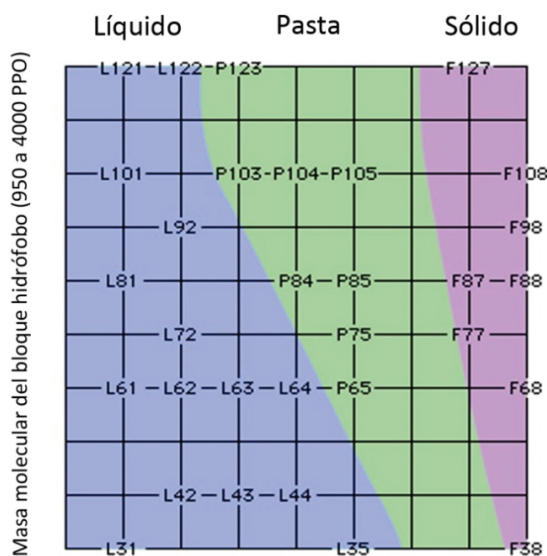


Figura 3. Dependencia de las propiedades de los Pluronic® respecto del peso molecular medio de los bloques hidrofóbicos (BASF enero 2010).

En la Tabla 1 se recogen las características de las variedades disponibles en el mercado. La masa molecular de los poloxámeros está comprendida entre 1000 g/mol y 15000 g/mol, constituyendo el PEO entre el 10 y el 80 por ciento de

la masa. El pH aparente de sus dispersiones acuosas al 2.5% se sitúa entre 5 y 7.5.

Pluronic®	INCI	Forma	Peso molecular medio	Viscosidad (cps)	HLB	Cloud point (1% en agua)	Solubilidad*	Tensión superficial* (0.1 %, dinas/cm)
L35	105	Líquido	1900	375 (25 °C)	18-23	73 °C	> 10%	49
F38	108	Sólido	4700	260 (77 °C)	>24	>100 °C	> 10%	52
L43	123	Líquido	1850	310 (25 °C)	7-12	30-34 °C	> 10%	47
L61	181	Líquido	2000	325 (25 °C)	1-7	24 °C	Insoluble	-
L64	184	Líquido	2900	850 (25 °C)	12-18	58 °C	> 10%	43
F68	188	Sólido	7680	1000 (70 °C)	>24	> 100 °C	> 10%	50
L81	231	Líquido	2750	475 (25 °C)	1-7	20 °C	Insoluble	-
P85	235	Pasta	4600	310 (25 °C)	12-18	85 °C	> 10%	42
F87	238	Granulado	7700	700 (77 °C)	> 24	>100 °C	> 10%	44
L92	282	Líquido	3650	700 (25 °C)	1-7	14-18 °C	> 1%	36
F98	288	Sólido	9800	2700 (77 °C)	>24	>100 °C	> 10%	43
L121	401	Líquido	4400	1200 (25 °C)	1-7	14 °C	< 1%	33
P123	403	Pasta	5750	350 (60 °C)	7-12	90 °C	> 10%	34
F127	407	Granulado	12600	3100 (77 °C)	18-23	> 100 °C	> 10%	41

*: En agua a 25°C. INCI: International Nomenclature of Cosmetic Ingredients.

Tabla 1. Características de algunos poloxámeros disponibles actualmente en el mercado (BASF diciembre 2009).

La marcada dependencia de la solubilidad en agua del bloque PPO respecto de la temperatura explica que, con una misma concentración de polímero, las cadenas se encuentren libres o asociadas dependiendo de la temperatura. La estructura micelar más frecuente es la formada por un núcleo, en el que predominan los segmentos PPO, rodeado por una corona de bloques PEO hidratados. Una vez formadas las micelas, si la temperatura sigue aumentando, éstas se asocian en una estructura cúbica tridimensional que se

manifiesta en un marcado incremento de la viscosidad del sistema. El proceso de gelificación es reversible y, para algunas variedades de poloxámero, ocurre a una temperatura próxima a la fisiológica lo que los hace muy útiles en el desarrollo de sistemas de gelificación *in situ* (Li y col. 2008). La arquitectura molecular, el número y la disposición de los bloques PEO y PPO determinan la sensibilidad a la temperatura y la morfología de los agregados que se forman bajo diferentes condiciones (Almgren y col. 1995; Loh 2002; BASF abril 2009).

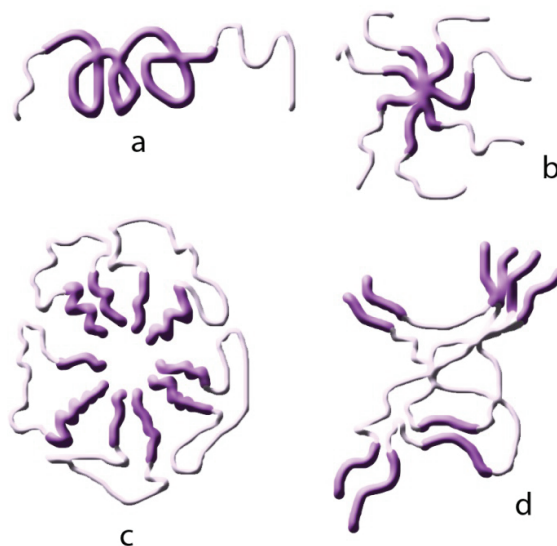


Figura 4. Tipos de agregados de copolímeros tribloque en un medio líquido: (a) macromolécula libre o unímero, (b) micela esférica formada en un medio disolvente de los bloques terminales, (c) micela esférica en un disolvente del bloque central, y (d) formación de una red en un disolvente en el que es soluble el bloque central (Pasquali y col. 2005).

1.1.2.1 Influencia de la estructura en el proceso de micelización

Al aumentar la longitud del bloque PPO, la CMC se reduce (Alexandridis y col. 1994). Para una determinada concentración de copolímero, el valor de la temperatura crítica micelar (CMT) se reduce a medida que aumenta el número de unidades PPO, es decir, los copolímeros con mayor dominio hidrofóbico forman micelas a temperatura más baja. Para un tamaño dado del bloque PPO, los incrementos en el número en unidades PEO elevan la CMC y la CMT. Por lo tanto, la formación de micelas es más difícil cuanto más hidrofílico es el polímero. No obstante, la repercusión de las diferencias en contenido en unidades EO es menos acusada que la de los cambios en el número de unidades PO, que intervienen de manera más activa en el proceso de micelización. Para una relación PO/EO constante, los Pluronic[®] con mayor peso molecular forman micelas a concentración más baja. La sensibilidad de la CMC a la temperatura y de la CMT a la concentración es mucho más acusada en los poloxámeros que en los tensoactivos convencionales (Alexandridis y col. 1994).

1.1.3 Poloxaminas

A diferencia de los Pluronic[®], las poloxaminas (Tetronic[®]) presentan una estructura en forma de X con un grupo etilendiamino central unido a cuatro cadenas de PPO-PEO. Las poloxaminas están disponibles en forma secuencial y en forma reversa (Figura 5), con una amplia variedad de pesos moleculares, relaciones EO/PO y HLB (Tabla 2). Las variedades de estructura secuencial se obtienen por procedimientos de síntesis en los que primero se hace reaccionar el aceptor etilendiamino con un grupo PO y, a continuación, con el grupo EO de manera que los cuatro brazos cuenten con grupos EO terminales. Esta disposición en forma de X las dota de un comportamiento diferente al de sus homólogos poloxámero y de sensibilidad a diversos estímulos (Alexandridis y col.

Tetronic	Forma	Peso molecular medio	Viscosidad (cps)	HLB	Cloud point (1% en agua)	Solubilidad*	Tensión superficial* (0.1 %, dinas/cm)
304	Líquido	1650	450 (25 °C)	12-18	75 °C	> 10%	53
701	Líquido	3600	600 (25 °C)	1-7	16-19 °C	< 1%	36
901	Líquido	4700	700 (25 °C)	1-7	20 °C	Insoluble	36
904	Pasta	6700	320 (60°C)	12-18	74 °C	> 10%	35
908	Líquido	25000	8200 (77 °C)	> 24	> 100 °C	> 10%	46
1107	Granulado	15000	1100 (70 °C)	18-23	> 100 °C	> 10%	43
1301	Líquido	6800	1000 (25 °C)	1-7	16 °C	< 1%	33
1307	Granulado	18000	2700 (77 °C)	> 24	> 100 °C	> 10%	44
150R1	Líquido	8000	-	1-7	20 °C	Insoluble	Insoluble
90R4	Líquido	6900	3870 (25 °C)	1-7	39-44 °C	> 10%	43

*: En agua a 25°C

Tabla 2. Características de algunas poloxaminas disponibles actualmente (BASF diciembre 2009).

1.1.4 Toxicidad

Los poloxámeros se sintetizan a presiones y temperaturas elevadas a partir de propilenglicol, al que se adiciona óxido de propileno y a continuación óxido de etileno. La síntesis se lleva a cabo en medio alcalino, procediéndose a la neutralización al final de la reacción de polimerización. Como contaminante de los poloxámeros se pueden encontrar pequeñas cantidades de 1,4-dioxano, que es un producto secundario de etoxilación. Los límites en las concentraciones finales de óxido de etileno, óxido de propileno y 1,4-dioxano, se han establecido en 1, 5 y 5 ppm respectivamente (Singh-Joy y McLain 2008).

Los poloxámeros y las poloxaminas se excretan por vía renal. La semivida de eliminación plasmática depende del estado de agregación; por ejemplo, para

el Pluronic® P85 la semivida de eliminación es de 60 horas como unímero y de 90 horas en forma micelar (Batrakova y col. 2004).

1.1.4.1 Vía tópica

Los estudios de seguridad de los poloxámeros se han centrado mayoritariamente en la vía tópica, dada su amplia utilización en la industria cosmética. De acuerdo con la información publicada por el Cosmetic Ingredient Review (CIR) Expert Panel (Singh-Joy y McLain 2008), los poloxámeros 101, 105, 108, 122, 123, 124, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 212, 215, 217, 231, 234, 237, 238, 282, 284, 288, 331, 333, 334, 335, 338, 401, 402, 403, 407, el poloxámero 105 benzoato y el poloxámero 182 dibenzoato, están considerados como componente seguros en formulación cosmética.

La aplicación sobre la piel de poloxámero 184 (Pluronic® L64) a una dosis de 1000 mg/kg produjo eritema leve y respuesta inflamatoria intradérmica en ratas (New Zealand), pero no alteró el peso corporal total ni tampoco el perfil bioquímico ni el hepatograma (Singh-Joy y McLain 2008).

1.1.4.2 Vía oral

El primer estudio sobre toxicidad oral aguda de los poloxámeros en animales fue realizado por Leaf en 1967 (Leaf 1967). Este investigador administró a ratas albinas poloxámeros 124, 182, 188 y 235 en dosis únicas comprendidas entre 1-15 g/Kg. Los animales se sometieron a observación desde 24 horas antes hasta una semana después de la ingesta. La necropsia de las ratas que murieron en el estudio reveló un aumento del tamaño de los pulmones, distensión gástrica y dilatación vascular masiva en el intestino. La dosis letal 50% (DL₅₀) se estimó en 5, 5.5, >15 y >34.6 g/Kg para los poloxámeros 124, 182, 188 y 235, respectivamente. Comai y Sullivan (Comai y Sullivan 1980) estudiaron la

toxicidad del poloxámero 188 y 331 incluyéndolos en la dieta (3% de polímero) de ratas hembra (Charles River CD) y no observaron reacciones adversas.

1.1.4.3 Vía parenteral

Port y col. (1978) administraron infusiones intermitentes de hasta 4 g/kg de poloxámero 108 (Pluronic® F68) a ratas (Sprague-Dawley) de 142 a 232 g; sin que se produjesen alteraciones en el peso corporal. Sin embargo, se observó vacuolización hepatocelular difusa, dilatación de los túbulos renales y vacuolización de las células epiteliales en el túbulo contorneado proximal (Port y col. 1978).

Johnston y Miller (Johnston y Miller 1985) evaluaron la toxicidad aguda por vía intramuscular de distintas variedades de poloxámero (238, 335, 403 y 407), administrando inyecciones intramusculares de 1 mL de poloxámero 25% (p/p) en NaCl 0.9% (p/v) a conejos en intervalos de 24 h durante 5 días. La necropsia muscular efectuada transcurridas 24 horas desde la última administración, reveló que los poloxámeros 355 y 403 daban lugar a un incremento de la creatin-fosfoquinasa (CPK) mientras que los 238 y 407 no produjeron cambios significativos respecto de un grupo control. Los autores concluyeron que los altos niveles de CPK, indicativos de toxicidad muscular, son directamente proporcionales a la lipofilia de los poloxámeros; a mayor lipofilia del polímero, mayor daño muscular.

En humanos, Schaer y col. (1996) investigaron los efectos de la administración intravenosa de poloxámero 188 (150 mg/mL en suero salino 0.9 %) en 114 pacientes con infarto agudo de miocardio sometidos a tratamiento trombolítico. No se evidenciaron signos de toxicidad en ningún órgano ni efectos hemodinámicos indeseados.

1.1.4.4 Vía inhalatoria

La toxicidad por inhalación a corto plazo se ha estudiado en ratas albinas (Dawley, 271 y 306 g) para el poloxámero 101 (Pluronic® L31) a una concentración en el aire de 97 mg/m³, detectándose una ligera alveolitis tras 2 semanas de exposición (Ulrich y col. 1992).

1.1.4.5 Vía ocular

Leaf estudió la toxicidad ocular de los poloxámeros 124, 182 y 235 instilándolos en el ojo derecho de conejos (Leaf 1967). Los poloxámeros 124 y 182 fueron ensayados al 100%, 75%, 50% y 25% (p/v). El poloxámero 235 es una pasta y se administró directamente. Los conejos se mantuvieron en observación durante 10 días, midiéndose la irritación producida se midió con la escala Draize. El primer día los tres poloxámeros mostraron irritación dosis-dependiente. El poloxámero 182 fue el que produjo unos efectos más prolongados, seguidos del 235. La baja toxicidad de los poloxámeros a nivel ocular se confirmó en otros estudios (Beom-Jin y col. 1997).

1.1.4.6 Actividad teratógena

Los resultados del test de Ames en bacterias con el poloxámero 407 (Pluronic® F127) no revelaron actividad teratógena (Marino 1987).

1.1.4.7 Estatus regulatorio

La United States Pharmacopeia – National Formulary (USP33/NF28) y la European Pharmacopoeia (6ª Edición) incluyen monografías de los poloxámeros 124 (Pluronic® L44), 188 (Pluronic® F68), 237 (Pluronic® F87) y 407 (Pluronic® F127). La British Pharmacopoeia 2009 recoge además una monografía para el poloxámero 338 (Pluronic® F108NF).

La FDA incluye a los poloxámeros en la lista de aditivos indirectos de alimentos. Además, el poloxámero 188 (Pluronic® F68) está aprobado como agente antibacteriano para productos dermatológicos. En Europa, los poloxámeros se pueden emplear en cosméticos y productos de cuidado personal de acuerdo con lo establecido en las disposiciones generales de la Directiva de Cosméticos de la Unión Europea.

1.1.5 Aplicación en formulación de medicamentos

La capacidad de los núcleos de las micelas de poloxámeros y poloxaminas para albergar moléculas hidrofóbicas, junto con su disponibilidad comercial y elevada biocompatibilidad, los hacen especialmente atractivos para la formulación de fármacos (Gadelle y col. 1995; Nagarajan 1996; Nadja y Goymann 2008). Algunos poloxámeros se han utilizado ya, solos o combinando distintas variedades, para formular agentes citostáticos (doxorrubicina), antifúngicos (sertaconazol), ino/cronotropos (digoxina) u hormonas (estradiol, deslorelina) (Alakhov y col. 1999; Batrakova y col. 2001; Wenzel y col. 2002; Barreiro-Iglesias y col. 2005; Rodríguez-Perez y col. 2006). También se ha propuesto su uso en combinación con otros excipientes como por ejemplo ciclodextrinas para desarrollar sistemas de liberación controlada (Rodríguez-Perez y col. 2006).

En la relación de “inactive ingredient search for approved drug products” de la FDA, se indica que el poloxámero 124 forma parte ya de medicamentos para vía oral y tópica hasta una concentración de 0.20%, el poloxámero 182 de formas tópicas hasta el 0.20%, el poloxámero 188 de formas orales (66.9 mg o 10%), tópicas (0.20%), oftálmicas (0.10%) subcutáneas (0.30%) e intravenosas (0.60%) y el poloxámero 407 en formas orales (100 mg o 12.6%), tópicas (1%), periodontal (15.5%) y oftálmica (0.20%).

En la Tabla 3 se recogen algunos de los medicamentos comercializados en España que incorporan un poloxámero como excipiente.

Los usos comerciales de las poloxaminas abarcan desde la industria del petróleo, donde son usados a concentraciones relativamente altas como agentes antiespumantes y desemulsificadores (Barreiro-Iglesias y col. 2004; Wu y col. 2005) y en el campo de los productos de limpieza de lentillas, donde las poloxaminas son incorporadas con el fin de eliminar las proteínas adsorbidas, aumentando la sensación de confort (Tonge y col. 2001; Subbaraman y col. 2006).

Medicamento	Principio activo	Formulación	Poloxámero
Rulide 150 mg	roxitromicina	comprimidos	185
Repaglinida Teva 0.5 mg EFG	repaglinida	comprimidos	188
Differine 30 g	adapaleno	crema	182
Norditropin simplex 10 mg/mL	somatropin	solución inyectable	188
Aprovel 150 mg	irbesartan	comprimidos	188
Tasigna 200 mg	nilotinib	comprimidos	188
Issentress 400 mg	raltegravir	comprimidos	407
Rapamune 1 mg/mL	sirolimus	solución oral	188
Neurontin 300 mg	gabapentina	comprimidos	407

Tabla 3. Ejemplos de medicamentos con poloxámeros en su composición. Fuente: ficha técnica. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

Aunque todavía escasos, los estudios llevados a cabo en el campo farmacéutico y biomédico han mostrado el potencial de las poloxaminas como componentes de formulaciones transdérmicas (Capel y Kreuter 1991),

reestructurantes de tejidos (Cellesi y Tirelli 2005; Sosnik y col. 2005; Sosnik y Sefton 2005) y en ingeniería de nanopartículas (Moghimi y Hunter 2000).

1.1.5.1 Poloxámeros y poloxaminas como agentes hidrosolubilizantes

La eficacia solubilizante de las micelas de copolímeros bloque se suele expresar en términos de *coeficientes de reparto micela-agua*, que se define como la relación entre la concentración de soluto por micela y la concentración en el medio dispersante. La *capacidad de solubilización* se puede expresar como cantidad de soluto en la micela por gramo de bloque o por segmento hidrófobo (Rangel-Yagui y col. 2005).

La capacidad de solubilización del núcleo micelar de los copolímeros bloque PPO-PEO está relacionada con el parámetro de interacción de Flory-Huggins, que se puede calcular a partir de los parámetros de solubilidad δ_s y δ_{core} para el soluto (s) y el bloque formador del núcleo, utilizando la siguiente expresión (Tuzar y col. 1988; Munch y Gast 1989; Tuzar 1995):

$$\chi_{s,\text{núcleo}} = \frac{(\delta_s - \delta_{\text{núcleo}}) \cdot v_s}{kT} \quad \text{Ecuación 1}$$

en la que v_s es el volumen molar del soluto s; k la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta.

Las micelas con el soluto incorporado se encuentran en un estado de pseudo-equilibrio con el soluto libre en el medio y el copolímero bloque en disolución (Nagarajan 1996). Se han desarrollado aproximaciones teóricas para predecir la capacidad de solubilización micelar en función de las dimensiones del núcleo hidrófobo de PPO y de la corona hidrofílica de PEO. Para los copolímeros dibloque PEO-PPO en agua, utilizando benceno como soluto, se puede demostrar

que la fracción de volumen de soluto en el interior de la micela (η), se relaciona con el tamaño de los segmentos PEO (N_B) y PPO (N_A) de la siguiente manera (Nagarajan y Ganesh 1989): $\eta \sim N_B^{0.17} N_A^{-0.07}$

En comparación con los tensoactivos clásicos de bajo peso molecular, los Pluronic® presentan una mayor capacidad de solubilización y tienen más afinidad por los compuestos aromáticos y heterocíclicos que por los alifáticos (Nagarajan 1996). El potencial de los copolímeros bloque en solubilización de fármacos reside en la posibilidad de modular sus características físico-químicas dentro de intervalos amplios, modificando la composición y la arquitectura de los bloques que constituyen los unímeros. En este sentido, resulta muy ilustrativa la relación entre el coeficiente de reparto de pireno y la CMC encontrada en los poloxámeros (Figura 6).

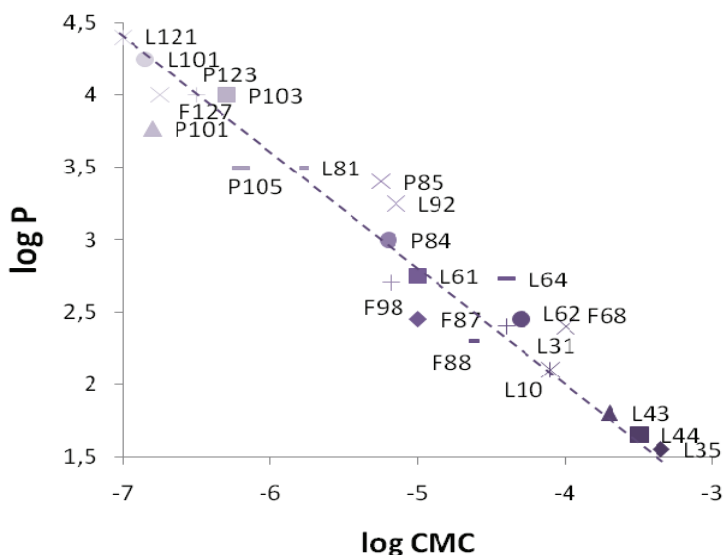


Figura 6. Relación entre el coeficiente de reparto micela-agua del pireno y la CMC de poloxámeros (Kozlov y col. 2000).

Los copolímeros situados en la zona superior izquierda de la Figura 6 presentan una menor CMC y un mayor P, y se caracterizan por dar lugar a la formación de micelas muy estables y con gran capacidad de retención del soluto. Por el contrario, los situados en la esquina inferior derecha, dan lugar a valores más altos de CMC y más bajos de P, disgregándose y liberando el soluto rápidamente tras la dilución.

La estabilidad de una micela de copolímeros bloque se puede analizar en términos estáticos - estabilidad termodinámica - y dinámicos - estabilidad cinética (Alakhov y Kabanov 1998). La CMC y el coeficiente de reparto son las dos constantes termodinámicas que determinan la estabilidad micelar de carga y la liberación de fármaco en condiciones de equilibrio. La dilución, al entrar en contacto con los fluidos biológicos (ej. en sangre), puede provocar la rotura de las micelas si la concentración del polímero en el sistema cae por debajo de la CMC. Este proceso, a diferencia de lo que se observa con las micelas convencionales, no se produce de manera inmediata en las micelas poliméricas, como se explica más adelante.

Las micelas de poloxámero presentan un diámetro comprendido entre 10 y 100 nm (Kabanov y col. 1995). En algunos casos, el núcleo micelar formado por los bloques PPO es capaz de transportar grandes cantidades (hasta el 20-30 % en peso) de fármacos insolubles (Kozlov y col. 2000). En la Tabla 4 se muestran los valores de la CMC y del número de agregación de varios tensoactivos de uso habitual. Como puede observarse, los valores de CMC de los tensoactivos no iónicos de bajo peso molecular son muy superiores a los de los copolímeros tribloque (Tummino y Gafni 1993; Alexandridis y col. 1994; Sharma y Bhatia 2004).

Las micelas de copolímeros bloque presentan una elevada estabilidad cinética con su prolongado tiempo de relajación, disociándose lentamente tras la dilución a concentraciones inferiores a la CMC. El movimiento del fármaco en el interior de la micela es relativamente lento, como consecuencia del elevado grado de empaquetamiento de los unímeros, que da lugar a micelas de vida media larga y que liberan paulatinamente el principio activo (Allen y col. 1999).

Agente tensoactivo	Peso molecular (g/mol)	CMC (mM)	CMC (%)	Número de agregación	Tipo
Óxido de Decildimetilfosfina (APO-10)	218.3	4.6	0.100	131	No iónico
Dodecil sulfato sódico (SDS)	288.4	8	0.231	62	Aniónico
Triton X-100	625	0.2-0.9	0.031	100-155	No iónico
BRIJ-25	1200	0.09	0.011	40	No iónico
Tween 80	1310	0.012	0.002	58	No iónico
Dodecil-β-D-maltosido (DDM)	4100	0.15	0.062	98	No iónico
Pluronic® F127	12600	0.555	0.699	88	No iónico
Pluronic® P123	5750	0.052	0.030	-	No iónico
Pluronic® P103	4950	0.141	0.070	-	No iónico
Tetronic® T803	5500	0.022	0.012	-	No iónico

Tabla 4. Concentraciones críticas micelares de algunos tensoactivos.

Los estudios realizados con sondas fluorescentes (Dipyme) demuestran que tanto los poloxámeros como las poloxaminas, presentan núcleos micelares con microviscosidad significativamente mayor que la encontrada con tensoactivos no iónicos convencionales (Nivaggioli y col. 2002; Grant y col. 2005).

La corona hidrofílica formada por los bloques PEO dota a las micelas de una gran estabilidad estérica que evita su agregación y proporciona una interfase hidrofílica que dificulta la adsorción de proteínas y el reconocimiento por las células del sistema inmunitario. La incorporación en la corona de moléculas con capacidad de reconocimiento selectivo de estructuras tisulares o celulares permite desarrollar sistemas vectorizables (Kabanov y col. 2002).

Tanto las micelas como los unímeros de Pluronic® juegan un importante papel en la eficacia terapéutica de los tratamientos (Yokohama 1992; Stolnik y col. 1995; Kwon y Kataoka 1999; Kwon y Okano 1999). Permiten mejorar la biodisponibilidad oral de diversos fármacos (Batrakova y col. 1998) y se han obtenido resultados muy alentadores en el transporte de fármacos a través de la barrera hematoencefálica (Kabanov y col. 2003) y en la vectorización de agentes antineoplásicos a tejidos tumorales (Alakhov y col. 1999). Los unímeros de Pluronic® pueden actuar como inhibidores de la glicoproteína-P responsable del eflujo de algunos fármacos (Seelig y Gerebtzoff 2006) y, en particular, de la multiresistencia de las células cancerosas frente a los agentes quimioterápicos (Alakhov y col. 1996; Ulbrich y Ubr 2004; Gaucher y col. 2005; Batrakova y Kabanov 2009). Por lo tanto, la visión de los copolímeros bloque ha evolucionado desde un planteamiento inicial de vehículos inertes hacia su consideración como estructuras modificadoras de la respuesta biológica, confiriéndoles un gran potencial como componentes de sistemas avanzados de liberación de medicamentos (Sosnik y Sefton 2005). En la Tabla 5 se recogen algunas aplicaciones, adicionales a las relacionadas directamente con su capacidad solubilizante, de los poloxámeros y las poloxaminas.

Aplicación	Referencia
Nanopartículas en tecnología de imagen médica	(Li y col. 1994)
Nanopartículas esplenotrópicas	(Moghimi y col. 1991)
Nanopartículas linfotrópicas	(Moghimi y col. 1993)
Geles de liberación lenta	(Nalbandian y col. 1987)
Adyuvante en formulación de vacunas	(Newman y col. 1998)
Sensibilización de células multiresistentes a fármacos	(Batrakova y col. 1999)
Sellado de membranas celulares	(Hannig y col. 1999)

Tabla 5. Potenciales aplicaciones biomédicas de poloxámeros y poloxaminas.

1.2 Estatinas

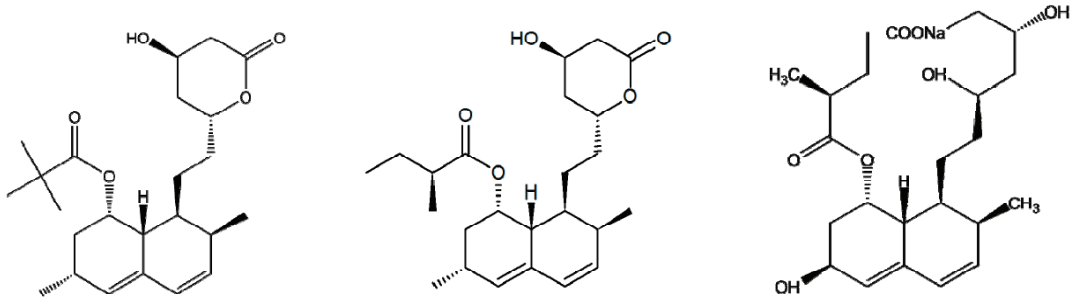
1.2.1 Generalidades

La hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) regula la velocidad de síntesis de colesterol endógeno en el hígado y en otros tejidos. Es un tetrámero compuesto por cuatro monómeros idénticos que contribuyen a la formación del sitio activo de la enzima. El colesterol y los isoprenoides ejercen un retrocontrol negativo sobre la expresión del gen que codifica la producción de HMG-CoA reductasa (Brown y Goldstein 1980).

La mevastatina y la lovastatina, producidas por el *Penicillium citrinum* y el *Aspergillus terreus*, respectivamente, presentan una marcada similitud estructural con el sustrato biológico de la HMG-CoA reductasa, la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A. La mevastatina y la lovastatina interfieren en la transformación de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A en ácido mevalónico y, por lo tanto, inhiben la síntesis del colesterol. La elevada toxicidad de la mevastatina impide su uso clínico. En cambio, la lovastatina, en su forma lactónica natural, se comporta como un profármaco que en el hígado se hidroliza a la forma activa (hidroxiácido). A partir de la lovastatina se sintetizaron la simvastatina (derivado metilado) y la pravastatina (derivado hidroxilado). En la actualidad, se utilizan en la clínica tres estatinas derivadas del metabolismo

fúngico, la lovastatina, la pravastatina y la simvastatina, y otras de origen sintético, la fluvastatina y la atorvastatina, consideradas de segunda generación, y la rosuvastatina, la cerivastatina y la pitavastatina, de última generación. Todas las estatinas tienen una mayor afinidad por el sitio activo de la HMG-CoA reductasa que la propia hidroximetilglutaril CoA y actúan como inhibidores competitivos, dificultando la síntesis y reduciendo el contenido intracelular de colesterol (Stancu y Sima 2001). No obstante, la estructura de las estatinas (Figura 7) determina la afinidad por el sitio activo y está relacionada con su potencia.

Los estudios sobre el mecanismo de acción de las estatinas revelan que, al reducirse la concentración intracelular de colesterol, se activa una proteasa que libera proteínas reguladoras del retículo endoplasmático (Figura 8). A nivel nuclear, esas proteínas facilitan la expresión del gen que codifica al receptor B/E (Nissen S y col. 2004). Una mayor disponibilidad de receptores B/E en la membrana celular tiene como consecuencia la captura mediante endocitosis - principalmente en el hígado, las glándulas suprarrenales y el tejido graso- de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y de otras lipoproteínas. Esto causa una caída en el nivel de colesterol LDL (17 a 54%), un ligero aumento (5 a 10%) del colesterol HDL (lipoproteína de alta densidad) y una reducción en el nivel de triglicéridos. La repercusión de estos cambios en el perfil de lípidos depende de la naturaleza y la dosis de estatina (Maron y col. 2000). El máximo efecto sobre los niveles sanguíneos de lipoproteínas se consigue después de 4 a 6 semanas de tratamiento (Jones y col. 1998).

**Simvastatina**

CAS: 79902-63-9

418,57 g/mol

Lovastatina

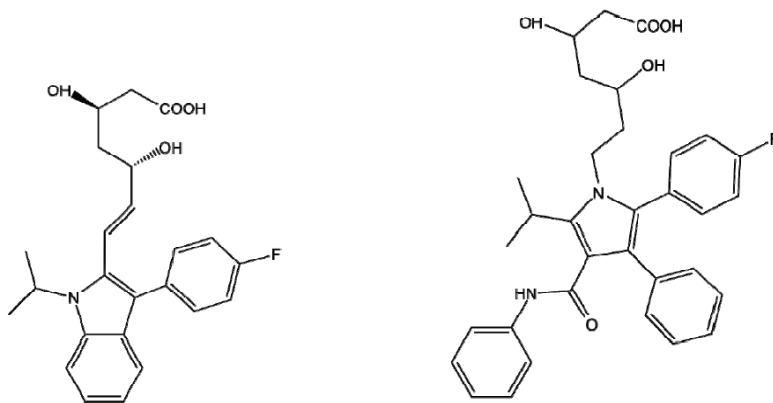
CAS: 75330-75-5

404,54 g/mol

Pravastatina

CAS: 81093-37-0

424,53 g/mol

**Fluvastatina**

CAS: 93957-54-1

411,47 g/mol

Atorvastatina

CAS: 134523-00-5

558,64 g/mol

Figura 7. Estructura de algunas estatinas utilizadas en la práctica clínica.

También se ha demostrado que las estatinas inhiben el antígeno 1 asociado con la función de los linfocitos (LFA-1) (Frohlich 2001). La LFA-1 es una glicoproteína de la familia de las integrinas expresada por la superficie de los leucocitos. Cuando la LFA-1 es activada por determinados receptores, se une a la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1 o CD54) y estimula la extravasación de los leucocitos y la activación de los linfocitos T. Por lo tanto, la LFA-1 se

comporta como un agente proinflamatorio y su inhibición es beneficiosa en procesos como la artritis reumatoide y el rechazo de homoinjertos. La lovastatina, la simvastatina y, en menor grado otras estatinas, inhiben la LFA-1 (Kallen 1999) actuando como agentes antiinflamatorios y antiaterogénicos.

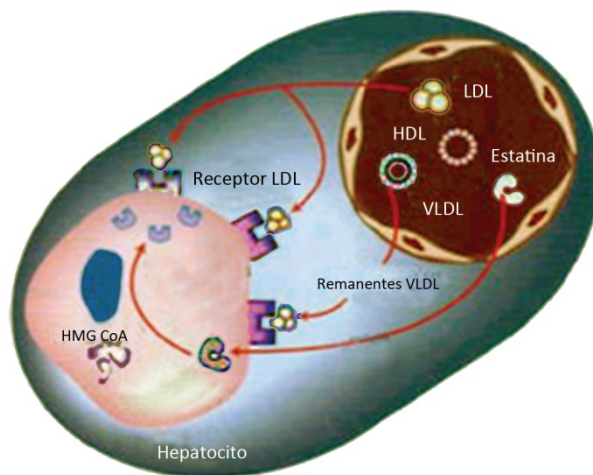


Figura 8. Esquema del mecanismo de acción de las estatinas.

Entre los efectos adversos más frecuentes –que en general son leves y transitorios- se han descrito estreñimiento, náuseas, dolor abdominal, diarrea, flatulencia, insomnio y cefalea (Black y col. 1998). La toxicidad de las estatinas sobre el músculo estriado es un efecto adverso poco frecuente (0.1%) pero de especial relevancia clínica (Maron y col. 2000). Su intensidad varía desde mialgias no específicas hasta miositis, que en raras ocasiones evoluciona a rabdomiolisis, un proceso que puede conducir a la muerte por insuficiencia renal aguda. Se cree que la predisposición de ciertos individuos a sufrir este tipo de problemas está relacionada con una deficiencia enzimática (Lofberg y col. 1998). La muerte de más de 50 pacientes en todo el mundo por este síndrome, determinó que Bayer

retirara voluntariamente la cerivastatina del mercado mundial el 8 de agosto de 2001.

1.2.2 Vías de administración y formas de dosificación

En la actualidad las estatinas se utilizan ampliamente como antihiperlipidemiantes por vía oral. En la Tabla 6 se recogen algunos ejemplos de formulaciones comercializadas en la actualidad.

Los resultados de recientes investigaciones acerca de su eficacia en el tratamiento de otras patologías como la enfermedad de Alzheimer o la artritis reumatoide, y su capacidad estimulante del desarrollo del tejido óseo sugieren la necesidad de desarrollar sistemas de liberación adecuados a los requerimientos de otras vías de administración (Tandon y col. 2005; McGuinness y col. 2009).

Principio activo	Dosis (mg)	Forma farmacéutica	Vía	Posología habitual
<i>Pravastatina</i>	10, 20, 40	Comprimidos	oral	c/ 24 h
<i>Simvastatina</i>	10, 20, 40	Comprimidos recubiertos	oral	c/ 24 h
<i>Atorvastatina</i>	10, 20, 40, 80	Comprimidos recubiertos	oral	c/ 24 h
<i>Lovastatina</i>	20, 40	Comprimidos	oral	c/ 24 h
<i>Fluvastatina</i>	20, 40	Cápsulas	oral	c/ 24 h
	80	Comprimidos de liberación prolongada		
<i>Rosuvastatina</i> *	10, 20	Comprimidos recubiertos	oral	c/ 24 h

* No comercializado en España.

Tabla 6. Ejemplos de estatinas comercializadas en la actualidad.

1.2.3 Problemas de formulación

Las estatinas se administran como sal sódica de la forma activa hidroxíácido (ej. pravastatina) o en forma de lactona (ej. simvastatina y

lovastatina). La forma lactónica es un profármaco que da lugar a la forma activa *in vivo* por rotura del anillo (Bottford 2004) (Figura 9).

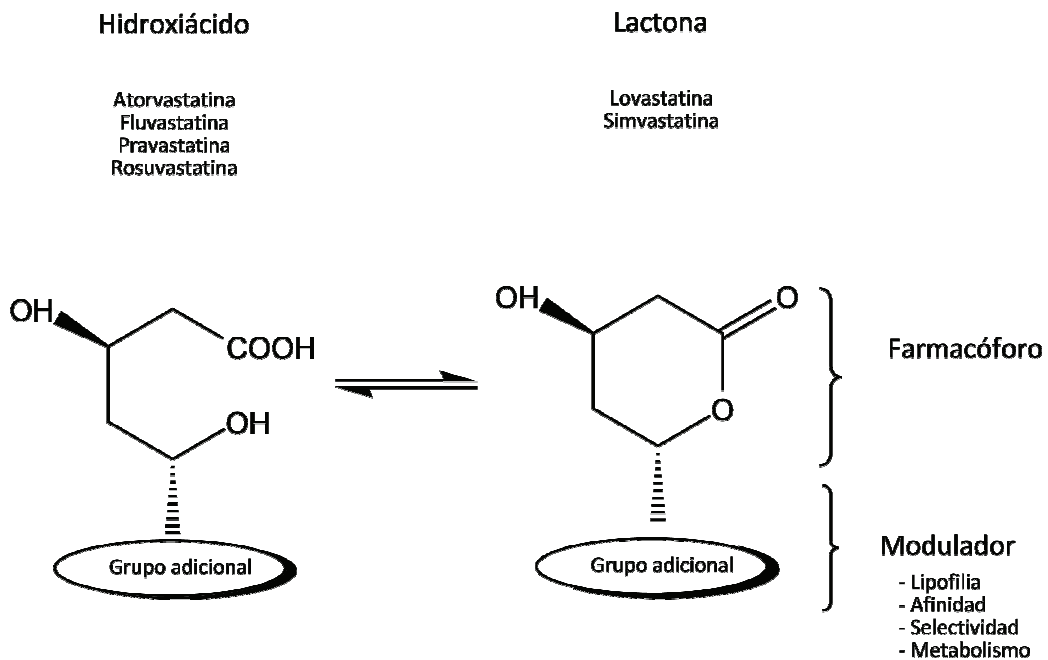


Figura 9. Formas hidroxiácido y lactona de las estatinas.

La notable influencia del pH sobre la estabilidad y la solubilidad de las estatinas obliga a estudiar en detalle el efecto de esta variable cuando se aborda su formulación. Por ejemplo, la solubilidad de la atorvastatina sódica a 30°C varía de 0.02 mg/mL a 1.23 mg/mL en un intervalo de pH comprendido entre 2.1 y 6.0 (Figura 10). Este comportamiento explica que las estatinas se absorban mayoritariamente en el duodeno (Kearney y col. 1993).

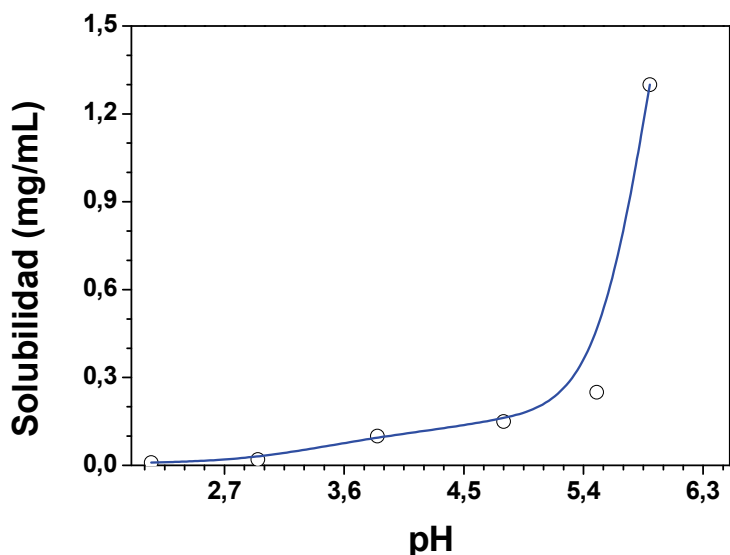


Figura 10. Solubilidad de la atorvastatina sódica frente al pH.

Las estatinas se diferencian en su perfil pH-solubilidad y en su lipofilia, medida a través del coeficiente de reparto aparente octanol/agua ($P_{o/w}$) (Kearney y col. 1993; Bottford 2004; Haider y Bahestanian 2004). La estatina más hidrofílica es la pravastatina - solubilidad 0.18 mg/mL (Serajuddin y col. 1991) - lo que la convierte en el único inhibidor de HMG-CoA reductasa que se elimina casi exclusivamente por vía renal, por lo que es la estatina de elección en pacientes con insuficiencia hepática. La elevada hidrofilia de la pravastatina se debe a que presenta un grupo hidroxilo unido al anillo hexahidronaftaleno, a diferencia de la lovastatina y la simvastatina que cuentan con un grupo lipófilo (metilo) en la misma posición. Además, la simvastatina tiene un grupo metilo adicional en la cadena butiriléster lateral, que determina que su hidrosolubilidad sea de tan sólo 0.0014 mg/mL a pH 5 y 23°C (Serajuddin y col. 1991).

Para un determinado valor de pH, el $P_{o/w}$ de la pravastatina es más bajo que el de las restantes estatinas. A pH 7, la forma hidroxilácido de la mevastatina,

la lovastatina y la simvastatina presentan una lipofilia entre 25 y 200 veces superior a la de la pravastatina.

Además de la influencia sobre la solubilidad de las estatinas, el pH también puede afectar a la estabilidad del anillo lactónico (Figura 11). La simvastatina a pH intermedio (pH≈5) presenta el anillo lactónico intacto. Sin embargo, tanto a pH muy ácido como muy básico el anillo lactónico se abre para dar lugar a un hidroxilado (Alvarez-Lueje y col. 2005).

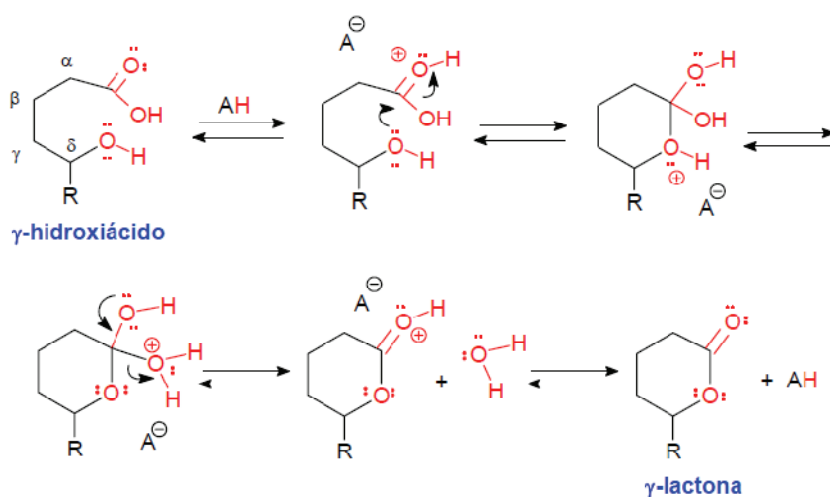
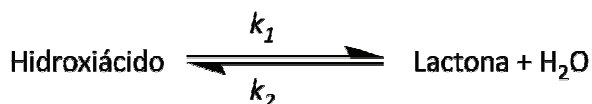


Figura 11: Mecanismo de interconversión de la forma hidroxilada en lactona.

La influencia del pH en la estructura también ha sido estudiada para la atorvastatina. Mientras la hidrólisis en medio ácido de la forma lactona es un proceso reversible, la hidrólisis básica puede considerarse una reacción irreversible (Kearney y col. 1993).



En medios de pH < 6 la forma lactona y la forma hidroxilada de la atorvastatina se encuentran en equilibrio. A medida que el valor de pK se aleja de

6, el equilibrio se va desplazando cada vez más hacia la forma hidroxilácido (Figura 12).

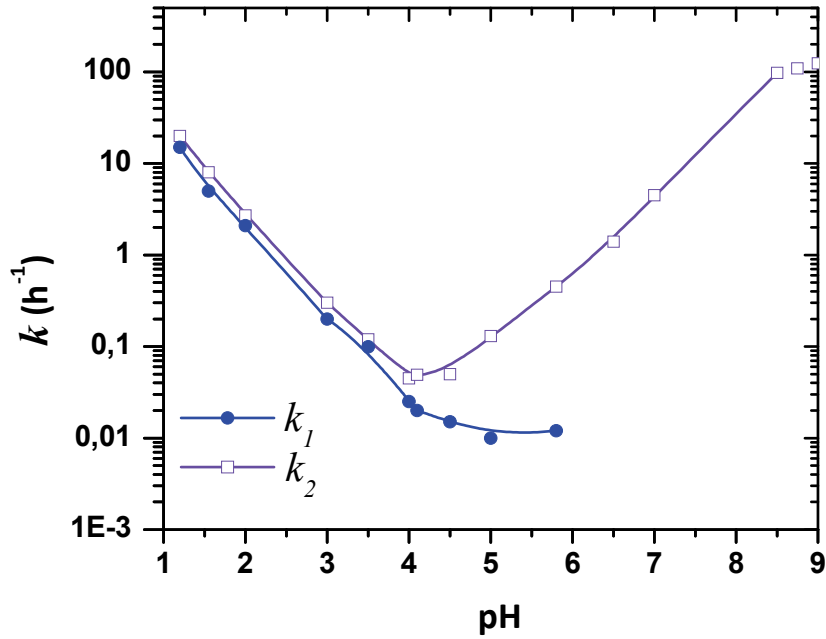


Figura 12. Dependencia de las constantes de equilibrio de la atorvastatina con el pH (Kearney y col. 1993).

2 Planteamiento y objetivos

De la información recogida en el apartado anterior se deduce que, si bien los copolímeros tribloque lineales de la familia de los poloxámeros se utilizan ampliamente en el campo farmacéutico, sus homólogos en forma de estrella, las poloxaminas, apenas han sido estudiados como componentes de sistemas de liberación de medicamentos. En buena medida, la escasa utilización de las poloxaminas se debe, además de a su más reciente introducción, a la insuficiente información sobre sus propiedades de autoagregación en condiciones fisiológicas. Otro aspecto determinante de la aptitud de los sistemas micelares como vehículos de fármacos - y al que tampoco se le ha prestado suficiente atención- es el de su estabilidad física cuando se diluyen en los fluidos biológicos, principalmente tras una administración oral o parenteral.

El objetivo genérico del presente trabajo de Tesis Doctoral es profundizar en el conocimiento de los procesos de autoagregación de las poloxaminas en la interfase agua-aire y en medio acuoso, establecer similitudes y diferencias con los poloxámeros, y evaluar comparativamente su potencial como agentes capaces de solubilizar fármacos hidrofóbicos y protegerlos frente a una eventual degradación química en condiciones propias del medio fisiológico. Para llevar a cabo el trabajo se han seleccionado dos fármacos de marcada hidrofobicidad, la griseofulvina y la simvastatina. La griseofulvina es un antifúngico de notable estabilidad química y solubilidad independiente del valor de pH del medio, mientras que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa presenta un anillo lactónico en su estructura susceptible de hidrolizarse a ácido carboxílico a valores de pH extremos.

El trabajo se ha planteado con los siguientes objetivos concretos que han constituido las etapas básicas de su desarrollo:

1. Caracterización de los fenómenos de micelización y gelificación de la poloxamina T904 en medios de distinto pH y fuerza iónica, y evaluación del efecto de las variables del medio sobre la capacidad de esta poloxamina para solubilizar griseofulvina.

2. Caracterización de los procesos de agregación en medio ácido de una amplia gama de poloxaminas, empleando técnicas que aportan información complementaria y que permiten obtener una visión global de los procesos autoasociativos que experimentan estos copolímeros bloque.

3. Evaluación del comportamiento de los copolímeros en la interfase aire-HCl 10 mM y análisis de los procesos de interacción con simvastatina en las monocapas.

4. Evaluación de la capacidad de las dispersiones acuosas de poloxámeros y poloxaminas para incrementar la solubilidad aparente de la simvastatina.

5. Caracterización de la estabilidad química de la simvastatina incorporada a las micelas frente a la hidrólisis en medio ácido y de la estabilidad física de las micelas cuando se someten a un proceso de dilución rápida.

En su conjunto, la información generada en un estudio de estas características debe servir de base para establecer correlaciones entre las propiedades estructurales de los copolímeros bloque, su sensibilidad a estímulos (pH y temperatura) y sus prestaciones como agentes solubilizantes y estabilizantes de fármacos. Un objetivo de especial relevancia es relacionar el comportamiento de los sistemas mixtos fármaco-copolímero bloque en la interfase y en el medio acuoso y explorar las posibilidades que ofrecen las isothermas π -A como herramienta rápida para predecir la capacidad para

solubilizar fármacos, protegerlos de la degradación y formar micelas estables frente a la dilución. Todo ello debe contribuir a afrontar con mayores garantías de éxito formulaciones líquidas basadas en sistemas micelares.

3 Trabajos publicados

3.1 Tetronic micellization, gelation and drug solubilization: Influence of pH and ionic strength

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 66, 244-252
(2007)



Research paper

Tetronic micellization, gelation and drug solubilization: Influence of pH and ionic strength

Carmen Alvarez-Lorenzo^a, Jaime Gonzalez-Lopez^b, Marta Fernandez-Tarrio^a,
Isabel Sandez-Macho^b, Angel Concheiro^{a,*}

^a Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

^b Departamento de Química Física, Universidad de Santiago de Compostela, Spain

Received 28 July 2006; accepted in revised form 6 October 2006

Available online 20 October 2006

Abstract

The aim of this work was to gain an insight into the self-associative processes and drug solubilization ability of a Tetronic variety, T904 (4 × 15 EO units; 4 × 17 PO units; HLB 15), in aqueous media covering the physiological range of pH and ionic strength, applying isoperibol microcalorimetry, transmission electronic microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS), oscillatory rheometry, and drug diffusion experiments. T904 shows two pK_a (pK_{a1} = 4.0 and pK_{a2} = 7.9) and, at pH < 5.8, the diprotonated form predominates over the non-protonated one. Deprotonization of the central diamine group is a required condition for micellization, which is an endothermic entropy-driven process owing to hydrophobic interactions between the PPO chains. As the pH of the solutions decreases, the coulombic repulsions among the positively charged amine groups make the aggregation more difficult, raising the critical micellar concentration (CMC) and decreasing the size of the micelles. The changes in the conformation and hydrophilicity of the Tetronic were reflected in its gelation temperature (around 30 °C at neutral-alkaline pH; no gelation at pH < 2) and solubilization capacity for griseofulvin (2-fold greater at neutral-alkaline pH than at pH < 2) and rate of diffusion (slower at pH 7.4). Such alterations in self-assembly are relevant when using Tetronic in the design of drug delivery systems.

© 2007 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Poloxamine surfactant; Polymeric micelles; Micellization enthalpy; Gel temperature; pH-sensitive micellization; Griseofulvin solubilization

1. Introduction

Amphiphilic copolymers that spontaneously aggregate in water forming nanosized colloidal particles, with a hydrophobic core and a hydrophilic shell, have shown a great potential as carriers of poorly water soluble and amphiphilic drugs [1–3]. These micelle-type polymer aggregates present important advantages compared to the micelles of low molecular weight common surfactants: lower critical micellar concentration (CMC), greater thermo-

dynamic and kinetic stability against dilution, and an enhanced drug solubilizing and stabilizing capability in the biological fluids [4–6]. Additionally, an appropriate choice of the copolymer architecture enables control of important pharmacokinetic and therapeutic characteristics of the drug formulations, such as blood circulation time and control of drug release rate and site [7–10]. Drug-loaded micelles can passively accumulate in pathological sites with affected and leaky vasculature (tumours, inflammations, and infarcted areas) via the enhanced permeability and retention effect [11]. Furthermore, the shell can be provided with specific ligand molecules, such as antibodies, to transport the drug-loaded micelles to, and into, target cells (e.g., tumour cells) [1,3,12]. Additionally, micelles made of pH-responsive amphiphilic block copolymers can specifically release their contents in precise areas of the

* Corresponding author. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain. Tel.: +34 981563100; fax: +34 981547148.

E-mail address: ffancon@usc.es (A. Concheiro).

gastrointestinal tract, in pathological tissues showing acidosis, or inside certain cell compartments. This may increase the bioavailability of poorly soluble or unstable drugs and, in general, the efficacy of the treatment [3,13–17].

Most research in the polymeric micelles field has been carried out with linear poly(ethylene oxide) (PEO)/poly(propylene oxide) (PPO) triblock copolymers of the family of Pluronic[®], and its derivatives, which proved to be highly effective drug delivery vehicles with temperature-sensitive behaviour [7,12,18]. By contrast, the related X-shaped copolymers formed by four poly(propylene oxide) (PPO) and poly(ethylene oxide) (PEO) block chains bonded to an ethylene diamine central group, known as Tetriconic[®], have been practically ignored until recently as pharmaceutical excipients. These commercially available surfactants, also known as poloxamines, are commonly used for industrial purposes at relatively high concentrations, as wetting, dispersant and thickener agents, and as emulsifiers particularly in the petroleum industry [19]. Although still only a few, the studies carried out in the pharmaceutical and biomedical fields have shown the potential of Tetriconics as components of transdermal formulations [20], as tissue scaffolds [21], and in nanoparticle engineering [22]. Surface-adsorbed Tetriconic can provide steric stabilization and modify the biodistribution of orally or parenterally administered drug-loaded nanoparticles [23,24]. For example, the presence of Tetriconic[®] 908 contributes to preventing drug precipitation in the gastrointestinal tract, to facilitating the contact with the absorbing surface of the gut, and even the uptake of the nanoparticles across the gastrointestinal walls, and thus, to increased blood circulation time and reduced liver uptake [23,25].

Despite this attractive potential, the paucity of Tetriconic physical-chemical data, in particular regarding micellization in aqueous solutions, is noteworthy [26–28]. It is well-known that the performance of a surface-active agent for a particular use is intimately linked to its chemical structure as well as the physical-chemical solution properties. Despite Tetriconics usually considered non-ionic surfactants, they have a central diamine group that can be protonated to add a positive charge to the polymer [19,27]. As for other pH-sensitive copolymers, the deprotonization would be a required previous step for micellization [17,27,29]. The properties of the core of these micelles can strongly differ from those of the Pluronic micelles since the hydrophilic diamine group connects the hydrophobic PPO chains [30]. The special architecture of

Tetriconics (Fig. 1) suggests that the pH and ionic strength of the medium may strongly influence the behaviour of both the unimers and micelles and, consequently, their performance as components of drug delivery systems. The pH-sensitiveness of Tetriconic micelles could offer interesting features compared to the micelles of non-ionic block copolymers, such as Pluronics, for developing pharmaceutical nanocarriers with the ability to host/release drugs as a function of pH. Therefore, the aim of this work was to gain an insight into the self-associative processes of a Tetriconic[®] variety, T904 [31], in aqueous media and to evaluate the sensitiveness of the micelles and the dispersions to changes in pH, ionic strength and temperature in the physiological range, in order to elucidate its potential as component of stimuli-sensitive drug delivery systems. The self-aggregation processes were characterized by isoperibol microcalorimetry, transmission electronic microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS), and oscillatory rheometry, and the ability of the micelles to load and control the release of griseofulvin was evaluated under different environmental conditions.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Tetriconic[®] 904 ((OE₁₅OP₁₇)₂NCH₂CH₂N(OP₁₇OE₁₅)₂) was from BASF Corporation (New Jersey, USA) and used as received. Griseofulvin and *N,N,N',N'*-tetramethyl ethylene diamine (TEMED) were from Sigma-Aldrich (Spain). Purified water was obtained by reverse osmosis (resistivity > 18.2 MOhm cm; MilliQ[®], Millipore Spain). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Preparation of T904 solutions

Several T904 solutions (10–30% w/w) were prepared by adding the adequate amount of the surfactant to water, NaCl 0.9%, HCl 0.1 M, HCl 0.01 M, NaOH 0.02 M, HCl 0.01 M/NaCl 0.9% solutions, and pH 5.8 or 7.4 USP phosphate buffers. Magnetic stirring was applied until complete dissolution of the surfactant, and the solutions were left to settle for at least 24 h before characterization.

2.3. T904 potentiometric titration

Titration of T904 was performed using a pH-meter Crison, model GLP22 (Barcelona, Spain), equipped with

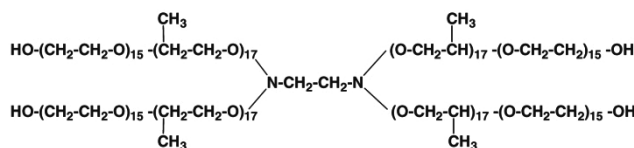


Fig. 1. Structure of Tetriconic[®] 904.

a viscous sensor (Ag/AgCl) n°52-21. Hydrochloric acid (0.01 M, 25 ml) was added to 0.01 M T904 solutions (25 ml), which were then titrated with 0.01 M sodium hydroxide.

To calculate the concentration of un-ionized and protonated species at any point on the potentiometric curve, the following approach was made [28]:

(i) the total concentration of T904 chains in solution ($[T_{\text{total}}]$) is the sum of the non-protonated, mono-, and di-protonated forms:

$$[T_{\text{total}}] = [T] + [TH^+] + [TH_2^{2+}] \quad (1)$$

(ii) and the electroneutrality of the system is given by the expression:

$$[H^+] + [TH^+] + 2[TH_2^{2+}] + [Na^+] = [Cl^-] + [OH^-] \quad (2)$$

The concentrations of the monoprotonated and the diprotonated forms can be estimated from the expressions of the dissociation constants K_{a1} and K_{a2} as follows:

$$[TH^+] = \frac{[T][H^+]}{K_{a2}} \quad (3)$$

and

$$[TH_2^{2+}] = \frac{[T][H^+]^2}{K_{a2}K_{a1}} \quad (4)$$

The concentration of un-ionized T904 molecules is given by:

$$[T] = \frac{[T_{\text{total}}]}{1 + ([H^+]/K_{a2}) + ([H^+]^2/K_{a2}K_{a1})} \left(\frac{V_{\text{initial}}}{V_{\text{initial}} + V_{\text{base}}} \right) \quad (5)$$

where V_{initial} is given by the volume of T904 solution and of HCl solution, and V_{base} is the volume of NaOH solution added.

2.4. Isotherm microcalorimetry

Calorimetric experiments were performed in triplicate using a Tronac-450 isoperibol microcalorimeter and Tronac FS101 calorimetry software (Tronac Inc., Orem, Utah). In each experiment, a T904 10% (0.0149 M) solution was loaded into a 2 ml calibrated buret, and 47.5 ml of water, or of the medium in which T904 was dissolved, was placed in a Dewar reaction vessel. The entire assembly was then immersed into a constant temperature (310.0 K) water bath. After thermal equilibration, the T904 solution was delivered at 0.3332 ml/min constant rate into the reaction vessel, in which a stirrer mixed the two solutions rapidly. The evolution of the temperature in the system was monitored using a thermistor, and later reproduced using a heating coil in the reaction vessel. The apparent enthalpy was calculated from the applied current and voltage and the heating time. Calibration of the system was assured by titration of tris(hydroxymethyl)aminomethane with a

HCl standard solution. In order to obtain the heat associated to Tetronic and/or buffer ionization, Tetronic was replaced in the buret by TEMED at the same concentration (0.0149 M) to produce the same change in pH as the addition of the copolymer solution. The integral demicellization enthalpy was estimated by subtracting from the measured heat produced by addition of Tetronic to a given medium (ΔH_{obs}), the heat effects due to Tetronic/buffer ionization (ΔH_{ion}) [32,33].

$$\Delta H_{\text{demic}} = \Delta H_{\text{obs}} - \Delta H_{\text{ion}} \quad (6)$$

The final concentration of T904 in the Dewar was well below that required for gel formation at the temperature of the experiment. Therefore, no interference due to phase transition should be expected in the estimation of the enthalpy [32]. The standard Gibbs free energy of micellization (ΔG_{mic}) was calculated using the following expression:

$$\Delta G_{\text{mic}} = (1 + \beta)RT \ln X_{\text{cmc}} \quad (7)$$

where R is the gas constant, T is the absolute temperature, X_{cmc} is the CMC in mole fraction units, and β is the counterion binding evaluated from the potentiometric titration experiments. The standard entropy change (ΔS_{mic}) was derived from the following relation:

$$\Delta S_{\text{mic}} = (\Delta H_{\text{mic}} - \Delta G_{\text{mic}})/T \quad (8)$$

2.5. Surface tension measurements

Surface tension of Tetronic solutions was determined by the platinum ring method using a Lauda Tensiometer TD1 (Lauda-Königshofen, Germany) [6].

2.6. Transmission electron microscopy (TEM)

A 5 μl drop of the Tetronic solution was placed on grids covered with Formvar film. After 30 s, the excess was carefully removed with a tip of filter paper, and a drop of water (5 μl) was added. After another 30 s, the excess was removed; a drop of 2% w/v phosphotungstic acid (5 μl) was added and left for 30 s before removing. The samples were then dried in a closed container with silicagel, and observed using a Philips CM-12 TEM apparatus (FEI Company, The Netherlands). Diameter of the micelles/aggregates was measured using a calibrated scale.

2.7. Dynamic light scattering (DLS)

The DLS measurements were performed using an ALV-5000 F optical system equipped with CW diode-pump Nd:YAG solid-state laser (400 mW) operated at 532 nm (Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA). The intensity scale was calibrated against scattering from toluene. The T904 solutions were filtered (Millipore® 0.45 μm , Ireland) into the quartz cell (previously washed with condensing acetone vapour) and maintained at 20–37 °C. The diffusion

coefficient was deduced from the standard second-order cumulant analysis of the autocorrelation functions measured at 90° angle. The experiments were carried out in triplicate and the apparent hydrodynamic radius ($r_{h,app}$) of the micelles was calculated from the apparent diffusion coefficients.

2.8. Oscillatory rheology

The storage or elastic (G') and the loss or viscous (G'') moduli of T904 30% solutions were evaluated in triplicate at 20 °C, applying 0.5% strain and angular frequencies of 0.05–50 rad/s in a Rheolyst AR-1000N rheometer (TA Instruments, Newcastle, UK) equipped with an AR2500 data analyzer, a Peltier plate and a cone geometry (6 cm diameter, 2.1°). To determine the influence of temperature on both moduli, the tests were carried out in triplicate, at 1 rad/s from 20 to 60°C with a heating rate of 1.5 °C/min. Evaporation was prevented using an adequate solvent trap.

2.9. Griseofulvin solubility studies

The T904 solutions (10%, 4 ml) were placed in glass ampoules containing an excess of drug (40 mg). The ampoules were flame-sealed and rocked at 25 °C and 50 rpm for 5 days. Then, the suspensions were filtered through 0.45 µm cellulose acetate membrane filters (Millipore®, Ireland). Control experiments were carried out using as solvent the media in which the T904 solutions were prepared. The concentration of the dissolved drug was determined by UV spectrophotometry (Agilent 8453, Germany) at 294 nm. The solubilization capacity per gram or per mol of T904 was calculated as the amount (gram or mol) of griseofulvin dissolved in the T904 solution in excess of that dissolved in an equivalent volume of each solvent medium. The solubilization capacity per gram of hydrophobic block was calculated similarly, using the mass fraction (60%) of the hydrophobic blocks in T904.

2.10. Griseofulvin release studies

Griseofulvin release profiles from 30% T904 solutions in HCl 0.1 M or pH 7.4 phosphate buffer, previously loaded with griseofulvin following the procedure explained above, were obtained in triplicate at 37 °C in Franz-Chien diffusion cells (VidraFoc, España) fitted with cellulose acetate filters (0.45 µm pore size, Teknokroma, Spain). Samples of 0.5 ml were put into the donor cell. The receptor compartment of 5.5 ml capacity was filled with the corresponding medium (which ensured sink conditions), and magnetic stirring was applied. The area available for diffusion was 0.7654 cm². Samples of the receptor solution (0.5 ml) were withdrawn at predetermined times and drug concentration was determined by UV spectrophotometry (Agilent 8453, Germany) at 294 nm. The samples were immediately returned to the receptor cell. Diffusion coefficients, D , were estimated using the equation [34]:

$$Q/A = 2C_0(Dt/\pi)^{1/2} \quad (9)$$

where Q/A is the amount of griseofulvin released per unit area at the time t , and C_0 is the initial concentration of griseofulvin in the donor solution (0.18 and 0.27 mg/ml in the systems prepared in HCl 0.1 M and pH 7.4 buffer, respectively).

3. Results and discussion

Among the different varieties of Tetriconic commercially available, T904 was chosen because it has been previously shown to be biocompatible and useful in nanoparticle and tissue scaffold engineering [22] and has an intermediate molecular weight and HLB (6700 Da; HLB 12–18; Fig. 1) [31].

3.1. T904 protonization behaviour

The titration profile of T904 (Fig. 2A) showed two inflection points that correspond to proton dissociation from the nitrogen atoms on the central ethylene diamine

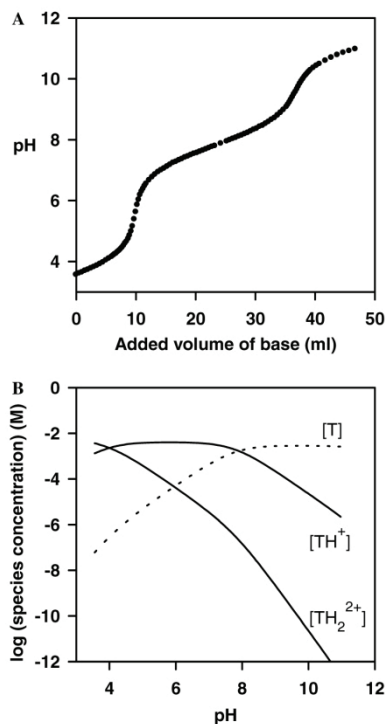


Fig. 2. Potentiometric titration curve obtained for T904 (A) and dependence of the concentrations of the non-protonated and protonated forms of T904 as a function of pH (B).

group. The pK_a values obtained were $pK_{a1} = 4.0$ and $pK_{a2} = 7.9$. These values are similar to those previously found for T701 [28]. At a constant temperature of 25 °C, the diprotonated form is the predominant one at pH values below 4 and its concentration is greater than that of the non-protonated form up to pH 5.8. The monoprotonated form is the predominant form in the pH range between 4.0 and 7.9 (Fig. 2B). Since the coulombic repulsions among the positively charged amine groups at the centre of the PPO chains can prevent aggregation, at pH values below pK_a a necessary condition for micellization is the proton dissociation [27]. The balance between the free energy of micellization and the free energy of protonization will determine the possibility of micelle formation, which can be represented as follows for the pH range in which the monoprotonated form predominates:



$$K_{\text{micellization}} = \frac{[\text{Tn}][\text{H}^+]^n}{[\text{TH}^+]^n} \quad (11)$$

As the pH decreases, the deprotonation-micellization would become more difficult. To evaluate the practical repercussions of these events, we first determined the CMC and the size of the micelles in media covering a wide range of pH and ionic strength conditions.

3.2. Thermodynamics of micellization

Isoperibol microcalorimetry experiments provided information about both the CMC of T904 and the energy associated to the demicellization/micellization process. Before being added to the Dewar, T904 (10% w/w) was in the buret above its CMC in all media tested, as confirmed by the low values of surface tension recorded (<38 mN/m). Therefore, when the T904 solution was slowly added into the Dewar solution, the micelles broke up until the concentration in the Dewar reached the CMC. Afterwards, the micelles were only diluted in a solution of micelles. In all media evaluated, the demicellization process was exothermic (enthalpy change negative), although remarkable differences in enthalpy and CMC were observed depending on the composition of the medium (Fig. 3). To correctly determine the enthalpy associated to the demicellization, the contribution of the ionization of the Tetriconic and/or the buffer was taken into account [33]. T904 10% significantly raised the pH of the medium of un-buffered solutions (2–3 units) and, to a much lower extent (0.5 units), of the buffer solutions. Therefore, when the concentrated Tetriconic solution was delivered into the Dewar, some protons could be taken up/exchanged with the components of the medium. To quantify the heat associated to this latter process, TEMED was used to carry out some blank experiments instead of T904. TEMED consists of exactly the same central ethylene diamine groups as T904 but has only two methyl groups at the end of each nitrogen, instead of two PPO-PEO blocks. Therefore, no associative phenomena at the concentration

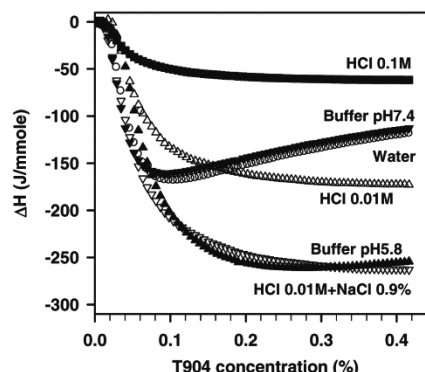


Fig. 3. Calorimetric profiles of the demicellization process, at 310 K, of 10% T904 solutions prepared in different media: water (open circles), pH 7.4 buffer (full down triangles), pH 5.8 buffer (full up triangles), HCl 0.1 M (full squares), HCl 0.01 M (open up triangles), and HCl 0.01 M with 0.9% NaCl (open down triangle).

used for the experiments are expected, and the calorimetric titrations just provide the enthalpy associated to changes in the protonization degree of the diamine group. For the media evaluated, the ionization enthalpy ranged from -5 to -10 J/mmol. Therefore, it was remarkably lower than the contribution of demicellization to the heat evolved in the Dewar when T904 was used. Fig. 3 shows the already corrected enthalpies.

The calorimetric profiles indicate that micellization is an endothermic entropy-driven process owing to hydrophobic interactions between the PPO chains. The exothermic dilution process is attributed to hydrogen-bonding formation between the PEO blocks and water after breakage of water-water and surfactant-surfactant hydrogen-bonds [32]. This behaviour is also typical of other structurally related surfactants such as Pluronic [35,36]. Table 1 summarizes the values of the thermodynamic parameters of T904 micellization in each medium. In un-buffered water (pH 8–9) and pH 7.4 buffer phosphate (Fig. 3), as well as in NaOH 0.02 M or NaCl 0.9% solutions (superimposable profiles), a clear CMC is observed at 0.09–0.10%. As the pH of the T904 solutions decreases, with the consequent increase in the degree of protonization of the diamine moiety in the middle of PPO blocks, the aggregation becomes more difficult. In pH 5.8 buffer phosphate, the inflexion point located at 0.25%. In a strongly acidic medium (HCl 0.1 M, pH 1.2), the dilution profile showed a progressively less exothermic process, but no inflexion point was observed below 0.4%. This means that at pH 1.2, T904 requires a remarkably greater concentration to induce the self-associative process (CMC \sim 0.4%) and, once the micelles are formed, they are easily broken by dilution. The coulombic repulsions among the positively charged amine groups prevent micellization in diluted T904 solutions. The decrease in ΔH may be motivated by an apparent reduction

Table 1
Thermodynamic parameters of micellization of T904 in aqueous solutions of different pH and ionic strength

Medium	pH of the T904 solution	X_{cmc} (mole fraction)	ΔH_{mic} (KJ/mol)	ΔG_{mic} (KJ/mol)	ΔS_{mic} (J/molK)
Water	8.5	$2.69 \cdot 10^{-6}$	168	-49.56	701
pH 7.4 buffer	7.4	$2.42 \cdot 10^{-6}$	161	-49.97	680
pH 5.8 buffer	5.8	$7.00 \cdot 10^{-6}$	261	-61.15	1039
HCl 0.01 M	6.0	$7.00 \cdot 10^{-6}$	167	-61.15	735
HCl 0.01 M + NaCl 0.9%	6.0	$7.00 \cdot 10^{-6}$	255	-61.15	1019
HCl 0.1 M	1.2	$1.08 \cdot 10^{-5}$	60	-88.40	478

Standard deviations were in all cases lower than 2%.

in the entropic driven force for micellization (Table 1), as found for Pluronics modified with terminal amine chains [37]. The protonization disturbs the microenvironment around the PPO blocks and hence the hydrophobic associations.

It is interesting to note the important effect of the salt concentration on the demicellization enthalpy in the less acidic solution (pH 6.0) of T904 in HCl 0.01 M medium. The CMC values (0.25%) obtained with HCl 0.01 M/NaCl 0.9% solutions were similar to those recorded in HCl 0.01 M or pH 5.8 phosphate buffer media. However, T904 showed a remarkably greater demicellization enthalpy in the HCl 0.01 M/NaCl 0.9% medium than in the HCl 0.01 M solution; the former being similar to the one recorded in pH 5.8 phosphate buffer (Fig. 3). As mentioned above, the partial protonization of T904 increases the hydrophilicity of the macromolecule and makes the micellization more difficult. In contrast, the increase in ionic strength shields the ionic repulsions and can cause a small salting-out effect that decreases the hydrophilicity of the poly(ethylene oxide) chains and promotes hydrogen bonding interactions [36,38]. Consequently, the entropic driven force for aggregation is enhanced and also the enthalpic

compensation (Table 1). Greater demicellization enthalpies in high ionic strength medium, compared to water, have also been reported for Pluronic F127 [36].

3.3. Micellar size

Not only the CMC, but the aggregation number (i.e., the number of T904 molecules that constitute each micelle) should be altered by a change in pH or ionic strength. TEM micrographs of T904 30% systems, prepared and observed at 20 °C, clearly showed the influence of this variable on the micellar size. As can be observed in Fig. 4, a great number of significantly small micelles (2 nm) were formed in HCl 0.1 M. By contrast, in water and NaOH 0.02 M the micelles presented a greater and quite homogeneous size (10–20 nm). In the phosphate buffers, the micelles presented a wider size distribution, in which micelles of different size can be observed. This same tendency was observed by DLS at 20 °C; only samples prepared in pH 7.4 phosphate buffer showed a bimodal distribution, in which micelles and clusters coexist (Fig. 5). DLS experiments were also carried out at 37 °C to elucidate if the influence of pH on the size of the micelles also occurs at

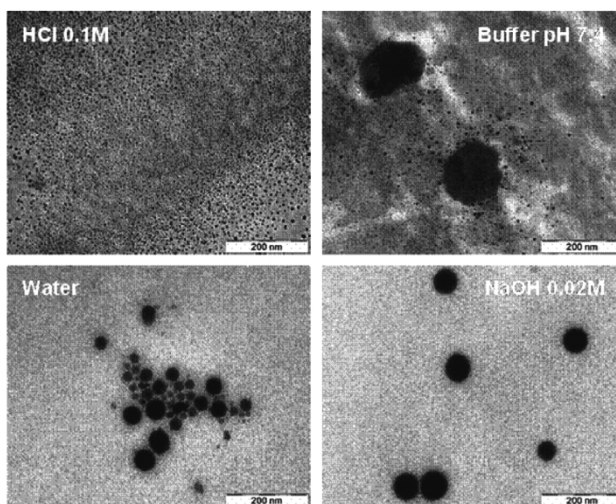


Fig. 4. TEM micrographs of 30% T904 solutions prepared in different media and negatively stained with phosphotungstic acid (110,000 \times).

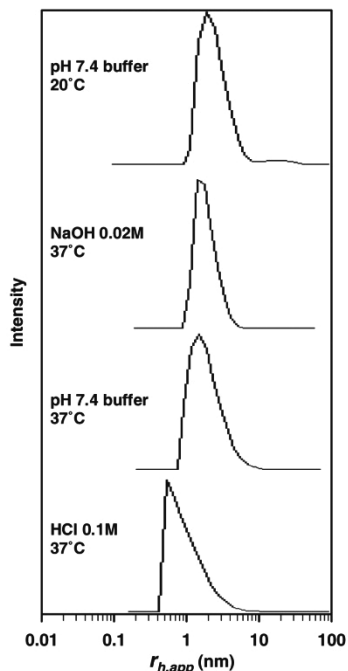


Fig. 5. Intensity fraction distribution of the apparent hydrodynamic radius ($r_{h,app}$) for 30% T904 solutions prepared in different media.

the physiological temperature. Once again, the lower the pH, the smaller the micelles, ranging from 0.9 to 4 nm (Fig. 5). However, bimodal distributions were not observed at any pH and no important differences in polydispersity were detected. A similar influence of the temperature on micellization has been previously described for Pluronic P94: at 20 °C, micelles, and clusters were observed; whilst at higher temperature (40 °C), only the micelle peak with decreased polydispersity was recorded [39]. The increase in temperature enhances the hydrophobic interactions, which promotes the micelle formation with a lower content in water. Thus, the clusters are dissolved and the hydrodynamic size of the micelles decreases [39,40].

3.4. Rheological behaviour

To evaluate the repercussions of the pH-sensitive aggregation process on the bulk properties of the copolymer solutions, the viscoelastic behaviour of the Tetronic solutions was analysed. At 20 °C, the values of the storage modulus (G') of T904 30% solutions were negligible, and the log-log plot of the loss modulus (G'') vs. angular frequency showed a slope close to 1 (Fig. 6A). These findings evidence that the T904 solutions behave as Newtonian viscous fluids. The lower loss modulus of the solution pre-

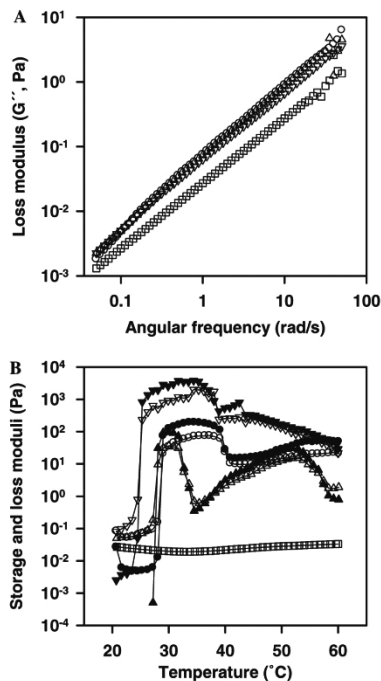


Fig. 6. Dependence of loss modulus on angular frequency at 20 °C (A) and of loss (open symbols) and storage (full symbols) moduli on temperature at 1 rad/s (B) for 30% T904 solutions prepared in water (circles), HCl 0.1 M (squares), pH 7.4 phosphate buffer (up triangles), and NaOH 0.02 M (down triangles).

pared in HCl 0.1 M can be attributed to the more hydrophilic character of the Tetronic chains, which is responsible for the formation of small micelles that

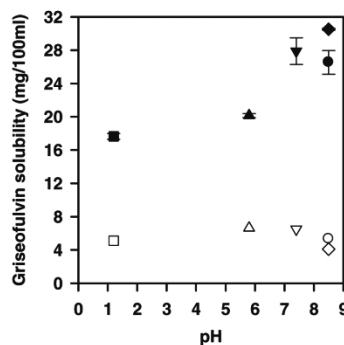


Fig. 7. Griseofulvin solubility in media of different pH and ionic strength without (open symbols) or with (full symbols) 10% T904. Legend: HCl 0.1 M (squares), pH 5.8 phosphate buffer (up triangles), pH 7.4 phosphate buffer (down triangles), water (circles) and 0.9% NaCl solution (diamond).

Table 2

Fractions of drug that are free in the medium (f_f) and micelle-incorporated (f_m), and solubilization capacities of T904 in solutions prepared with the copolymer at 10% in different media

Medium	Drug distribution		Solubilization capacity		
	f_f	f_m	mg/g T904	mol/mol T904	mg/g Hydrophobic block
NaCl 0.9%	0.134	0.866	2.64 (0.01)	0.050 (0.001)	4.48 (0.02)
Water	0.201	0.799	2.12 (0.14)	0.040 (0.002)	3.60 (0.24)
pH 7.4 buffer	0.250	0.750	2.09 (0.16)	0.040 (0.003)	3.54 (0.27)
pH 5.8 buffer	0.379	0.621	1.25 (0.02)	0.024 (0.001)	2.12 (0.04)
HCl 0.1 M	0.288	0.712	1.25 (0.03)	0.024 (0.001)	2.13 (0.06)

remain individualized. Fig. 6B shows the evolution of the loss and the storage moduli as the temperature raises. All systems, except the one prepared in HCl 0.1 M, exhibit a sol-gel transition around 30 °C. As the temperature increases, the PPO and PEO blocks become less soluble in water and, thus, more hydrophobic. Consequently more micelles are formed at a given concentration as the temperature increases. This causes gelation due to the close packing of the micelles into body centred cubic phase gels [41]. The increase of the volume fraction of micelles is shown as a maximum in the values of both moduli for a certain temperature. At greater temperatures, the dehydration of PPO chains, and even of PEO blocks, causes the polymer to phase separate, and G' and G'' values to decrease. The absence of storage modulus for T904 solutions prepared in HCl 0.1 M clearly indicates that the copolymer chains cannot entangle when they are strongly protonated. Therefore, in an high acidic physiological environment it is not expected that T904 systems become gel-like.

3.5. Solubilization ability

From the point of view of the pharmaceutical use of Tetricons, its ability to solubilize hydrophobic drugs is a critical property. Since this solubilizing effect is a consequence of the incorporation of the solute to the micelles, the changes in the CMC and micelle conformation could notably condition their performance. Fig. 7 shows the effect of the pH of the medium on the solubility of griseofulvin in 10% T904 solutions; griseofulvin was chosen as a model of pH-independent poorly soluble drug (4 mg/100 ml). As can be observed, although T904 micelles are able to increase drug solubility even in HCl 0.1 M (3-fold), the solubilizing capability is twice as big at alkaline pH (6-fold). The fraction of drug that is hosted by the micelles as well as the amount of drug that is incorporated per gram of PPO blocks clearly raised as the pH increased (Table 2). These findings are related to the influence of pH on the protonization and hydrophobicity of the unimers and, consequently, on the concentration and properties of the micelles. The lower the pH, the lower the number of micelles in the medium. The griseofulvin solubilization capacity values obtained for T904 are in range of those previously reported for Tween 80 (3.4 mg/g) and Cremophor EL (2.6 mg/g) [42].

3.6. Drug release

Griseofulvin diffusion from the 30% T904 solutions to the receptor medium proceeded slowly and the profiles of amount released per unit area vs. the square root of time were linear ($r^2 > 0.98$). The values of the diffusion coefficients obtained for 30% T904 systems prepared in HCl 0.1 M ($1.46 \cdot 10^{-4}$; s.d. $8.5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{min}$) were almost twice those recorded for the same systems prepared in pH 7.4 phosphate buffer ($0.89 \cdot 10^{-4}$; s.d. $8.7 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{min}$). The higher affinity of the drug for the micelles and the greater viscosity of the systems prepared at pH 7.4 explain the pH-dependence of the diffusion.

4. Conclusions

T904 cannot be considered as a non-ionic surfactant since its self-aggregation properties are strongly dependent on pH and ionic strength of the medium in the range of physiological values. This dependence of the conformation and hydrophilicity of the Tetricon unimers and micelles has a great repercussion on the critical micellar concentration, on the sensitiveness of its solutions to the temperature, and on the drug solubilizing capability of the micelles. At $\text{pH} < \text{p}K_{a1}$, the central diamine group is diprotonated and causes the unimers to repel each other. This makes the self-aggregation more difficult and the size of the micelles significantly lower in a higher acidic pH medium than in neutral-alkaline solutions, which is reflected in changes in the aggregation number. At acid pH not only micellization is hindered but also the *in situ* gelling behaviour is lost; consequently drug diffusion is facilitated. Such alterations in self-assembly have to be taken into account when using Tetricon in the design of drug carriers and, if conveniently modulated, this pH-responsive behaviour could be useful for obtaining site-specific drug delivery systems.

Acknowledgments

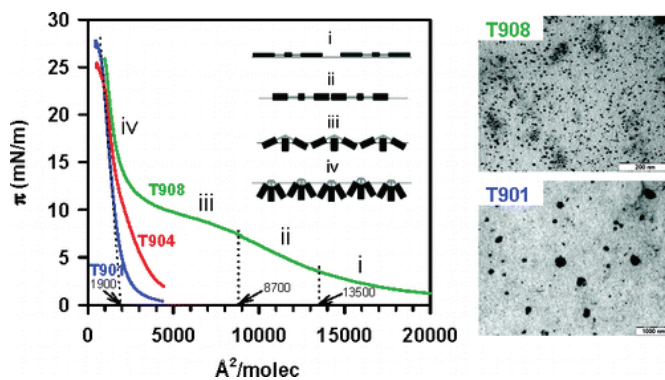
This work was financed by the Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2005-01930; RYC2001-8) FEDER, and Xunta de Galicia (PGIDT01PX1203014IF; PGI-DIT05BTF20301PR), Spain. The authors express their gratitude to BASF Corporation for providing samples of Tetricon® varieties and to Dr. P. Taboada for his help with the DLS experiments.

References

- [1] M.C. Jones, J.C. Leroux, Polymeric micelles: a new generation of colloidal drug carriers, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 48 (1999) 101–111.
- [2] M.F. Francis, M. Cristea, F.M. Winnik, Polymeric micelles for oral drug delivery: why and how, *Pure Appl. Chem.* 76 (2004) 1321–1335.
- [3] E.R. Gillies, J.M.J. Fréchet, Development of acid-sensitive copolymer micelles for drug delivery, *Pure Appl. Chem.* 76 (2004) 1295–1307.
- [4] V.P. Torchilin, Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems, *J. Control. Release* 73 (2001) 137–172.
- [5] M.L. Adams, A. Lavasanifar, G.S. Kwon, Amphiphilic block copolymers for drug delivery, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 1343–1355.
- [6] R. Barreiro-Iglesias, L. Bromberg, M. Temchenko, T.A. Hatton, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, Solubilization and stabilization of camptothecin in micellar solutions of pluronic-g-poly(acrylic acid) copolymers, *J. Control. Release* 97 (2004) 537–549.
- [7] A.V. Kabanov, E.V. Batrakova, V. Yu. Alakhov, Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery, *J. Control. Release* 82 (2002) 189–212.
- [8] J.R. DesNoyer, A.J. McHugh, The effect of Pluronic on the protein release kinetics of an injectable drug delivery system, *J. Control. Release* 86 (2003) 15–24.
- [9] G. Gaucher, M.H. Dufresne, V.P. Sant, N. Kang, D. Maysinger, J.C. Leroux, Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery, *J. Control. Release* 109 (2005) 169–188.
- [10] H.M. Aliabadi, D.R. Brocks, A. Lavasanifar, Polymeric micelles for the solubilization and delivery of cyclosporine A: pharmacokinetics and biodistribution, *Biomaterials* 26 (2005) 7251–7259.
- [11] K. Ulbrich, V. Subr, Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation, *Adv. Drug Del. Rev.* 56 (2004) 1023–1050.
- [12] C.O. Rangel-Yagui, A. Pessoa, L. Costa Tavares, Micellar solubilization of drugs, *J. Pharm. Biopharm. Sci.* 8 (2005) 147–163.
- [13] M.C. Jones, M. Ranger, J.C. Leroux, pH-sensitive unimolecular polymeric micelles: synthesis of a novel drug carrier, *Bioconjugate Chem.* 14 (2006) 774–781.
- [14] E.S. Gil, S.A. Hudson, Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates, *Prog. Polym. Sci.* 29 (2004) 1173–1222.
- [15] V.P. Sant, D. Smith, J.C. Leroux, Novel pH-sensitive supramolecular assemblies for oral delivery of poorly water soluble drugs: preparation and characterization, *J. Control. Release* 97 (2004) 301–312.
- [16] G.H. Hsiue, H.Z. Chiang, C.H. Wang, T.M. Juang, Nonviral gene carriers based on diblock copolymers of poly(2-ethyl-2-oxazoline) and linear polyethylenimine, *Bioconj. Chem.* 17 (2006) 781–786.
- [17] S. Shim, S.W. Kim, E.K. Choi, H.J. Park, J.S. Kim, D.S. Lee, Novel pH sensitive block copolymer micelles for solvent free drug loading, *Macromol. Biosci.* 6 (2006) 179–186.
- [18] V. Alakhov, G. Pietrzynski, K. Patel, A. Kabanov, L. Bromberg, T.A. Hatton, Pluronic block copolymers and Pluronic poly(acrylic acid) microgels in oral delivery of megestrol acetate, *J. Pharm. Pharmacol.* 56 (2004) 1233–1241.
- [19] C.R.E. Mansur, S.P. Barboza, G. González, E.F. Lucas, Pluronic x Tetricon polyols: study of their properties and performance in the destabilization of emulsions formed in the petroleum industry, *J. Colloid Interf. Sci.* 271 (2004) 232–240.
- [20] M.J. Capel, J. Kreuter, Effect of nonionic surfactants on transdermal drug delivery: II. Poloxamer and poloxamine surfactants, *Int. J. Pharm.* 69 (1991) 155–167.
- [21] A. Sosnik, M.V. Sefton, Semi-synthetic collagen/poloxamine matrices for tissue engineering, *Biomaterials* 26 (2005) 7425–7435.
- [22] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine, *TIBTECH* 18 (2000) 412–420.
- [23] L. Araujo, M. Sheppard, R. Löbenberg, J. Kreuter, Uptake of PMMA nanoparticles from the gastrointestinal tract after oral administration to rats: modification of the body distribution after suspension in surfactant solutions and in oil vehicles, *Int. J. Pharm.* 176 (1999) 209–224.
- [24] D.E. Owens, N.A. Peppas, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 307 (2006) 93–102.
- [25] S.D. Tröster, U. Müller, J. Kreuter, Modification of the body distribution of poly(methyl methacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants, *Int. J. Pharm.* 61 (1990) 85–100.
- [26] D. Attwood, J. Collett, C. O'Connor, The effect of gamma-irradiation on the surface, rheological and micellar behavior of the block copolymer Tetronic 908, *Int. J. Pharm.* 65 (1990) 201–205.
- [27] J.K. Armstrong, B.Z. Chowdhry, M.J. Snowden, J. Dong, S.A. Leharne, The effect of pH and concentration upon aggregation transitions in aqueous solutions of poloxamine T901, *Int. J. Pharm.* 229 (2001) 57–66.
- [28] J. Dong, J.K. Armstrong, B.Z. Chowdhry, S.A. Leharne, Thermodynamic modelling of the effect of pH upon aggregation transitions in aqueous solutions of the poloxamine T701, *Thermochim. Acta* 417 (2004) 201–206.
- [29] M.J. Tiera, G. Rodrigues dos Santos, V.A. Oliveira Tera, N.A. Blaz Vieira, E. Frolini, R.C. Silva, W. Loh, Aqueous solution behavior of thermosensitive N-isopropylacrylamide-acrylic acid-ethyl methacrylate terpolymers, *Colloid Polym. Sci.* 283 (2005) 662–670.
- [30] T. Nivaggioli, B. Tsao, P. Alexandridis, T.A. Hatton, Microviscosity in Pluronic and Tetronic poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles, *Langmuir* 11 (1995) 119–126.
- [31] BASF Corporation, Tetronic Technical Bulletins, 2002. <http://www.basf.com>, accessed on April 2006.
- [32] J.J. Irwin, A.E. Beezer, J.C. Mitchell, M.G. Buckton, B.Z. Chowdhry, D. Eagland, N.J. Crowther, Isothermal stability of dilute aqueous solutions of block copolymers of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene): a microcalorimetric study of pluronic F87 and pluronic F88, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 2034–2036.
- [33] H. Fukada, K. Takahashi, Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride, *Proteins* 33 (1998) 159–166.
- [34] J.M. Parks, R.L. Cleek, A.L. Bunge, Chemical release from topical formulations across synthetic membranes: infinite dose, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 187–192.
- [35] P. Alexandridis, J.E. Holzwarth, T.A. Hatton, Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association, *Macromolecules* 27 (1994) 2414–2425.
- [36] R. Barreiro-Iglesias, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, Microcalorimetric evidence of the salt effect on carbolol microgels interaction with surfactants, *Prog. Colloid Polym. Sci.* 122 (2003) 95–102.
- [37] B.C. Andersson, S.M. Cox, P.D. Bloom, V.V. Sheares, S.K. Mallapragada, Synthesis and characterization of diblock and gel-forming pentablock copolymers of tertiary amine methacrylates, poly(ethylene glycol), and poly(propylene glycol), *Macromolecules* 36 (2003) 1670–1676.
- [38] N. Pandit, T. Trygstad, S. Criy, M. Bohorquez, C. Koch, Effect of salts on the micellization, clouding, and solubilization behavior of Pluronic F127 solutions, *J. Colloid Interf. Sci.* 222 (2000) 213–220.
- [39] P. Bahadur, K. Pandya, Aggregation behavior of Pluronic P-94 in water, *Langmuir* 8 (1992) 2666–2670.
- [40] L. Yang, P. Alexandridis, D.C. Steytler, M.J. Kositzka, J.F. Holzwarth, Small-angle neutron scattering investigation of the temperature-dependent aggregation behaviour of the block copolymer Pluronic L64 in aqueous solution, *Langmuir* 16 (2000) 8555–8561.
- [41] C. Perreur, J.-P. Habas, J. Peyrelasse, J. François, A. Lapp, Rheological and small-angle neutron scattering studies of aqueous solutions of branched PEO-PPO-PEO copolymers, *Physical Rev. E* 63 (2001). Art. No. 031505 Part 1.
- [42] A. Balakrishnan, B.D. Rege, G.L. Amidon, J.E. Polli, Surfactant-mediated dissolution: contributions of solubility enhancement and relatively low micelle diffusivity, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 2064–2075.

3.2 Self-Associative Behavior and Drug-Solubilizing Ability of Poloxamine (Tetronic) Block Copolymers

Langmuir 24, 10688-10697 (2008)



Self-Associative Behavior and Drug-Solubilizing Ability of Poloxamine (Tetronic) Block Copolymers

Jaime Gonzalez-Lopez,[†] Carmen Alvarez-Lorenzo,[‡] Pablo Taboada,[§] Alejandro Sosnik,^{||} Isabel Sandez-Macho,[†] and Angel Concheiro^{*,‡}

Departamento de Química Física, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, and Departamento de Física de la Materia Condensada, Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain, and Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires and National Science Research Council (CONICET), 1113-Buenos Aires, Argentina

Received May 29, 2008. Revised Manuscript Received July 17, 2008

The incidence of the structural features on the self-assembly of different poloxamines (the conventional sequential Tetronic 304, 901, 904, 908, 1107, 1301, and 1307; a reverse-sequential counterpart Tetronic 150R1; and a chemically modified derivative, N-methylated Tetronic 1107) was thoroughly studied in 10 mM HCl by means of π -A isotherm, surface tension, and pyrene fluorescence measurements. The size and size distribution of the aggregates were investigated by dynamic and static light scattering, and the morphology was probed by transmission electron microscopy. The abilities of the different derivatives to solubilize the drug simvastatin were also evaluated. Poloxamines with both higher PO/EO ratio and molecular weight (T1301 and T150R1) led to micelles with larger and more hydrophobic cores, particularly adequate for hosting hydrophobic molecules and protecting the labile lactone form of simvastatin from hydrolysis. On the other hand, the hydroxy acid form of simvastatin interacted with the central ethylenediamine group under alkaline pH (T304) or when a permanent positive charge due to methylation was present. Micelles of long poloxamine molecules containing large PPO blocks (with 23–29 units, namely, T1301, T1307, and T150R1), particularly the one that also has long PEO blocks, were the most physically stable toward dilution.

Introduction

Poloxamine (Tetronic) amphiphilic block copolymers display great potential as components of smart or biodistribution-modified drug delivery systems and tissue engineering scaffolds.^{1–5} Unlike their linear counterparts, known as poloxamers (Pluronic), poloxamines present an X-shaped structure made of an ethylenediamine central group bonded to four chains of poly(propylene oxide)–poly(ethylene oxide) (PPO–PEO) blocks. Regular poloxamines are synthesized by the sequential reaction of the acceptor ethylenediamine molecule first with propylene oxide (PO) and then with ethylene oxide (EO) precursors, resulting in a four-arm PEO-terminated molecular structure (Figure 1a). In the case of reverse-sequential poloxamines, the acceptor is first reacted with EO and then with PO, leading to tetra-functional block copolymers displaying PPO terminal segments (Figure 1b).⁶ The unique structure of poloxamines provides them with multistimulus responsiveness. In this context, the two tertiary amine central groups play an essential role in conferring thermodynamical stability and pH sensitivity and enabling further

chemical modifications (e.g., methylation of the amine group; Figure 1c) in order to attain additional abilities.⁷

The molecular weight, EO/PO ratio, and hydrophile–lipophile balance (HLB) of poloxamine and the degree of protonation of the amine moieties strongly determine the self-associative behavior and temperature sensitiveness and, consequently, the performance as micellar carriers.^{8–11} Furthermore, the physicochemical conditions of the medium, particularly the pH and ionic strength, can alter the extent of protonation of the ethylenediamine central group, perturbing the hydrophobic interactions that govern the self-assembly process. Regardless of the impact that these structural parameters have on their performance, the information currently available is limited to a few varieties under some specific conditions, and a comprehensive and comparative investigation of behavior of the poloxamines is still lacking.

The aim of this work was to elucidate the effects of the structural features of poloxamines on the self-aggregation process in acid medium, i.e., when the conditions are the least favorable for micellization. Seven varieties of conventional sequential poloxamines (Tetronic 304, 901, 904, 908, 1107, 1301, and 1307), a reverse-sequential variety (Tetronic 150R1), and a chemically modified derivative (N-methylated Tetronic 1107) were chosen for the study. The air–water interface behavior and micellization in 10 mM HCl were thoroughly characterized, and relationships between structure and aggregation-related properties were

* Corresponding author. Fax: 34-981547148. E-mail: angel.concheiro@usc.es.

[†] Departamento de Química Física, Universidad de Santiago de Compostela.

[‡] Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Santiago de Compostela.

[§] Departamento de Física de la Materia Condensada, Universidad de Santiago de Compostela.

^{||} University of Buenos Aires and National Science Research Council (CONICET).

(1) Tröster, S. D.; Müller, U.; Kreuter, J. *Int. J. Pharm.* **1990**, *61*, 85–100.
(2) Araujo, L.; Sheppard, M.; Löbenberg, R.; Kreuter, J. *Int. J. Pharm.* **1999**, *176*, 209–224.

(3) Moghimi, S. M.; Hunter, A. C. *TIBTECH* **2000**, *18*, 412–420.

(4) Sosnik, A.; Sefton, M. V. *Biomaterials* **2005**, *26*, 7425–7435.

(5) Owens, D. E.; Peppas, N. A. *Int. J. Pharm.* **2006**, *307*, 93–102.

(6) Wu, J.; Xu, Y.; Dabros, T.; Hamza, H. *Colloids Surf. A* **2005**, *252*, 79–85.

(7) Sosnik, A.; Sefton, M. V. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 331–338.

(8) Dong, J.; Chowdhry, B. Z.; Lehar, S. A. *Colloids Surf. A* **2004**, *246*, 91–98.

(9) Chiappetta, D. A.; Sosnik, A. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66*, 303–317.

(10) Alvarez-Lorenzo, C.; Gonzalez-Lopez, J.; Fernandez-Tarrio, M.; Sandez-Macho, I.; Concheiro, A. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66*, 244–252.

(11) Fernandez-Tarrio, M.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A. *J. Therm. Anal. Calor.* **2007**, *87*, 171–178.

Poloxamine Self-Assembly

investigated. Finally, the abilities of the poloxamine micelles to solubilize simvastatin and to protect its labile lactone group and the physical stability of the drug-loaded micelles under dilution were evaluated.

Experimental Section

Materials. Tetronic 304, 901, 904, 908, 1107, 1301, and 1307 and Tetronic 150R1 were a gift from BASF Corporation (New Milford, CT) and were used as received. These copolymers are denoted as T304, T901, T904, T908, T1107, T1301, T1307, and T150R1, respectively. Simvastatin (molecular weight 418.5 Da) was from Biocon Ltd., Bangalore, India. Purified water obtained by reverse osmosis (resistivity > 18.2 MΩ cm; MilliQ, Millipore Iberica S.A.U., Madrid, Spain) was used for the different experiments. Other reagents were of analytical grade. The methylated derivative of Tetronic 1107 (met-T1107) was prepared as previously described.⁷ Briefly, T1107 was dissolved in methanol and reacted with iodomethane (900% molar excess, 24 h) at room temperature. To exchange iodide by chloride, the reaction mixture was diluted with water, and the solution was successively dialyzed against water for 24 h, 0.5% NaCl for 48 h, and water for 72 h using regenerated cellulose tubing (MWCO = 3500, Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada). Finally, the polymer was freeze-dried (Labconco Co., Kansas City, MO). The degree of methylation was estimated by the argentometric method⁷ and was found to be 49% (i.e., one out of every two N atoms was methylated).

Potentiometric Titration. Titration of poloxamines was performed using a Crison model GLP22 pH meter (Barcelona, Spain), equipped with a viscosity sensor (Ag/AgCl no. 52-21). Hydrochloric acid (0.01 M, 25 mL) was added to 0.01 M poloxamine aqueous solutions (25 mL) and then titrated with 0.01 M sodium hydroxide. To calculate the concentration of un-ionized and protonated species at any point on the potentiometric curve, the following assumptions were made:¹² (a) The total molar concentration of poloxamine in solution is the sum of the nonprotonated, mono-, and diprotonated forms

$$[T_{\text{total}}] = [T] + [TH^+] + [TH_2^{2+}] \quad (1)$$

(b) The total concentrations of cations and anions should be the same to satisfy the electroneutrality of the system

$$[H^+] + [TH^+] + 2[TH_2^{2+}] + [Na^+] = [Cl^-] + [OH^-] \quad (2)$$

The concentrations of the monoprotated and the diprotonated forms can be estimated from the dissociation constants K_{a1} and K_{a2} as follows

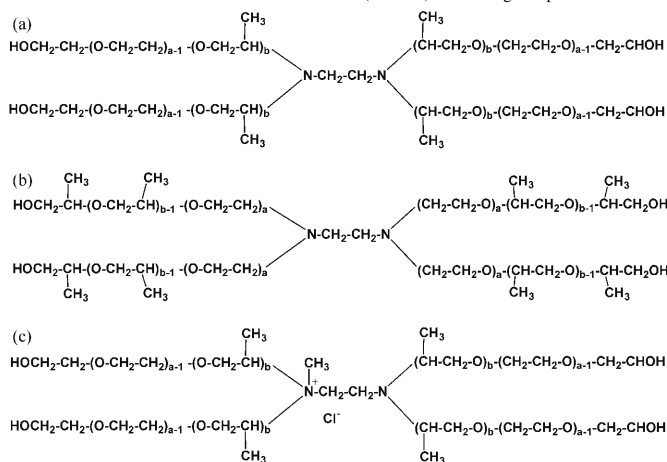


Figure 1. Structures of (a) sequential, (b) reverse-sequential, and (c) methylated sequential poloxamines.

Langmuir, Vol. 24, No. 19, 2008 10689

$$[TH^+] = \frac{[T][H^+]}{K_{a1}} \quad (3)$$

and

$$[TH_2^{2+}] = \frac{[T][H^+]^2}{K_{a2}K_{a1}} \quad (4)$$

The concentration of un-ionized poloxamine molecules is given by

$$[T] = \frac{[T_{\text{total}}]}{1 + ([H^+]/K_{a2}) + ([H^+]^2/K_{a2}K_{a1})} \left(\frac{V_{\text{initial}}}{V_{\text{initial}} + V_{\text{NaOH}}} \right) \quad (5)$$

where V_{initial} is the sum of the volumes of the poloxamine and HCl solutions and V_{NaOH} is the added volume of NaOH solution.

π -A Isotherms. The experiments were carried out with a single barrier surface balance (NIMA 611, UK) with total area 550 cm², placed on an antivibration table. The surface pressure was measured with an accuracy of ± 0.1 mN/m, using a Wilhelmy plate made from chromatography paper (Whatman Chr1, Kent, U.K.) as a pressure sensor. Prior to experiments, the trough was cleaned with chloroform and ethanol and rinsed with water. HCl (10 mM) was used as the subphase, and the temperature was maintained at 25 °C. Poloxamine chloroformic solutions (50 μ L, 1 mg/ml) were deposited by means of a syringe (Hamilton, Reno, NV) and allowed to stand for at least 10 min in order to ensure the complete evaporation of the solvent. The monolayer stability was verified by monitoring the change in surface pressure while holding the area constant. The monolayers were compressed at 15 cm² min⁻¹, and the surface pressure, π , was recorded as a function of the monolayer area and referred to the number of molecules.

Self-Aggregation in Bulk Solution. To prepare sets of solutions covering a wide range of concentrations, an appropriate amount of poloxamine was dissolved in 10 mM HCl with stirring at room temperature. The solutions were left to settle for at least 24 h before characterization. The surface tension was measured (in triplicate) by means of the platinum ring method using a Lauda TD1 tensiometer (Lauda-Königshofen, Germany) and applying the needed density corrections. Pyrene (Py) emission spectra ($\lambda = 350$ –450 nm) were recorded on a Fluoromax 2 spectrofluorometer (Jobin Yvon-Spex, Villeneuve d'Ascq, France) with the excitation wavelength set to 336 nm and slits set to 5 and 2.5 nm for excitation and emission, respectively. Pyrene (Py) was used as a probe at a concentration (10^{-6} M) low enough to prevent excimer formation in water. The

10690 Langmuir, Vol. 24, No. 19, 2008

Gonzalez-Lopez et al.

samples were prepared by addition of Py solution to copolymer solutions and stored at 25 °C for 48 h. The ratio of the intensity of the first (I_1 at 373 nm) and the third (I_3 at 384 nm) vibronic peaks was used as an index of the local hydrophobicity of the polymer/surfactant aggregates. The midpoint of the step in the plot I_1/I_3 versus poloxamine concentration was used to estimate the critical micelle concentration (CMC).¹³ Dynamic and static light scattering (DLS and SLS, respectively) intensities of poloxamine aqueous solutions were measured at 37 °C using a laser light scattering instrument (Malvern 7027, Malvern Instruments Ltd., Malvern, U.K.) with vertically polarized incident light of wavelength $\lambda = 488$ nm supplied by a 2-W argon ion laser (Coherent Inc., Santa Clara, CA) combined with a digital correlator (Brookhaven Bi 9000AT, Redditch, Worcestershire, U.K.). The intensity scale was calibrated against scattering from benzene. All solutions were filtered through Milllex filters (Triton free, 0.22- μm porosity; Millipore Iberica S.A.U., Madrid, Spain), directly placed into the cleaned scattering cell and equilibrated at each chosen temperature for 30 min. Measurements were made at a scattering angle of $\theta = 90^\circ$ to the incident beam for 5–10 min, and each experiment was repeated at least twice. The sampling time for DLS was between 25 ns and 40 ms. The DLS correlation functions were analyzed using the CONTIN method in order to obtain the intensity distributions of decay rates (Γ).¹⁴ The decay rate distributions gave distributions of apparent diffusion coefficient [$D_{\text{app}} = \Gamma/q^2$, $q = (4\pi n_s/\lambda) \sin(\theta/2)$, where n_s is the refractive index of solvent], and integration over the intensity distribution provided the intensity-weighted average of D_{app} . Values of the apparent hydrodynamic radius were calculated from the Stokes–Einstein equation

$$r_{\text{h,app}} = kT/(6\pi\eta D_{\text{app}}) \quad (6)$$

where k is the Boltzmann constant and η is the viscosity of water at temperature T .

The SLS data were analyzed using the Debye equation

$$K^*c/(I - I_s) = 1/M_w + 2A_{2c} + \dots \quad (7)$$

where I is the intensity of light scattering from the solution relative to that from toluene; I_s is the intensity of light scattering of the solvent; c is the concentration; M_w is the mass-average molar mass of the micelle; A_2 is the second virial coefficient (higher coefficients being neglected); and $K^* = (4\pi^2/n_s^2\lambda^4)(n_B^2/R_B)(dn/dc)^2$, with N_A as Avogadro's number, n_B as the refractive index of benzene (equal to $1.5131[1 - 6.4 \times 10^{-4}(T - 293)]^{15}$), R_B as the Rayleigh ratio of benzene (equal to $3.20 \times 10^{-5}[1 + 3.68 \times 10^{-3}(T - 298)] \text{ cm}^{-1}$ with T in K¹⁶), and dn/dc as the specific refractive index increment. Values of dn/dc and its temperature dependence were checked by means of an Abbé precision refractometer. The refractive indices of PEO and PPO are very close, and within the error of determination ($\pm 0.004 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), the values for the poloxamines were similar to those reported for Pluronic block copolymers.¹⁷ In addition, there was no consistent variation of dn/dc across the composition range of the copolymers. Therefore, an average value of $0.137 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ was used. The aggregation number, N , was estimated as the ratio between M_w and the molecular weight of the poloxamine unimer. Transmission electron microscopy (TEM) images were obtained as follows: A 5 μL drop of each 10% w/w poloxamine solution in 10 mM HCl was placed on a grid covered with Formvar film. After 30 s, the excess was carefully removed with a tip of filter paper, and a drop of 2% w/v phosphotungstic acid (5 μL) was added. After an

additional 30 s, the excess was removed; a drop of water (5 μL) was added and left for 30 s before being removed. The samples were then dried in a closed container with silica gel and observed using a Philips CM-12 TEM apparatus (FEI Company, Eindhoven, The Netherlands). The diameters of the micelles/aggregates were measured using a calibrated scale.

Simvastatin Solubilization. Poloxamine solutions (5 mL) in a wide range of concentrations (in 10 mM HCl) were poured into ampules containing the hypolipidemic drug simvastatin in large excess (10 mg). The ampules were flame-closed and shaken at 25 °C and 50 rpm for 72 h. Then, the ampules were opened, and the solutions were filtered through 0.45- μm cellulose acetate membranes (Albet-AC-045-25-BL, Barcelona, Spain) to remove the undissolved drug. The concentration of the dissolved drug was measured by UV spectrophotometry at 239 nm (Agilent 8453, Waldbronn, Germany), against a blank of the copolymer solution without drug using a thermostatted quartz cell to maintain the samples below the lower critical solution temperature. The ability of the copolymers to solubilize simvastatin was characterized using the following descriptors:¹⁸ (a) molar solubilization capacity, χ , i.e., the number of moles of drug that can be solubilized by 1 mol of copolymer in the micellar state

$$\chi = \frac{S_{\text{tot}} - S_w}{C_{\text{copol}} - \text{CMC}} \quad (8)$$

(b) micelle–water partition coefficient, P , which is the ratio of the drug concentration in the micelle to the drug concentration in water, for a 4% copolymer concentration

$$P = \frac{S_{\text{tot}} - S_w}{S_w} \quad (9)$$

(c) standard free energy of solubilization, estimated from the molar micelle–water partition coefficient, P_M (i.e., P for $C_{\text{copolymer}} = 1 \text{ M}$)

$$\Delta G_s^0 = -RT \ln \frac{\chi(1 - \text{CMC})}{S_w} \quad (10)$$

(d) solubilization capacity (mg) per gram of hydrophobic block calculated as the amount of simvastatin dissolved in the poloxamine solution in excess of the amount dissolved in an equivalent volume of solvent medium (10 mM HCl) referred to the mass fraction of hydrophobic blocks in each poloxamine; and (e) number of simvastatin molecules solubilized per micelle, calculated as

$$n_s = \frac{(S_{\text{tot}} - S_w)N_A}{n_m} \quad (11)$$

In these equations, S_{tot} is the total drug solubility; S_w is the drug solubility in water (in molar concentration); and n_m is the number of micelles per liter of solution, estimated as

$$n_m = \frac{(C_{\text{copol}} - \text{CMC})N_A}{N} \quad (12)$$

where C_{copol} is the molar concentration of poloxamine, N_A is Avogadro's number, and N is the aggregation number. Because the poloxamine unimer concentration above the CMC remains constant and equal to the CMC, the poloxamine concentration in the micellar form can be estimated as $C_{\text{copol}} - \text{CMC}$.

The lactone and carboxylate forms of simvastatin in the polymeric micelles (drug-saturated 10% poloxamine solutions) were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a LiChroCART RP-18 (5 μm) column kept at 40 °C, a UV–vis diode array detector (240 nm, L-4500 Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany),

(12) Dong, J.; Armstrong, J. K.; Chowdhry, B. Z.; Leharne, S. A. *Thermochim. Acta* **2004**, *417*, 201–206.

(13) Carvalho Costa, M. F.; Froehner, S. J.; Ruzza, A. A.; Santos, S. F.; Zanetti, D. *Quim. Nova* **1998**, *21*, 272–277.

(14) Provencher, S. W. *Makromol. Chem.* **1979**, *180*, 201–209.

(15) Huglin, M. B. *Light Scattering from Polymer Solutions*; Plenum Press: New York, 1972; pp 165–331.

(16) Gulari, E.; Chu, B.; Liu, T. Y. *Biopolymers* **1979**, *18*, 2943–2961.

(17) Altink, H.; Nixon, S. K.; Gorry, P. A.; Attwood, D.; Booth, C.; Klararakis, A.; Haveladakis, V. *Colloids Surf. B* **1999**, *16*, 73–91.

(18) Rangel-Yagui, C. O.; Costa-Tavares, L. C. T. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2005**, *8*, 147–163.

Table 1. Structural Properties of Different Poloxamine Derivatives

poloxamine	physical state at 25 °C	molecular weight (Da)	$\bar{N}_{EO}^{a,b}$	$\bar{N}_{PO}^{c,b}$	HLB	β	pK_{a1} , pK_{a2}
T304	liquid	1650	3.7	4.3	12–18	2.32	4.3, 8.1
T901	liquid	4700	2.7	18.2	1–7	6.68	5.1, 7.6
T904	paste	6700	15	17	12–18	2.29	4.0, 7.8
T908	cast solid	25 000	114	21	>24	0.77	5.2, 7.9
T1107	cast solid	15 000	60	20	18–23	1.10	5.6, 7.9
met-T1107	powder	15 030	60	20	—	1.10	—
T1301	liquid	6800	4	26	1–7	6.53	4.1, 6.2
T1307	cast solid	18 000	72	23	>24	1.07	4.6, 7.8
T150R1	liquid	7900	5	29	1–7	6.10	4.8, 7.5

^a \bar{N}_{EO} = mean number of EO units per PEO block. ^b From Chiappetta and Sosnik. ^c \bar{N}_{PO} = mean number of PO units per PPO block.

and acetonitrile–28 mM phosphate buffer pH 4 (65:35, 1 mL/min flow) as the isocratic mobile phase, following the procedure developed by Alvarez-Lueje et al.¹⁹ The retention times of the carboxylate and lactone forms were 4.5 and 8 min, respectively.

The stability of simvastatin-loaded micelles against dilution was evaluated as follows: One milliliter of 10 mM HCl was placed in a thermostatted quartz cell to make the blank of absorbance at 239 nm with the spectrophotometer working in kinetics mode (Biochemical Analysis Software, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Then, 40 μ L of a filtered 10% poloxamine micellar solution saturated with simvastatin (coming from the simvastatin solubility studies) was added to the cell. The program was set up to record absorbance values (at 239 nm) immediately after the dilution (every 30 s over 2 h).

Results and Discussion

General Aspects of Poloxamines. The most commonly used poloxamines are the sequential surfactants (Figure 1a); among these, seven varieties of different molecular weight, PO/EO ratio, and consistency (liquid, paste, or solid) were chosen for the present study (Table 1). An N-methylated derivative of T1107 (met-T1107; Figure 1c) and a reverse poloxamine (T150R1; Figure 1b) were also evaluated. Commercially available Tetronics can contain small proportions of impurities, mainly copolymer segments of smaller molecular weight. Because those segments cannot cause biocompatibility problems, Tetronics are used for pharmaceutical purposes without further purification. Thus, the poloxamines were directly evaluated, although we are aware that the presence of impurities, if any, could slightly modify the surface properties of their solutions.²⁰

The hydrophobicity of a PEO–PPO-based amphiphile can be characterized through both the hydrophilic–lipophilic balance (HLB) and the β value. The latter parameter represents the ratio between the Flory radius of the PPO blocks and that of the PEO blocks²¹

$$\beta = \frac{I_{PO}(N_{PO})^{3/5}}{I_{EO}(N_{EO})^{3/5}} \quad (13)$$

where N_{PO} and N_{EO} are the numbers of PO and EO units, respectively, and I_{PO} and I_{EO} are the corresponding lengths of the PO (5.1 Å) and EO (2.4 Å) units.²¹

According to the values of both HLB and β (Table 1), the poloxamines evaluated can be classified in three main groups: (a) those that are highly hydrophilic ($\beta \approx 1$) and have HLB > 18 (T908, T1107, and T1307), (b) those that are highly hydrophobic with β above 6 and have HLB ranging between 1 and 7 (T901, T1301, and T150R1), and (c) those with an intermediate polarity (T304 and T904). Neither HLB nor β provides information about

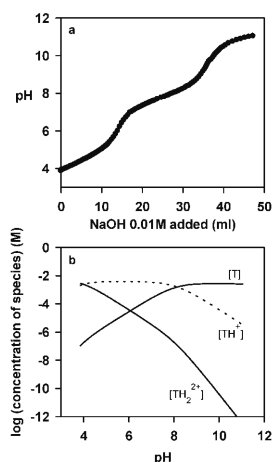


Figure 2. (a) Potentiometric titration curve obtained for T1307 and (b) dependence of the concentrations of the nonprotonated and protonated forms of T1307 as a function of pH.

the effect of protonation on the hydrophilicity of the unimers (e.g., β is similar for T1107 and met-T1107).

To gain insight into the protonation degree of the poloxamines under the conditions of the present study, the pK_a values were determined. The titration profiles of the poloxamines showed two inflection points that correspond to the dissociation of the protons of the central ethylenediamine group (Figure 2a for T1307).^{8,10,22} The pK_{a1} and pK_{a2} values were in the ranges 4.0–5.6 and 7.5–8.1, respectively (Table 1), and are similar to those previously found for T701.⁸ In general, the diprotonated form is the predominant one at pH values below 4, and its concentration is greater than that of the nonprotonated form up to pH 5.8. The monoprotonated form predominates in the pH range from 4.0 to 7.9 (Figure 2b). The Coulombic repulsions among the positively charged amine groups at the center of the PPO chains constrains the self-aggregation,²³ as confirmed by the DLS and SLS results (see below). The balance between the free energy of micellization and the free energy of protonation determines the possibility of micelle formation, and it can be represented as follows for the pH range in which the monoprotonated form predominates

(19) Alvarez-Lueje, A.; Valenzuela, C.; Squella, J. A.; Nuñez-Vergara, L. J. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 1631–1636.

(20) Booth, C.; Attwood, D. *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21*, 501–527.

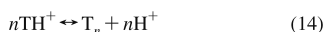
(21) Munch, M. R.; Gast, A. P. *Polym. Commun.* **1989**, *30*, 324–326.

(22) Fernandez-Tarrio, M.; Yañez, F.; Immesoete, K.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A. *AAPS PharmSciTech* **2008**, *9*, 471–479.

(23) Armstrong, J. K.; Chowdhry, B. Z.; Snowden, M. J.; Dong, J.; Lehame, S. A. *Int. J. Pharm.* **2001**, *229*, 57–66.

10692 *Langmuir*, Vol. 24, No. 19, 2008

Gonzalez-Lopez et al.



$$K_{\text{micellization}} = \frac{[\text{T}_n][\text{H}^+]^n}{[\text{TH}^+]^n} \quad (15)$$

It has been previously reported for T803 and T904 that, as the pH decreases, the deprotonation–micellization process becomes more difficult, leading to an increase in the CMC and a decrease in the micellar size.^{8,10} The high impact of the conditions of the medium on aggregation motivated us to explore the behavior of poloxamines displaying a broad range of EO/PO ratios and molecular weights at pH values below the $\text{p}K_{\text{a}1}$, where similar degrees of protonation in the case of the unimers can be attained. Hence, the elucidation of the effect of these structural features on self-assembly under unfavorable conditions would be possible.

π -A Isotherms. The π -A isotherms of the different poloxamines using 10 mM HCl as the subphase are shown in Figure 3. T304 exerted a relatively low resistance to compression, as expected from its low molecular weight, short PPO and PEO segments, and high aqueous solubility. With the other poloxamines, two different isotherm patterns were apparent. The isotherms of poloxamines with low relative PEO contents (i.e., T901, T904, T1301, and T150R1) presented two well-differentiated regions. In contrast, poloxamines with the highest relative PEO contents, i.e., T1107 and its methylated derivative (met-

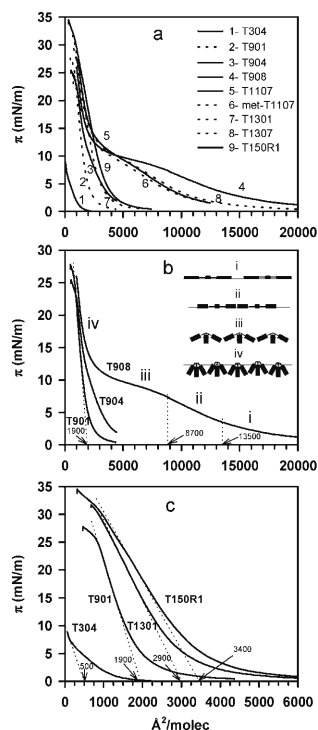


Figure 3. π -A isotherms recorded using 10 mM HCl as the subphase: (a) all poloxamines evaluated, (b) poloxamine varieties with similar numbers of PO units but different numbers of EO units and a model of the arrangement of the copolymer molecules as the monolayer is compressed, and (c) poloxamine varieties with a low proportion of EO units.

T1107), T1307, and T908, led to three- or four-region isotherms (Figure 3a).

A comparison of the isotherms recorded for T901, T904, and T908, on one hand, and the isotherms recorded for T1301 and T1307, on the other, enabled the effect of the number of EO units on the isotherm pattern to be revealed. The isotherms of copolymers displaying a similar number of PO units but a different number of EO units strongly differed in the shape, at low surface pressures. Contrary to this, at greater pressures, they merged becoming superimposable. When no pressure is exerted, the copolymer lies on the interface with a flat (“pancake”) conformation parallel to the surface plane.^{24,25} The area occupied is a function of the number of PO and EO units. Roughly, the maximum cross-sectional area occupied by an EO unit is 13–16.5 Å², and that occupied by a PO unit is 17.5 Å², as previously reported.^{26,27} Once hydrated, the areas of EO and PO increase by 8.5 Å² (a water molecule). The ethylenediamine group could cover ~25 Å². For example, once the compression of the T908 (with 80% w/w EO) monolayer began, the surface pressure gradually increased to 13 500 Å²/molecule (Figure 3b-i). This value agrees with the sum of the maximum transverse area occupied by all EO and PO units and the central ethylenediamine group of T908. As the pressure increased, the hydrophobic PPO blocks initially on the air–10 mM HCl interface were lifted away. The surface pressure at which this phenomenon occurs is usually very low, owing to the weakness of the interaction between the aqueous medium and the hydrophobic groups²⁸ (Figure 3b-ii). The 8700 Å²/molecule area corresponds to the sum of the area occupied by ca. 348 units of PO and EO; i.e., the arrangement of the molecules leads to an occupied area 36% lower than the original value. From 7.3 to 11 mN/m, another region of lower slope appears, owing to a change in the conformation of poloxamine to enable the penetration of the hydrophilic PEO chains into the subphase; the copolymer adopts a “mushroom” conformation (Figure 3b-iii). In this region, there is a slight increase in the surface pressure as the surface area is decreased, indicating that a true first-order transition does not occur. This plateau²⁹ or “pseudoplateau”^{30,31} in the pressure–area isotherms is interpreted as a rearrangement of the PPO coils into “loops” within the monolayer regime and the immersion of more EO units in the aqueous subphase. The end of the pseudoplateau corresponds to an area of ~1900 Å²/molecule, which indicates that all of the EO units are in the subphase and, at the same time, the surface is exclusively occupied by the PPO blocks.

Further compression causes a rapid increase in π . Poloxamine molecules gradually become closer, the mobility of the blocks becomes restricted because of both space limitations and the increase in lateral interactions, and the copolymer molecules reorganized into a “brush conformation”^{25,27,32,33} (Figure 3b-iv). In the subphase, the helical PEO chains entangle with

(24) Haefele, T.; Kita-Tokarczyk, K.; Meier, W. *Langmuir* **2006**, *22*, 1164–1172.

(25) Kiss, E.; Keszthelyi, T.; Kormany, G.; Hakkell, O. *Macromolecules* **2006**, *39*, 9375–9384.

(26) O’Connor, S. M.; Gehrke, S. H.; Retzinger, G. S. *Langmuir* **1999**, *15*, 2580–2585.

(27) Muñoz, M.; Monroy, F.; Ortega, F.; Rubio, R. G.; Langevin, D. *Langmuir* **2000**, *16*, 1083–1093.

(28) Hann, R. A. *Molecular Structure and Monolayer Properties*. In *Langmuir–Blodgett Films*; Roberts, G., Ed.; Plenum Press: New York, 1990; pp 18–23.

(29) Wesemann, A.; Ahrens, H.; Steitz, R.; Forster, S.; Helm, C. A. *Langmuir* **2003**, *19*, 709–716.

(30) Bijsterbosch, H. D.; Dehaan, V. O.; Degraaf, A. W.; Mellema, M.; Leermakers, F.; Stuart, M.; Vanwell, A. A. *Langmuir* **1995**, *11*, 4467–4473.

(31) Szeleifer, I. *Europhys. Lett.* **1998**, *44*, 721–727.

(32) Chen, C.; Even, M. A.; Chen, Z. *Macromolecules* **2003**, *36*, 4478–4484.

(33) Chang, L.-C.; Lin, C. Y.; Kuo, M.-W.; Gau, C.-S. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *285*, 640–652.

Poloxamine Self-Assembly

neighboring copolymer molecules, whereas at the interface, the PPO blocks can form loops and even be partially solubilized in the aqueous PEO layer (this process might be facilitated by the protonated ethylenediamine group). If the area is further restricted, both hydrophilic and hydrophobic blocks become stretched (condensed state).²⁶

Because of their lower contents in EO units, T901 and T904 exhibited π - A isotherms with two differentiated regions, and they were much less expanded than T908 at low surface pressures. At relatively high pressure ($\pi > 14$ – 15 mN/m), the contribution of PPO becomes predominant, and the isotherms of T908, T904, and T901 superimpose. Thus, for a given PPO block size, the greater the length of the PEO blocks, the greater the region corresponding to the expanded state. Comparing the π - A isotherms of T1107, met-T1107, and T1307 with that T908 (Figure 3a), it is clear that the higher the number of EO units, the more prolonged the plateau region.

The influence of the size of the PPO blocks can be compared in the π - A isotherms of T901, T1301, and T150R1 (Figure 3c), which have a similarly small number of EO units but substantially different numbers of PO units (Table 1). As expected, the surface pressure of the T901 monolayer was measurable at a significantly smaller area per molecule than for the monolayers of the larger copolymer molecules such as T1301 and T150R1. Two different regions can be distinguished in the isotherms. When the area per molecule is large, the surface pressure slowly increases as the area decreases. Above 12 mN/m, a sharp increase in the surface pressure occurs. The extrapolation of the data obtained above this pressure indicates that the area occupied per molecule at the condensed state is 1900 Å² for T901, 2900 Å² for T1301, and 3400 Å² for T150R1. These values are in agreement with the areas predicted from the number of PO units of T901, T1301, and T150R1, respectively, and support the fact that the interface is occupied only by PPO blocks. A similar behavior was observed for T304, which has a similar number of EO units as T901, T1301, and T150R1 but a markedly lower content in PO units. The area of T304 in the collapsed state (500 Å²/molecule) agrees with the area occupied by its PO units. The similarity of the π - A isotherms of T1301 and T150R1 confirms that a change in the structural position of the PEO and PPO blocks in the molecule does not significantly alter the air-water interfacial behavior.

Self-Associative Behavior. Surface tension and pyrene fluorescence measurements were conducted to estimate the CMC. There are relevant examples in the literature that evidence significant discrepancies depending on the technique applied, which are mainly related to the different properties evaluated and to the lack of a homogeneous criterion for selecting the concentration value that corresponds to the CMC.¹³

Semilogarithmic plots of the surface tension as a function of the poloxamine concentration (Figure 4) again allows the poloxamines to be classified into three well-differentiated groups. T304 showed the lowest surface activity, and two regions in the surface tension plot were distinguished: (a) the surface tension slowly decreased as the T304 concentration rose to 0.5 mM, and (b) above this concentration, a marked decrease was observed up to 12 mM, and then a plateau was reached. Twelve millimolar was assumed to be the CMC (Table 2). This finding indicates that a high number of the small T304 molecules is required to saturate the air-water interface (as shown in the π - A isotherm of Figure 3c) and to decrease the surface tension. The surface tension patterns of T1107, met-T1107, T908, and T1307 are quite similar to each other. T1107, T908, and T1307 have the lowest PO/EO ratios and, thus, the highest HLBS. An almost constant slope in the semilogarithmic plot was recorded, and

Langmuir, Vol. 24, No. 19, 2008 10693

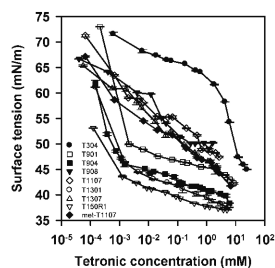


Figure 4. Surface tension plots of poloxamines in 10 mM HCl at 25 °C.

Table 2. CMC Values Estimated Using Surface Tension Measurements, Pyrene Fluorescence, and Solubilization of Simvastatin in 10 mM HCl at 25 °C

poloxamine	self-aggregation concentrations (mM)		
	surface tension	I_{371}/I_{381}	minimum solubilizing concentration
T304	12.1	6.06	12.1
T901	2.12	1.48	1.49
T904	0.29	1.04	1.04
T908	0.28	0.40	0.80
T1107	0.67	0.46	0.67
met-T1107	0.67	0.67	0.67
T1301	1.47	0.15	1.47
T1307	0.56	0.56	0.56
T150R1	0.88	0.09	0.88

above a certain concentration, the surface tension values did not change significantly when more copolymer was added. A third type of pattern was observed for the poloxamines with the highest PO/EO ratios and low-to-medium HLBS, i.e., T901, T904, T1301, and T150R1, which makes them highly surface-active. The surface tension plots of these last copolymers have an initial sharp slope up to 10⁻³ mM, followed by a second region of much lower slope.

The CMC was identified as the copolymer concentration above which the surface tension values changed the least (Table 2). This criterion is usually followed in the case of copolymers that show several regions of different slopes in the surface tension plots and, consequently, deviate from the model classically used to interpret the behavior of surface-active substances.^{8,34} The different slopes in the semilogarithmic plot (Figure 4) might reflect conformational changes of the copolymer to enable more copolymer molecules to reach the interface, as previously reported for some Pluronic.³⁴ It has been previously shown for Tetronic 803 that the middle region of its surface tension plot becomes more evident as the pH of the medium decreases and the unimers are in the diprotonated form, which was related to the hindering effect of protonation on the micellization phenomenon. The CMC of T803 at pH 2.8 has previously been reported to be 1.6 mM,⁸ which is in the range of CMC values obtained for the poloxamine varieties evaluated in the present study. In sum, the surface tension plots clearly reveal that, even at acid pH, all of the poloxamines evaluated self-assemble at relatively low concentrations.

Solubilization of pyrene into the hydrophobic environment of poloxamine micellar cores can be detected as a decrease in the I_1/I_3 ratio (Figure 5). The plots for T1301 and T150R1 evidence a marked increase in the hydrophobicity of the environment

(34) Alexandridis, P.; Athanassiou, V.; Fukuda, S.; Hatton, T. A. *Langmuir* 1994, 10, 2604–2612.

10694 Langmuir, Vol. 24, No. 19, 2008

Gonzalez-Lopez et al.

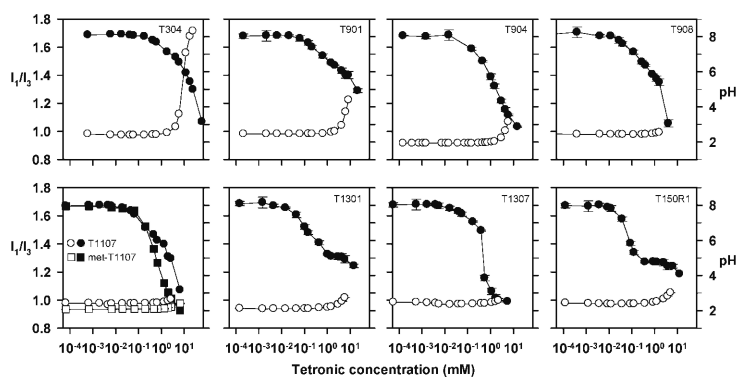


Figure 5. Ratio of the first to third vibronic peaks of pyrene (solid symbols) and pH (open symbols) as functions of poloxamine concentration.

when the unimers associate as micelles. The other poloxamine varieties show a less pronounced slope, with a broad range between the concentration at which the first changes in the I_1/I_3 ratio are observed and the concentration at which the plateau is reached. The CMC was estimated as the concentration at the midpoint of the step in the values of the I_1/I_3 ratio.¹³ This inflection point occurred at significantly lower concentrations for T1301 and T150R1 than for the other poloxamines (Table 2). As mentioned above, T1301 and T150R1 consist of long PPO blocks with a high PO/EO ratio that leads to a low HLB and a high β . The maximum poloxamine concentration plotted in Figure 5 is 10% w/w and, as can be seen for all poloxamines except for T1107, T1301, T130, and T150R1, the stabilization of the I_1/I_3 ratio occurs only at high concentration. These findings reveal that a high number of micellar structures of T901, T904, T908, and T1307 are required in the medium to provide a sufficiently hydrophobic environment to host the pyrene molecule. Compared to T1107, the methylated derivative (met-T1107) shows a nearly superimposable profile, which means that methylation does not significantly alter the self-association of the poloxamine.

The evolution of pyrene fluorescence in T304 systems is more complex. Because of the low tendency of T304 to self-associate, owing to its low molecular weight and its small PPO blocks, an extremely high number of T304 molecules in the medium might be required to provide a hydrophobic microenvironment for pyrene. Additionally, such a high concentration results in a strong increase of the pH of the medium (Figure 5). Under these conditions, the pyrene molecules interacting with the PO units are expected to come close to the central diamine group, and a photoinduced electron transfer (PET) from the amino groups to the excited pyrene molecules could occur.³⁵ Thus, the quenching in fluorescence and the change in the pyrene fluorescence profile might reflect not only the hydrophobicity of T304 micelles but also other types of interactions.

The CMC values of the poloxamines under investigation are of the same order of magnitude as those of diblock and triblock PO–EO copolymers (including poloxamers). More relevant, a close negative correlation between the $\log(\text{CMC})$ value (proportional to the Gibbs energy of micellization when concentration is expressed in mol/dm^3) and the total hydrophobe chain length (i.e., four times the N_{PO} values of Table 1) was found when the CMC values were those obtained from the pyrene fluorescence assay (see Figure S1 in the Supporting Information). This means

that the longer the hydrophobic chains, the lower the CMC. A similar negative close correlation was previously found for diblock and triblock amphiphilic copolymers with hydrophilic PEO blocks.²⁰ An increase of 1 in $\log(\text{CMC})$ per 100 EO units was observed for those copolymers.²⁰ The poloxamines evaluated in the present study significantly differ in the length of the PEO blocks (ranging from 3 to 114 EO units), but the changes in CMC as a function of the number of EO units are less marked, which explains the small scattering of the data points on the semilogarithmic plot. In the case of poloxamines, the slope of the plot is significantly smaller (0.019) than the slopes recorded for the related diblock and triblock copolymers (0.041–0.056). Thus, the particular X-shape of poloxamines notably influences the self-assembly process, the incidence of the PO units on the CMC being less marked. This finding might be related to the fact that the PO blocks are separated in four arms connected by a hydrophilic central ethylenediamine group. Thus, to increase one PO unit per arm, four PO units per molecule are required.

Micellar Size and Aggregation Number. DLS and SLS were used to obtain information about the size of the micelles and the aggregation number. The dissymmetry (I_{45}/I_{135}) was 1.04 or less, which is consistent with micelles that have a small radius of gyration. The Debye equation taken to the second term, A_2 , could not be used to analyze the SLS data, as micellar interactions caused curvature of the Debye plot across the concentration range investigated for most of the block copolymers analyzed (see Figure S2 in the Supporting Information as an example). The curves were fitted using a procedure based on scattering theory for hard spheres^{36–38} whereby the interparticle interference factor (structure factor, S) in the scattering equation

$$K^*c/(I - I_0) = 1/SM_w \quad (16)$$

was estimated as

$$1/S = [(1 + 2\phi)^2 - \phi^2(4\phi - \phi^2)](1 - \phi)^{-4} \quad (17)$$

where ϕ is the volume fraction of equivalent uniform spheres. Values of ϕ were conveniently calculated from the volume fraction of copolymer in the system by applying a thermodynamic expansion factor $\delta_1 = v_1/v_a$, where v_1 is the thermodynamic volume of a micelle (i.e., one-eighth of the volume, u , excluded by one micelle by another) and v_a is the anhydrous volume of a micelle

(36) Percus, J. K.; Yevick, G. J. *J. Phys. Rev.* **1958**, *110*, 1–13.

(37) Vrij, A. *J. Chem. Phys.* **1978**, *69*, 1742–1747.

(38) Carnahan, N. F.; Starling, K. E. *J. Chem. Phys.* **1969**, *51*, 635–636.

Poloxamine Self-Assembly

Langmuir, Vol. 24, No. 19, 2008 10695

($v_a = \nu M_w/N_A$, where ν is the partial specific volume of the copolymer solute).

The fitting parameter, δ_t , applies as an effective parameter for compact micelles irrespective of their exact structure. This method is equivalent to using the virial expansion for the structure factor of effective hard spheres taken to its seventh term but just requires two adjustable parameters, i.e., M_w and δ_t .^{36–38} In addition, the weight-average association number, N , of the copolymer micelles was calculated from the micellar molecular mass derived from the fitting procedure above and the weight-average molecular weight of the copolymer in the unimer state.

On the other hand, assuming the mean length of a PO or EO unit to be 0.36 nm and neglecting the size of the diamine unit, the average core volume (v_c) and core radius (r_c) can be estimated assuming spherical micellar shape from the equation³⁹

$$v_c = (4/3)\pi r_c^3 = \nu v_s N_w \quad (18)$$

where v_{PO} is the volume of a PO unit

$$v_{PO} = M_{w,PO}/\rho_{PO}N_A \quad (19)$$

with $M_{w,PO} = 58.1 \text{ g mol}^{-1}$ and $\rho_{PO} = 1.08 \text{ g cm}^{-3}$ being the molar mass and the density of a PO unit, respectively, assuming spherical micelle cores with no penetration of water.

Accordingly, with the assumption that micelles have a spherical structure with a liquidlike core free of solvent molecules,⁴⁰ further evaluation of the extent of drainage of the micellar corona could be performed. From the reduction of the thermodynamic radius, r_t , by r_c , the thickness of the micellar corona is derived, and, hence, the volume of each solvent swollen EO unit, v_E , can be estimated from the relation

$$(4/3)\pi(r_t^3 - r_c^3) = mN_w v_E = \langle L_h \rangle \quad (20)$$

where L_h is the micellar corona thickness and v_E is the volume of each solvent-swollen EO unit. Taking into account that the volume of a nonswollen liquid EO unit is 0.073 nm^3 and that the volume of a water molecule is close to 0.030 nm^3 , the number

of water molecules associated with each EO unit, n_w , can be estimated. Table 3 summarizes the results obtained. No confident values could be obtained for T304 owing its low tendency to form micelles. The T901 and T150R1 solutions were cloudy at $37 \text{ }^\circ\text{C}$, and such partial unsolubilization led to aggregates of $40\text{--}50 \text{ nm}$. Although a similar phenomenon was observed for T1301, the correlation function enabled a peak to be seen at lower size due to the micelles, which was used for further estimations.

TEM micrographs (Figure 6) enabled the characterization of the morphology and size of the aggregates. T304 led to the formation of a film on the microscope grids, and the visualization of micelles was not possible. In general, spherical nanostructures were apparent. It is worth mentioning that, in full agreement with the data found by light scattering, an increase in the PO/EO ratio led to a clear increase in the size of the micelles. T901 and T150R1 samples evidenced the coexistence of aggregates of varied sizes. Such behavior was also seen for T1301 systems, although less markedly. The micellar size of the rest of the poloxamines agreed with the molecular weight of the copolymers and the aggregation number. In addition, more homogeneous size distributions were observed. Even though T1107 and T1307 have similar PEO cores contents (70 wt %), the former is less hydrophilic than the latter (shorter PEO segments) because of a lower molecular weight and, hence, follows the general trend, showing smaller sizes. Methylation of poloxamine was meant to modify the properties of the core in order to improve the drug/micelle affinity of negatively charged molecules. However, introduction of a pH-independent positive charge was expected to affect the aggregation. In this framework, comparing T1107 and its methylated counterpart was a central goal of the present work. The findings indicate that the quaternized derivative self-assembles in micelles of markedly lower size. Despite the inherent problems of TEM due to solvent evaporation during sample preparation, which can affect the size and structure of the specimen, the DLS and TEM sizes are in good agreement. It is

Table 3. Micellar Parameters^a of Poloxamines in 10 mM HCl at $37 \text{ }^\circ\text{C}$

poloxamine	micellar molecular weight (Da)	N	r_h (nm)	δ_t	r_t (nm)	$A_2 \times 10^4$ ($\text{cm}^3 \text{ mol}^2 \text{ g}^{-2}$)	r_c (nm)	v_c (nm^3)	n_w
T901	—	—	40	1	—	—	—	—	—
T904	92 000	14	5.9	2.2	4.1	0.9	3.5	0.52	15
T908	167 000	7	5.6	1.1	4	0.3	3	—	5
T1107	63 000	4	7.6	3.2	4.1	2.1	2.4	0.98	33
T1107-met	47 000	3	4.9	2.2	3.7	1.4	2.2	0.75	27
T1301	346 000	51	12.1	1.9	6.3	0.2	5.7	—	35
T1307	88 000	5	8.3	3.6	4.9	2	2.7	0.83	34
T150R1	—	—	50	1	—	—	—	—	—

^a N = aggregation number, r_h = hydrodynamic radius, δ_t = expansion factor, r_t = thermodynamic radius, A_2 = virial coefficient, r_c = radius of micellar core, v_c = volume of the hydrated EO unit, n_w = number of water molecules associated with each EO unit.

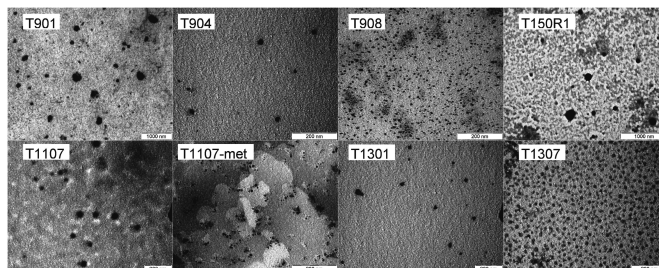


Figure 6. TEM micrographs of 10% poloxamine solutions prepared in 10 mM HCl and negatively stained with phosphotungstic acid.

10696 *Langmuir*, Vol. 24, No. 19, 2008

Gonzalez-Lopez et al.

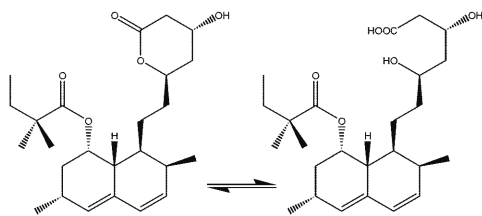


Figure 7. Structures of the lactone and hydroxy acid forms of simvastatin.

also noteworthy that, because specimens analyzed by means of microscopy are often not representative of the whole sample, accurate measurement of size and size distribution is a problematic issue. Having expressed this, these results were complementary of DLS. We are also aware that DLS gives an average size estimation, which is biased toward the larger-size end of the population distribution, whereas single particles are imaged by TEM.

Simvastatin Solubilization. The ability of poloxamine micelles to host poorly water-soluble drugs and to serve as solubilizers, stabilizing agents, and carriers is critical for their pharmaceutical applications. The different self-associative behavior of the Tetriconic varieties could notably condition their performance. Simvastatin is a polycyclic compound with a pH-dependent structure and solubility, being practically insoluble at acidic pH.^{41,42} At intermediate pH values (pH \approx 5), simvastatin predominantly exists in a lactonic form (Figure 7). However, it can be reversibly hydrolyzed to the hydroxy acid form at both very low and alkaline pH.¹⁹ Formulation of simvastatin in micellar systems is an attractive approach to overcome its limited oral bioavailability.^{43,44}

In this context, we investigated the solubilization of the lactone in different poloxamine micellar systems produced in 10 mM HCl. This medium is the most unfavorable for both drug solubilization and poloxamine self-assembly and also mimics the gastric environment. Moreover, polymeric micelles have also shown the ability to stabilize sensitive molecules.⁴⁵ Thus, we were interested in gaining further insight into the molecular features that influence the ability of poloxamine micelles to protect simvastatin lactone from the biological environment, preventing hydrolysis to the open form. It has previously been reported that protonation of the central diamine group could eventually lead to a decrease in the solubilizing ability in the post-CMC region.^{8,22} Nevertheless, a notable increase in simvastatin solubility was observed above the CMC with all of the poloxamines evaluated, the enhancement of the solubility being particularly dramatic in the cases of T1301 and T150R1 (Figure 8). The marked differences in the solubilizing capability of poloxamines (Table 4) are explained by their diverse relative contents of EO/PO groups. T1301 and T150R1 display the highest surface activities (Figure 3) and provide micellar cores with a more hydrophobic environment (Figure 4). These properties are directly related to

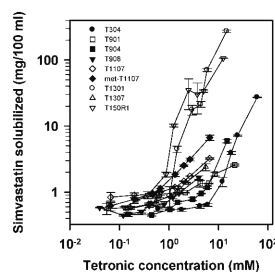


Figure 8. Dependence of simvastatin solubility in 10 mM HCl at 25 °C on the poloxamine concentration.

the ability of the copolymers to wet the surface of the drug particles and to host the drug in the micellar nucleus, i.e. to act as solubilizers. In quantitative terms, micellar solutions of 10% T901, T904, T908, T1107, met-T1107, T1301, T1307, and T150R1 enhanced simvastatin solubility by factors of 3.7, 8.5, 2.4, 4.7, 8.3, 391, 21, and 152, respectively. Furthermore, HPLC analysis of the micellar solutions was performed to quantify the extent of the original lactone form that remained in the system.¹⁹ The results shown in Table 4 clearly indicate that the lactone form predominates in the micellar systems constituted by T1301, T1307, or T150R1, which contain the longest PPO blocks. The apparent partition coefficients of the lactone and hydroxy acid forms at pH 5 have been estimated as 53 800 and 4200, respectively.⁴² The hydrophobic cores of T1301, T1307, and T150R1, which are the most hydrophobic ones, are able to host the lactone species and to protect them efficiently against the hydrolysis caused by the surrounding acid aqueous environment. The relatively larger radius of the micellar core of T1301 (Table 3) explains its highest ability to load and protect lactone molecules compared to the micelles formed by the other poloxamines.

The relatively high solubilization observed in T304 solutions (39-fold) is explained not only by the micellar hosting (expected to be poorly efficient from the self-aggregation data discussed above) but also by the increase that T304 causes in the pH of the medium, which can promote the lactone form of simvastatin to transform into a salt of the hydroxy acid form. It has been previously reported that simvastatin interacts with anionic exchange resins,⁴⁶ and similarly, the anionic hydroxy acid can form soluble salts with the poloxamine (through the diethylamine group). Furthermore, the anionic form of simvastatin has a much higher solubility in aqueous medium than the lactone and the free hydroxy acid forms.⁴⁷ Thus, the ionization of simvastatin and its Coulombic interaction with T304 should be the main responsible for the sharp solubility increase. Finally, a comparison between T1107 and its methylated derivative indicates a significant increase in the solubilization ability and protection of the lactone form by the latter (Table 4). As previously described, the hydrolyzed form of simvastatin interacts electrostatically with quaternary ammonium groups (e.g., cholestyramine)⁴⁶ and generates stable complexes that curtail gastrointestinal absorption of the drug. The findings suggested that a higher drug/micellar core affinity due to the modification of poloxamine structure would play an important role.

Because of the relatively low hydrophobicity of PPO segments, PEO-PPO micelles can undergo disassembly upon dilution.⁹

(39) Flory, P. J. *Principles of Polymer Chemistry*; Cornell University Press: Ithaca, NY, 1953; p 336.

(40) Zhou, Z. K.; Chu, B. J. *Colloid Interface Sci.* **1988**, *126*, 171–180.

(41) Schachter, M. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2005**, *19*, 117–125.

(42) Searjuddin, A. T. M.; Ranadive, S. A.; Mahoney, E. M. *J. Pharm. Sci.* **1991**, *80*, 830–834.

(43) Ding, Z.; Hao, A.; Zhang, P.; Wang, Z. J. *Disper. Sci. Technol.* **2007**, *28*, 495.

(44) Patel, R.; Buckton, G.; Gaisford, S. *Thermochim. Acta* **2007**, *456*, 106–113.

(45) Barreiro-Iglesias, R.; Bromberg, L.; Temchenko, M.; Hatton, T. A.; Concheiro, A.; Alvarez-Lorenzo, C. J. *Control. Release* **2004**, *97*, 537–549.

(46) Nakai, A.; Nishikata, M.; Matsuyama, K.; Ichikawa, M. *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, *19*, 1231–1233.

(47) Ellison, D. K.; Moore, W. D.; Petts, C. R. Simvastatin. In *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*; Brittain, H. G., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, 1993; Vol. 22, p 377.

Table 4. Simvastatin Solubilization Parameters in 4% Poloxamine Solutions in 10 mM HCl and Ratio of Lactone to Hydroxy Acid Forms of Simvastatin in Drug-Saturated 10% Poloxamine Solutions in 10 mM HCl

poloxamine (4%)	solubilization parameters						
	χ	P	ΔG_s° (cal/mol)	f_{micelle}^a	simvastatin/PO (mg/g)	molecules per micelle	lactone/hydroxy acid ratio ^b
304	12.8×10^{-3}	9.32	-3927.5	0.90	2.73	—	0:1
901	4.01×10^{-3}	1.69	-3245.7	0.63	0.33	—	0.2:1
904	2.13×10^{-3}	0.69	-2871.5	0.41	0.21	0.032	0:1
908	7.81×10^{-3}	0.38	-3641.5	0.28	0.34	0.054	0.2:1
1107	12.6×10^{-3}	1.51	-3923.3	0.60	0.87	0.050	0:1
met-1107	20.9×10^{-3}	3.49	-4418.1	0.77	1.99	0.116	1.5:1
1301	379×10^{-3}	100.4	-5940.0	0.99	20.1	19.3	20:1
1307	22.0×10^{-3}	2.20	-4255.1	0.69	1.32	0.110	8:1
150R1	171×10^{-3}	47.5	-5469.8	0.98	9.90	—	7.5:1

^a Fraction of drug solubilized by incorporation into the micelle. ^b A solution of simvastatin in the mobile phase resulted in a lactone/hydroxy acid ratio of 1:0.

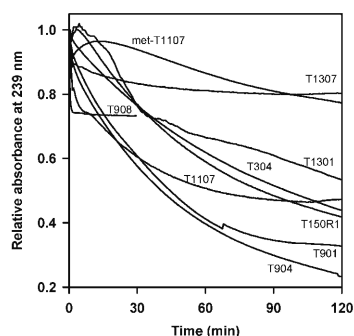


Figure 9. Evolution of the concentration of simvastatin solubilized as a function of time when drug-saturated 10% poloxamine solutions were diluted to a concentration close to or below the CMC.

Thus, the effect of diluting the drug-loaded micellar systems prepared with 10% copolymer (i.e., the highest concentration shown in Figure 8) was evaluated by monitoring the absorbance at 239 nm over time. After a 26-fold dilution that led to resulting poloxamine concentrations close to or below the CMC, the decrease in the absorbance was attributed to the partial insolubilization of the drug owing to demicellization phenomenon (Figure 9). The micelles that disintegrated more quickly were those of T901, T904, T908, and T1107. The most stable micelles were those of met-T1107 and T1307. Micellar systems of T304, T1301, and T150R1 showed an intermediate behavior still retaining 62%, 66% and 59% of the solubilized drug, respectively, after 1 h. In sum, those poloxamines of greater molecular weight and higher PO/EO ratio (T1301 and T150R1) are the most adequate for solubilizing and protecting simvastatin in the lactone form, even though they undergo a certain destabilization under dilution. T1307 combines a relatively good efficiency for protecting the lactone form and a high stability against dilution, owing the stabilizing effect of its PEO shell. A similar phenomenon was observed with the methylated T1107.

Conclusions

The present study thoroughly investigated the aggregation phenomena under acid pH of four-arm PEO-PPO block copolymers displaying a wide spectrum of molecular weights

and hydrophilic-hydrophobic balances. The findings demonstrate that both parameters play an important role in the behavior pattern of poloxamine-based systems. The longer the PEO block, the greater the area occupied per molecule at the air-water interface at low pressures. In contrast, the longer PPO block, the larger the area occupied in the condensed state, and the more intense the surface activity. In addition, it was found that poloxamines with relatively high PO/EO ratios and molecular weights (T1301 and T150R1) also lead to the generation of micelles with larger and more hydrophobic cores. This feature has been shown to be critical for hosting hydrophobic molecules and stabilizing drugs displaying labile functional groups, such as the lactonic form of simvastatin. In contrast, the findings suggest that the hydroxy acid form of simvastatin interacts electrostatically with the central ethylenediamine group of T304 at the alkaline pH that this variety communicates to the medium. A similar phenomenon was apparent when a quaternary ammonium moiety was produced by methylation, although, in this specific case, the positive charge was permanent. Any of these factors also contribute to enhance the ability of the poloxamine systems to solubilize anionic drugs. Regarding demicellization upon dilution, the most stable micelles are those constituted by long poloxamine molecules containing large PPO blocks (with 23–29 units, i.e., T1301, T1307, and T150R1), particularly T1307, which also has long PEO blocks. Overall, the results stress the potential of poloxamines as nanocarriers in pharmaceutical formulations. Preliminary results with one methylated derivative have motivated us to further explore this strategy in order to enhance the drug/micelle interactions. These studies are underway and will be published separately.

Acknowledgment. This work was financed by the MEC (SAF2005-01930), FEDER, and Xunta de Galicia (PGIDT07-CSA002203PR), Spain. The authors express their gratitude to BASF Corporation for providing samples of Tetronic varieties and to F. J. Otero-Espinar for help with HPLC assays. MEC is also acknowledged for an Acci3n Complementaria Internacional (PCI2006-A7-0049).

Supporting Information Available: Dependence of CMC on the length of PO blocks of poloxamines (Figure S1) and Debye plots for aqueous solutions of poloxamines T1107, T1301, and T1307 at 37 °C (Figure S2). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

LA8016563

Supporting Information Available.

Running head Figure S1: Dependence of CMC on the length of PO blocks.

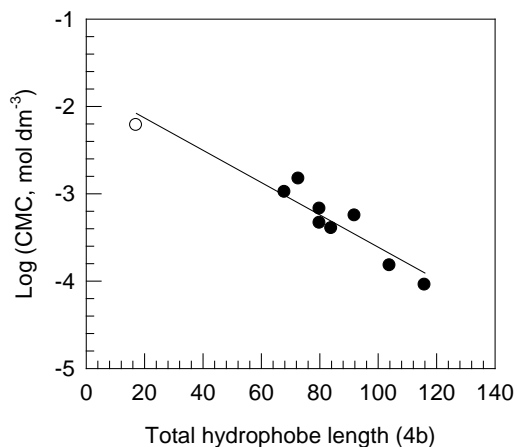


Figure S1: Semilog plot of the CMC obtained from pyrene fluorescence measurements versus the total hydrophobe length of the poloxamines (i.e. four times the length of the PPO block of an arm).

Running head Figure S2: SLS of Tetronic copolymers.

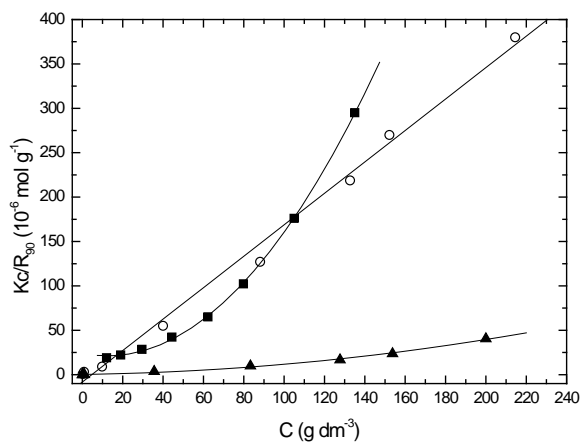
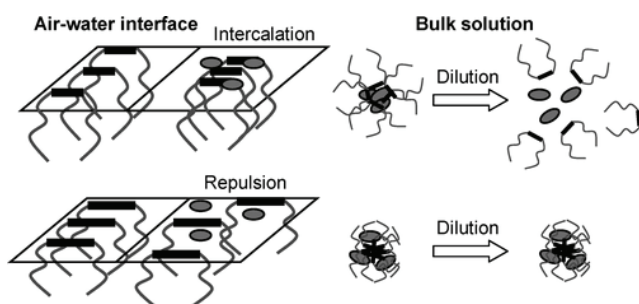


Figure S2: Debye plots for aqueous solutions of poloxamines (■) T1107, (▲) T1301 and (○) T1307 at 37 °C.

3.3 Poloxamines and Poloxamers as Polymeric Micellar Carriers for Simvastatin: Interactions at the Air-Water Interface and in Bulk Solution

Journal of Physical Chemistry C 114, 1181-1189 (2010)



Poloxamines and Poloxamers as Polymeric Micellar Carriers for Simvastatin: Interactions at the Air–Water Interface and in Bulk Solution

Jaime Gonzalez-Lopez,[†] Isabel Sandez-Macho,[‡] Angel Concheiro,[‡] and Carmen Alvarez-Lorenzo^{*,*‡}

Departamento de Química Física, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain

Received: October 1, 2009; Revised Manuscript Received: October 29, 2009

A comprehensive analysis of mixed monolayers of simvastatin and several varieties of Pluronic [poly(ethylene oxide) (PEO)–poly(propylene oxide) (PPO)–PEO] and Tetronic (X-shaped PEO–PPO) at the air–water interface was carried out with the aim of obtaining predictive information about the performance of the mixed systems at bulk, namely, the capability of the micelles to host the drug and the physical stability of the drug-loaded micelles under dilution. π -A isotherms recorded at the air/HCl interface evidenced negative deviations from ideal behavior for copolymers with short PPO blocks, that is, Pluronic F87 and Tetronic 904, and positive deviations for copolymers with long PPO blocks, that is, Pluronic F127 and P123 and Tetronic 1301, 1307, and 150R1. Simvastatin intercalation among the unimers of Pluronic F87 and Tetronic 904 significantly altered the hydrophobic interactions among PO units, which are involved in the micellization process, resulting in worse drug solubilization and poor stabilization of the lactone group and in less stable micelles against dilution. Pluronics F127 and P123 and Tetratics 1301, 1307, and 150R1 rendered micelles that preferentially host the drug in the core–shell interface and can stand up to sudden dilutions, retaining the drug hosted and protecting it from chemical degradation. Tests with copolymers covering a wide range of molecular weights and EO/PO ratios enabled to correlate structural properties with the behavior at the interface and in the bulk solution and with the localization of the drug inside the micelles.

1. Introduction

Drugs require lipophilic groups to have enough permeability to cross the biological membrane and to effectively interact with the target receptors. As a drawback, the bioavailability of most essential drugs and new drug candidates is limited by their poor solubility in water and physiological fluids.¹ Conventional ways of dealing with this problem involve the use of organic cosolvents, micronization, incorporation into solid dispersions, liposomes, or microemulsions, complexation with cyclodextrins or solubilization in micellar media.² The spontaneous formation of micelles in water makes this latter approach particularly attractive as a green and easily scaled-up method.³ Incorporation of the drug into surfactant micelles leads to an apparently greater solubility, creating a concentration gradient that facilitates the passage through cell membranes. Nevertheless, the relatively high critical micellar concentration (cmc) of low molecular weight surfactants⁴ entails the risk of toxicity if large amounts of surfactant are required. Furthermore, conventional micelles are prone to disassembly by dilution in the physiological fluids, leading to drug precipitation. Polymeric surfactants overcome these limitations by providing, at relatively low concentrations, core–shell micellar structures that possess greater thermodynamic and kinetic stability and hence can stand even extreme dilution.^{5,6} The hydrophobic cores serve as reservoirs for lipophilic drugs, being able to control the release, while the hydrophilic shell imparts steric stabilization and enables active

targeting. Comprehensive reviews about the potential of polymeric micelles as components of drug formulations with improved oral bioavailability have been recently published.^{7,8} Nevertheless, the information regarding where the drug is inside the micelle and how it interacts with the micellar components is still quite poor.⁹ A gain in knowledge of these aspects may help to explain the differences in solubilization capability observed for quite similar polymers regarding a chosen drug and for a given copolymer regarding different drugs and may enable rational design of micellar systems.

The aim of this work was to elucidate the potential of analysis of drug–amphiphilic copolymer mixed monolayers at the air–water interface as a predictive tool for the performance of mixed systems at bulk, namely, the capability of the micelles to host the drug and the physical stability of the drug-loaded micelles under dilution. Compared to other analytical tools, the record of π -A isotherms requires minimum amounts of both the drug and the copolymer and can be completed in a few minutes. To carry out the work, two families of poly(ethylene oxide) (PEO) and poly(propylene oxide) (PPO) block copolymers were chosen: (a) the linear PEO-*b*-PPO-*b*-PEO known as poloxamers or Pluronic, which are the most widely used in pharmaceuticals for multiple purposes,^{5,6,10} and (b) their X-shaped counterparts known as poloxamines or Tetronic, in which four arms of PPO–PEO are linked to a central ethylenediamine group. Poloxamines are gaining attention as micellar carriers because they are endowed with exceptional multiresponsive self-associative behavior^{6,11,12} and, thus, with even greater potential for biomedical applications. Simvastatin (SV) was chosen as a model of hydrophobic drug that is unstable in aqueous medium. Statins represent the first-choice drug group for the management

* Corresponding author: fax 34-981547148; e-mail carmen.alvarez.lorenzo@usc.es.

[†] Departamento de Química Física, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela.

[‡] Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela.

TABLE 1: Structural Characteristics of the Amphiphilic Copolymers Chosen for the Study^a

Copolymer	EO units	PO units	EO/PO ratio	MW (Da)	HLB	Chemical structure
F87	122	40	1.50	7700	24	
F127	200	65	1.43	12600	18-23	$\text{HOCH}_2\text{-CH}_2\text{-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_{b-1}\text{-}$ CH_3 $\text{(CH-CH}_2\text{-O)}_b\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{b-1}\text{-CH}_2\text{-CHOH}$
P123	39	69	0.28	5750	8	
T904	60	68	0.88	6700	12-18	$\text{HOCH}_2\text{-CH}_2\text{-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_{b-1}\text{-}$ CH_3 $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-}$ CH_3 $\text{(CH-CH}_2\text{-O)}_b\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{b-1}\text{-CH}_2\text{-CHOH}$
T1301	16	104	0.15	6800	1-7	$\text{HOCH}_2\text{-CH}_2\text{-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_{b-1}\text{-}$ CH_3 $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-}$ CH_3 $\text{(CH-CH}_2\text{-O)}_b\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{b-1}\text{-CH}_2\text{-CHOH}$
T1307	288	92	3.13	18000	> 24	
T150R1	20	116	0.17	7900	1-7	$\text{HOCH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_{b-1}\text{-}$ CH_3 $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-}$ CH_3 $\text{(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_b\text{-(CH-CH}_2\text{-O)}_{b-1}\text{-CH}_2\text{-CHOH}$ CH_3 $\text{HOCH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_{b-1}\text{-}$ CH_3 $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-}$ CH_3 $\text{(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_b\text{-(CH-CH}_2\text{-O)}_{b-1}\text{-CH}_2\text{-CHOH}$ CH_3

^a Pluronic (F87, F127, and P123) structure is formed by PEO–PPO–PEO; sequential Tetronics (T904, T1301, and T1307) consist of four arms of PPO–PEO chains linked to an ethylenediamine central group by the PPO block; and the reverse-sequential Tetronic (T150R1) consists of four arms of PPO–PEO chains linked to an ethylenediamine central group by the PEO block.

of hypercholesterolemia.¹³ Specifically, SV is a polycyclic compound with pH-dependent solubility, being insoluble at acidic pH.¹⁴ At intermediate pH values (pH ~ 5), SV predominantly exists in lactonic form; however it can be reversibly hydrolyzed to the hydroxy acid form at both very low and alkaline pHs.¹⁵ Thus, formulation of SV in micellar systems is an attractive approach to overcome its limited stability and oral bioavailability.^{12,16} We have previously observed that the capability of Tetronics to solubilize SV and to stabilize its lactone group is remarkably different among varieties.¹² In this context, the present work focuses on the interactions of SV with three varieties of Pluronic (F87, F127, and P123) and four varieties of Tetronic (T904, T1301, T1307, and T150R1), covering a wide range of molecular weights and PO/EO ratios (Table 1), and on their incidence on drug solubility. HCl (10 mM) was chosen as a poor solvent medium for SV that mimics gastric conditions. First, the π -A isotherms of SV and each copolymer separately and of the mixed monolayers were recorded for obtaining thermodynamic information about the miscibility of the components.^{17,18} Then, the ability of Pluronic to solubilize and stabilize the lactone form of SV was quantified and compared to that exhibited by Tetronics. The physical stability of the polymeric micelles was also evaluated. Finally, findings at the air–water interface and in bulk solution were related to obtain an overview of the drug–copolymer systems. To the best of our knowledge this is the first attempt to relate π -A isotherm analysis to micellar solubilization and stabilization of drugs by block copolymers.

2. Experimental Section

2.1. Materials. Simvastatin (SV, M_w 418.5 Da) was from Biocoon Ltd., India. Pluronic F127 was from Sigma–Aldrich (Spain); Pluronic F87 and P123 were from BASF. Conventional sequential poloxamines Tetronic 904, 1301, and 1307, and the reverse-sequential variety Tetronic 150R1 were from BASF (Table 1). Ultrapure water was obtained by reverse osmosis (Milli-Q, Millipore, Spain). All other chemicals were of analytical grade.

2.2. π -A Isotherms. The experiments were carried out with a single barrier (NIMA 611), with total area 550 cm², placed on an antivibration table. The surface pressure was measured with an accuracy of ± 0.1 mN m⁻¹, by use of a Wilhelmy plate made from chromatography paper (Whatman Chr1) as a pressure sensor. Prior to experiments, the trough was cleaned with chloroform and ethanol and rinsed with water. The monolayer stability was verified by monitoring the change in surface pressure while the area was held constant. The subphase was 10 mM HCl, and the temperature was kept constant at 25 °C. The monolayers were compressed at a speed of 15 cm² min⁻¹. To record the π -A isotherms of the single components, solutions of SV (0.1 mg mL⁻¹) and of copolymer (0.1 mg mL⁻¹) were prepared in chloroform, deposited by means of a syringe (Hamilton) at the air–water interface, and allowed to stand for at least 10 min in order to ensure complete evaporation of the solvent. Copolymer–SV solutions were prepared by mixing 200 μ L of 0.1 mg mL⁻¹ copolymer solution with adequate volumes of 0.1 mg mL⁻¹ SV solution in order to achieve SV molar fractions of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, and 0.9. For example, to prepare the P123–SV mixture with a SV molar fraction of 0.4 ($X_{SV} = 0.4$), 200 μ L of 0.1 mg mL⁻¹ P123 solution and 9.7 μ L of 0.1 mg mL⁻¹ SV solution were mixed. The resultant volume was deposited at the air–water interface as described for the pure components. The subphase was 10 mM HCl in all experiments. The structure of the monolayers was visualized on a BAM 2 Plus (NFT, Göttingen, Germany) equipped with a 30 mW laser emitting p-polarized light at 532 nm wavelength, which was reflected off the air–water interface at Brewster angle approximately 53.1°. The shutter speed was 1/50 s. The relative reflectivity of the film was measured with a calibrated charge-coupled device (CCD) camera. The lateral resolution of the microscope was 2 μ m. The images were digitalized (768 \times 572 pixels) and processed to optimize the quality (Iris v5.34 software, Christian Buil, France).

2.3. Characterization of Pluronic Solutions. Pluronic solutions in 10 mM HCl were prepared in a wide range of concentrations and their pH (Crison, model GLP22, Barcelona,

Polymeric Micellar Carriers for Simvastatin

Spain), conductivity (CDM2e, Radiometer Copenhagen, Denmark), and surface tension (Lauda Tensiometer TD1, Lauda-Königshofen, Germany) were evaluated at 25 °C. Pyrene (Py) emission spectra ($\lambda = 350\text{--}450$ nm) were recorded in a Fluoromax2 spectrofluorometer (Jobin Yvon, Spex) with the excitation wavelength set to 336 nm and slits set to 5 and 2.5 nm for excitation and emission, respectively. Pyrene (Py) was used as a probe at 10^{-6} M, concentration low enough to prevent excimer formation in water. The samples were prepared by addition of Py solution to copolymer solutions and stored at 25 °C for 48 h. The ratio of the first (I_1 at 373 nm) to the third (I_{III} at 384 nm) vibronic peak intensity was used as an index of the local hydrophobicity of the copolymer micelles. The midpoint of the step in the plot I_1/I_{III} versus Pluronic concentration was used to estimate the cmc.¹²

2.4. Solubility and Stability of SV in Micellar Solutions.

Solutions of Pluronic or Tetronic in 10 mM HCl were prepared in a wide range of concentrations and poured (5 mL) into ampules containing SV in large excess (10 mg). The ampules were flame-sealed and shaken at 25 °C and 50 rpm for 72 h. Then, the ampules were open and the solutions were filtered through 0.45 μm cellulose acetate membrane (Albet-AC-045-25-BL, Spain) to remove the nondissolved drug. The concentration of the dissolved drug was measured by UV spectrophotometry at 239 nm (Agilent 8453, Germany), against a blank of the copolymer solution without drug, by use of a thermostated quartz cell to maintain the samples below the lower critical solution temperature. The ability of the copolymers to solubilize SV was characterized by use of the following descriptors:⁴ (a) Molar solubilization capacity; that is, the number of moles of drug that can be solubilized by 1 mol of copolymer at micellar state:

$$\chi = \frac{S_{\text{tot}} - S_w}{C_{\text{copol}} - \text{cmc}} \quad (1)$$

(b) Micelle–water partition coefficient, which is the ratio of drug concentration in the micelle to the drug concentration in water, for a 4% (w/w) copolymer concentration:

$$P = \frac{S_{\text{tot}} - S_w}{S_w} \quad (2)$$

(c) Standard free energy of solubilization, estimated from the molar micelle–water partition coefficient, P_M (i.e., P for $C_{\text{copolymer}} = 1$ M):

$$\Delta G_s^0 = -RT \ln P_M = -RT \ln \frac{\chi(1 - \text{cmc})}{S_w} \quad (3)$$

(d) Solubilization capacity of the hydrophobic block (milligrams per gram), which was calculated as the amount of SV dissolved in the copolymer solution in excess of that dissolved in an equivalent volume of solvent medium (10 mM HCl), referred to the mass fraction of hydrophobic blocks in each poloxamine.

Since above cmc the concentration of the unimers remains constant and equals to cmc, the concentration of the copolymer in the micellar form was estimated as $C_{\text{copol}}/\text{cmc}$.

The lactone and carboxylate forms of SV in the polymeric micelles [drug-saturated 10% (w/w) Pluronic or Tetronic solutions] were analyzed by HPLC on a LiChroCART RP-18 (5 μm) column kept at 40 °C, an UV–vis diode array detector (240 nm, L-4500 Merck-Hitachi, Germany) and acetonitrile/28

J. Phys. Chem. C, Vol. 114, No. 2, 2010 1183

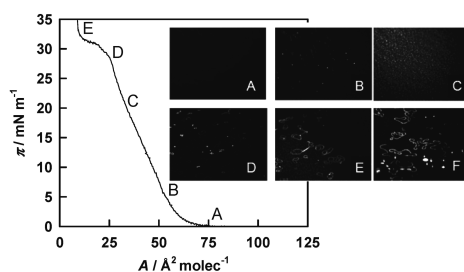


Figure 1. π - A isotherms of simvastatin obtained with 10 mM HCl as subphase and BAM micrographs recorded at different compression pressures.

mM phosphate buffer pH 4 (65:35, 1 mL/min flow) as isocratic mobile phase.¹⁵ Retention times of the carboxylate and lactone forms were 4 and 6 min, respectively. This HPLC method has been shown to discriminate SV lactone form from the hydrolysis product and has been successfully applied to evaluate the stability of SV at different pH and temperature conditions.¹⁵ The stability was evaluated after 15 and 60 days of adding the drug to the copolymer solutions in 10 mM HCl (pH 2.5). A solution of drug in acetonitrile was used to estimate the lactone/carboxylate ratio in the drug as supplied.

2.5. Stability of the Micelles against Dilution. One milliliter of 10 mM HCl was placed in a thermostated quartz cell to make the blank of absorbance at 239 nm, with the spectrophotometer working under the kinetics mode (Biochemical Analysis Software, Agilent Technologies, Germany). Then 40 μL of a filtered 10% (w/w) micellar solution saturated with SV (coming from the SV solubility studies) was added to the cell. The program was set up in order to record absorbance values (at 239 nm) immediately after the dilution and every 30 s over 2 h.

3. Results and Discussion

3.1. π - A Isotherm of SV. SV behavior at the interface had not been previously described and we observed that it forms monolayers at the air–10 mM HCl interface. When SV monolayers were compressed, a π - A isotherm with well-differentiated regions was recorded (Figure 1). The lift-off area was reached at $75 \text{ \AA}^2 \text{ molecule}^{-1}$. Further compression caused a progressive increase of the pressure up to 30 mN m^{-1} , when the monolayer collapsed. Extrapolated area in the condensed phase was $52.3 \text{ \AA}^2 \text{ molecule}^{-1}$, which indicates that the hydrophobic groups of SV molecules are oriented parallel to the interface. The compressibility modulus (C_s^{-1}) at pressures greater than 5 mN m^{-1} was near 50 mN m^{-1} . This value is characteristic of an intermediate liquid and corresponds to the transition from expanded liquid to condensed liquid.²⁰ BAM (Brewster angle microscopy) revealed an increase in the number of brilliant nuclei and in the reflectivity as the monolayer was compressed (Figure 1). The characteristic strides of collapse were observed at around 30 mN m^{-1} .

Ab initio semiempirical studies [B3LYP/3-21G* by the density functional theory (DFT) method] of conformation of SV in vacuo were carried out to gain insight into the conformation of the drug in the air–water interface, with the help of Gaussian 03 software (Gaussian Inc., Pittsburgh, PA). The dihedral angles of the two chains bound to the double ring were optimized via AM1 semiempirical calculations. Two main kinds of conformation differing in the ϕ (OCOC) dihedral angle of the ester group of α dimethylpropionate were obtained: (i) the most stable one

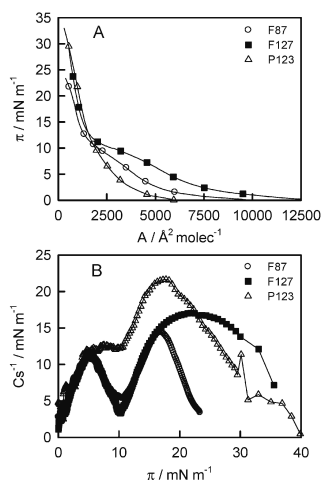


Figure 2. (A) π - A isotherms of Pluronic F87, F127, and P123 at the air-HCl(aq) interface. (B) Compressibility modulus recorded at 25 °C.

with ϕ values ca. -5° (see Figure S1 in Supporting Information) and (ii) the less stable one with ϕ values ca. 135° , which possesses the aliphatic part of the chain toward the aliphatic rings of the molecule. Inside each group the conformational differences were small and the energetic differences were negligible. The area occupied by the molecule at the interface (for any conformation adopted) was estimated to be ca. 60 \AA^2 , which is in agreement with the value experimentally found in the monolayer analysis.

3.2. π - A Isotherms of the Copolymers. The π - A isotherms of poloxamines on HCl(aq) have been previously described¹² as well as those of poloxamers on water,²¹ but no information on poloxamer behavior with HCl(aq) as subphase was available. The π - A isotherms of Pluronic F87, F127, and P123 significantly differ from each other at relatively low pressures (Figure 2A). In general, the evolution of behavior of the PEO-PPO block copolymers at the monolayer as the pressure increases can be seen as a succession of conformational changes. (a) Flat (pancake) conformation, with all PO and EO groups at the air-water interface; this conformation covers an area which is the sum of the area occupied by all EO ($13\text{--}16.5 \text{ \AA}^2$) and PO (17.5 \AA^2) groups, plus the area occupied by the water molecules (8.5 \AA^2) that are interacting with these groups. Roughly, the interface is completely covered with F127, F87, or P123 when a surface of 6390 , 3907 , or $2710 \text{ \AA}^2 \text{ molec}^{-1}$, respectively, is attained.

(b) The pressure progressively increases up to a change when a mushroom conformation occurs. In this region, there is a slight increase in the surface pressure while the surface area decreases. This pseudoplateau is interpreted as a rearrangement of the PPO coils into loops, within the monolayer regime, and an immersion of EO units in the aqueous subphase. The end of the pseudoplateau corresponded to the situation in which all EO units are immersed in the subphase, while the surface is exclusively occupied by the PPO blocks. This pseudoplateau has been shown to be characteristic of monomers attracted by the interface, such as EO monomers in the dilute regime.²² The pseudoplateau was particularly evident in the case of F127, which has the highest number of EO units. Thus, F127 monolayer can be significantly

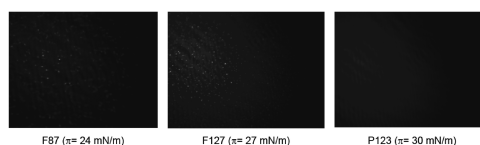


Figure 3. BAM images of poloxamer monolayers obtained at relatively high pressures.

compressed without a relevant increase in pressure (i.e., the EO groups become progressively immersed in the subphase). Isotherms of polystyrene-PEO showed a plateau that is horizontal only for the copolymer with longest PEO, indicating that the transition is probably more and more of a first-order type as the PEO chain length increases.²² This may be also the case of PEO-PPO-PEO copolymers, as was also previously observed for Tetronic varieties.¹² The pseudoplateau is almost imperceptible in the case of P123, which has just a few EO units. P123 monolayers can be considered as condensed-like films, while F87 and F127 behave as expanded-like films.²³

(c) Further compression caused a rapid increase in π . The surface is covered by the PPO blocks and is no longer attractive to the EO units. The copolymer adopts a brush conformation, characterized by the stretching of the PPO blocks due to space limitations and to increased lateral interactions. At relatively high pressure ($\sim 14\text{--}15 \text{ mN m}^{-1}$), the contribution of PPO blocks becomes predominant and the isotherms of F127 and P123 superimpose. In this pressure range, the side-chain methyl groups are normally oriented throughout the interface, although the orientation may be somehow perturbed in the case of copolymers with long PEO blocks (F87 and F127) that can force partial immersion of the PPO block in the aqueous subphase.²⁴ Finally, the monolayer reaches the condensed state and collapses ($25\text{--}35 \text{ mN m}^{-1}$). In general terms, the π - A isotherm pattern of Pluronic on 10 mM HCl subphase resembles that previously described when water was the subphase.²³⁻²⁵

The compressibility modulus of F127, F87, and P123 was below 30 mN m^{-1} (Figure 2B), which indicates a low resistance to the compression due to the flexibility of the bonds between EO units. A change in the compressibility modulus was observed at 10 mN m^{-1} , owing to the arrangement of the relatively rigid PPO blocks as loops. The lower number of EO units in P123 explains the progressive increase in the compressibility modulus from 4.9 mN m^{-1} at $\pi = 5 \text{ mN m}^{-1}$ to 22.3 mN m^{-1} at $\pi = 18 \text{ mN m}^{-1}$. Compared to the other two Pluronic varieties, P123 offers greater resistance against the reduction in the area. F127 and F87 showed a similar dependence of the compressibility modulus up to $\pi = 16 \text{ mN m}^{-1}$. Beyond that pressure, F127 exerts a greater resistance to the compression, owing to its high content in PO units, which also explains its greater collapse pressure (32 mN m^{-1} for F127 vs 22 mN m^{-1} for F87).

Pluronic monolayers did not show changes in the BAM images up to 17 mN m^{-1} . Above this pressure, isolated structures become perceptible in the F87 and F127 systems (Figure 3). As the pressure increased, the number of brilliant domains surrounded by the dark fluid phase also increased and they become uniformly condensed just before the collapse pressure. The distance among the brilliant points decreased as the pressure increased, but the size remained practically constant. P123 did not show brilliant domains; however, the field of the view of the microscope became uniformly lighter as the compression progressed. The BAM images of F87 and F127 resembled those reported for polystyrene-PEO copolymers with long PEO blocks, while the images of P123 are in agreement with those obtained for copolymers with relatively short PEO chains.²²

Polymeric Micellar Carriers for Simvastatin

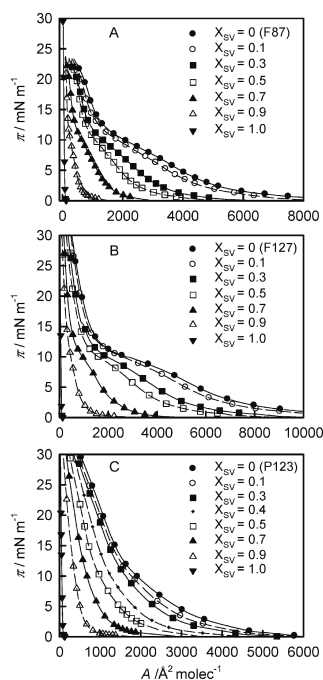


Figure 4. π - A isotherms of SV-poloxamer mixed monolayers at the air-HCl(aq) interface, recorded at 25 °C (X_{SV} indicates the mole fraction of SV in each mixture with the copolymer).

These differences can be attributed to the conformational transitions of the PEO block as it moved from the interface to the subphase.

3.3. π - A Isotherms of Copolymer-SV Mixed Monolayers. The π - A isotherms of Pluronic-SV mixed monolayers are shown in Figure 4. In general, as SV proportion increased, lower pressures were recorded for the same area. The shape of the F87-SV and F127-SV isotherms differed from that of F87 and F127 alone, with the pseudoplateau being less evident. In the P123-SV mixtures, the shape of the isotherms did not significantly change as a function of the proportion of SV. Miscibility of the components was evaluated through the excess areas of mixing, that is, the mean area per molecule in the mixed monolayer less the sum of the contributions of each component, at various surface pressures, estimated as follows:^{18,26}

$$A_{\text{exc}} = A_{1,2} - (A_1X_1 + A_2X_2) \quad (4)$$

where X_1 and X_2 are mole fractions of the components and A_1 and A_2 are molecular areas of the pure components. Positive deviations from ideal behavior point out an area expansion effect, which indicates a net expelling interaction. Negative deviations correspond to an area condensing effect under a given surface pressure, which means an attractive interaction between both components.²⁶

F127-SV and P123-SV clearly showed positive excess areas of mixing while the opposite effect was recorded for F87-SV (see Figure S2 of the Supporting Information). The excess area of mixing of F87-SV evidenced a minimum for the mixed monolayers of X_{SV} ranging from 0.3 to 0.5, particularly evident at low pressures (i.e., large molecular areas). By contrast, the plots of

J. Phys. Chem. C, Vol. 114, No. 2, 2010 1185

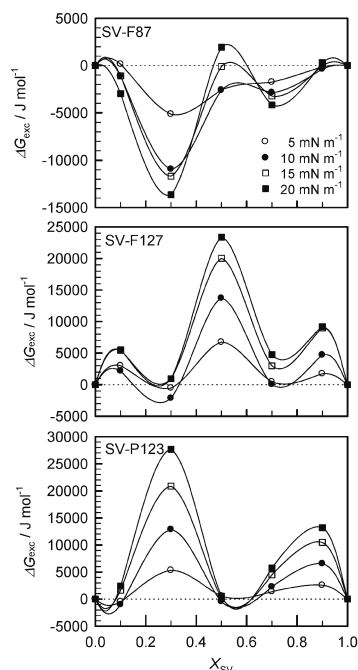


Figure 5. Excess free energy change of mixing SV and poloxamer at the air-water interface, plotted as a function of the mole fraction of SV at constant pressure. Data were registered at four typical pressures.

excess area of mixing obtained for F127-SV revealed positive deviations at $X_{SV} = 0.5$ and less intense ones at $X_{SV} = 0.9$, while those of P123-SV deviated from linearity at $X_{SV} = 0.3$ and $X_{SV} = 0.9$. These findings reveal that the copolymers interact quite differently with the drug molecules at the interface, which could be related to their different EO/PO ratio and conformational transitions at the interface. In order to characterize the interactions between the copolymers and SV from a thermodynamic point of view, the excess free energy of the mixed monolayers was estimated as the difference between experimental data and those values that would be obtained if the behavior of the mixture were ideal, by application of the following equation:^{18,26}

$$\Delta G_{\text{exc}} = N_A \int_{\pi_0}^{\pi} A_{1,2} d\pi - X_1 \int_{\pi_0}^{\pi} A_1 d\pi - X_2 \int_{\pi_0}^{\pi} A_2 d\pi \quad (5)$$

where N_A is Avogadro's number and A_1 , A_2 , and $A_{1,2}$ are the molecular areas of the pure components and of the mixture, respectively, at a given surface pressure π . Upper limits of the integral were 3.8, 5, 15, and 25. At $\pi = 0$ the monolayer components are assumed to mix in the ideal manner. This value corresponds to a point in the compression curve where the vapor phase coexists with the expanded liquid phase (or condensed liquid phase), that is, the point where the pressure begins to rise significantly during compression of the monolayer. With the experimental equipment used, this value can be assumed to be zero.²⁷

Positive ΔG_{exc} recorded for F127 and P123 systems (Figure 5) reveals that SV-copolymer interactions are less favorable

than SV–SV and copolymer–copolymer interactions. The ΔG_{exc} values obtained for F127 and P123 are also of similar magnitude, which indicates that the drug interacts with these copolymers in a similar way. Since F127 and P123 differ in the number of EO units but have the same number of PO units, this latter feature seems to be responsible of the interaction with the drug. On the other hand, ΔG_{exc} recorded for SV–F87 mixed monolayers was negative, indicating that SV–F87 interaction is more favorable than between the pure components themselves. F87 has shorter PO block and is more hydrophilic than F127 and P123. Presumably, the preponderant factor in determining two-dimensional compatibility in these compounds is the favorable mutual orientation of the hydrophobic regions, as observed in the case of mixtures between other macromolecular substances and low-molecular-weight molecules.²⁸ Nevertheless in the particular case of Pluronics, an adequate hydrophilic/lipophilic balance (HLB) seems to be required for SV to intercalate between the copolymer unimers. The interaction of SV with F87 resulted in less area occupied per molecule (attractive forces), which is accompanied by a negative excess free energy change (ΔG_{exc}). This means that the mixed monolayer is more stable than that formed by the components separately. By contrast, mixed SV–F127 and SV–P123 monolayers evidenced repulsion among the components, with an increase in the area and positive values of ΔG_{exc} . To summarize, these results suggest that SV is more prone to intercalate among the F87 unimers than among the F127 and P123 unimers. In fact, an increase in brilliant points was observed in the BAM images of F87–SV monolayers.

The pattern of π – A isotherms of Tetricon–SV mixed monolayers (Figure 6) resembled to a great extent those containing Pluronic. The behavior of Tetricon-only isotherms has been described previously.¹² T1307, which possesses the longest EO blocks, was the only variety that showed a pseudoplateau when the pressure increased. As observed for F87 and F127, the pseudoplateau progressively vanished as the content in SV increased.

A_{exc} were positive for the four Tetricon varieties analyzed (see Figure S3 of the Supporting Information), but notable differences were observed regarding ΔG_{exc} (Figure 7). Mixed monolayers containing T1307 or T150R1 evidenced positive ΔG_{exc} for any SV ratio. By contrast, T904–SV mixed monolayers showed a minimum in ΔG_{exc} at $X_{\text{SV}} = 0.1$ for any pressure and BAM images with the highest number of brilliant points (see Figure S4 of the Supporting Information). T1301–SV systems only evidenced negative ΔG_{exc} at $X_{\text{SV}} = 0.6$ at high pressures. The differences among the Tetricon varieties follow the same tendency as in the case of Pluronics, that is, when the copolymer has a relatively high number of PO units, the copolymer–copolymer interactions are more thermodynamically favorable than the copolymer–SV interactions.

As a whole, the analysis of the behavior at the interface indicates that drug intercalation within the unimers is more likely to occur in the case of Pluronic F87 and Tetricon 904 than for the other varieties. Such intercalation may significantly alter the hydrophobic interactions among PO units, which are involved in the self-assembly process of the unimers to form the micelles. If so, remarkable differences in micelle performance, such as drug solubilization, should be observed. Furthermore, the physical stability of the micelles may also be compromised to a different extent depending on the SV–PO interaction. When it is taken into account that the PPO blocks are responsible for forming the micellar cores, the tendency of the drug to interact with the PO units can induce destabilization

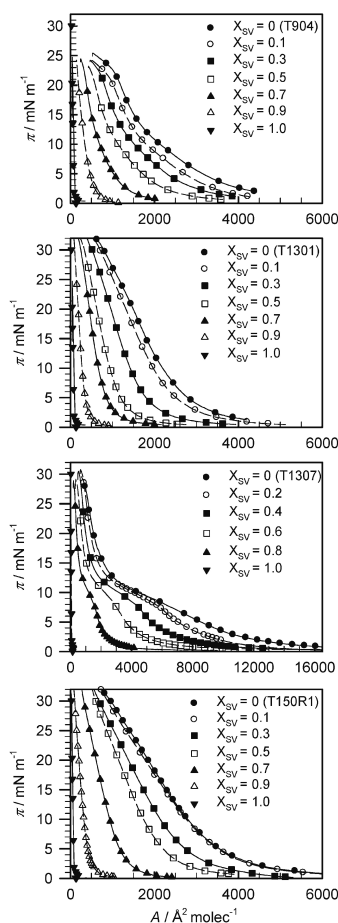


Figure 6. π – A isotherms of SV–poloxamine mixed monolayers at the air–HCl(aq) interface, recorded at 25 °C (X_{SV} indicates the molar fraction of SV in each mixture with the copolymer).

of the cores and, consequently, the micelle. Paradoxically, these phenomena can negatively affect the capability of the micelles to solubilize the drug. To test this hypothesis, the capability of Pluronic and Tetricon micelles to solubilize the drug and to protect its lactone group and the physical stability of the drug-loaded micelles against dilution were analyzed.

3.4. Micellization and Micellar Properties. Since the cmc of Pluronics depends on the ionic strength and the pH of the medium,²⁹ the self-aggregation properties of F127, F87, and P123 were studied in 10 mM HCl. The surface tension plots showed two linear regions before a plateau was reached (Figure 8).

For copolymer concentrations below 5×10^{-2} % (w/w), the surface tension sharply decreased due to the formation of a monolayer of copolymer at the air–water interface. As the concentration rose, a second linear region with a lower slope was observed, which is attributed to conformational changes of the copolymer to enable more copolymer molecules to reach the interface.^{30,31} In order to achieve this, water is expelled and

Polymeric Micellar Carriers for Simvastatin

J. Phys. Chem. C, Vol. 114, No. 2, 2010 1187

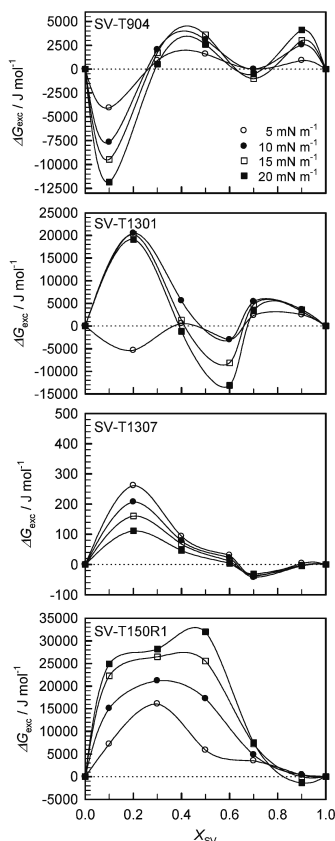


Figure 7. Excess free energy change of mixing SV and poloxamers at the air–water interface, plotted as a function of the mole fraction of SV at constant pressure. Data were registered at four typical pressures.

the PEO blocks protrude into water or wrap around the PPO blocks. The last inflection point corresponds to the critical micellar concentration (cmc). The intense hydrophobic interactions among the PPO groups cause the self-association of the unimers as core–shell micellar structures.³² The cmc values of F87, F127, and P123 were 2%, 0.5%, and 0.1% (w/w), respectively. Similar cmc values were also obtained by measurement of the conductivity and the I_f/I_{III} ratio of pyrene fluorescence, which are in agreement with those previously recorded in water and saline media.²⁹ The I_f/I_{III} values indicated that the polarity sensed by pyrene differs significantly whether it is solubilized in F87, F127, or P123 micelles. The hydrophobic character of an amphiphilic copolymer containing PEO and PPO blocks can be quantified through the hydrophilic–lipophilic balance (HLB) and by the β parameter. This latter parameter is estimated as the ratio between the Flory radius R_F of the PPO blocks and the PEO blocks as follows:³³

$$\beta = \frac{I_{PO}(N_{PO})^{3/5}}{I_{EO}(N_{EO})^{3/5}} \quad (6)$$

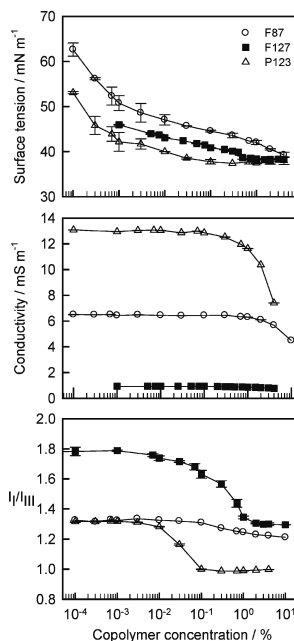


Figure 8. Dependence of surface tension, conductivity, and pyrene fluorescence on concentration of poloxamers in 10 mM HCl aqueous medium.

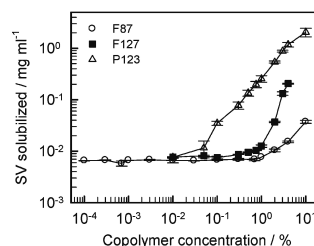


Figure 9. Solubilization of SV in 10 mM HCl aqueous medium as a function of the concentration of poloxamers.

I_{PO} and I_{EO} are the lengths of the PO (5.1 Å) and EO (2.4 Å) units, respectively. F87 and F127 have greater HLB (Table 1) and lower β value (1.09 and 1.08, respectively) than P123 ($\beta = 2.99$), which means that P123 unimers are much more hydrophobic than their counterparts and, consequently, the micellar cores too. This explains the remarkably lower I_f/I_{III} ratio observed for P123 systems above the cmc.

The micellization behavior of Tetronic varieties in HCl (10 mM) has been recently described in detail.¹² The varieties T1301 and T150R1 are significantly more hydrophobic (β values 6.53 and 6.10) than T904 and T1307 (2.29 and 1.07, respectively). The cmc values of T904, T1301, T1307, and T150R1 have been reported to be 0.7%, 1%, 1%, and 0.7% (w/w), respectively. The differences in cmc and in micellar hydrophobicity were reflected in the capability of the copolymers to host SV molecules in the micellar cores. Figure 9 shows the dependence of SV solubility on the concentration of Pluronic in 10 mM HCl (pH 2.5). The solubility of this polycyclic drug is minimal

TABLE 2: Simvastatin Solubilization Parameters^a and Ratio of Lactone to Hydroxy Acid (L/H) Forms of Simvastatin^b

copolymer	χ	P	ΔG_s^0 , cal mol ⁻¹	f_{micelle}^c	SV/PO, mg/g ⁻¹	L/H ratio
F87	4×10^{-3}	1.5	-3245.3	0.59	0.8	0.8:1
F127	130×10^{-3}	32	-5306.6	0.96	15	1.2:1
P123	23×10^{-3}	210	-5644.5	0.99	42	1.2:1
T904	2.1×10^{-3}	0.7	-2871.5	0.41	0.2	0:1
T1301	379×10^{-3}	100	-5940.0	0.99	20	20:1
T1307	22×10^{-3}	2.2	-4255.1	0.69	1.3	8:1
T150R1	171×10^{-3}	47.5	-5469.8	0.98	9.9	7.5:1

^a In 4% (w/w) copolymer solutions in (pH 2.5). ^b In drug-saturated 10% (w/w) copolymer solutions in 10 mM HCl (pH 2.5). ^c Fraction of drug solubilized by incorporation into the micelle. A solution of simvastatin in the mobile phase resulted in an L/H ratio of 1:0.

at acid pH. Incorporation of Pluronics at concentrations below cmc did not modify SV solubility. In contrast, beyond cmc any copolymer evaluated significantly raised the apparent solubility of the drug. The solubilization parameters found for SV in Pluronic and Tetronic micellar solutions are summarized in Table 2. Enhancement of the solubility was particularly relevant in the cases of P123, T1301, and T150R1, which showed partition coefficients of up to 210, 100 and 47.5, respectively. This finding is in agreement with the greater hydrophobicity of P123, T1301, and T150R1 compared to the other Pluronic and Tetronic varieties and suggests that intense PO–PO hydrophobic interactions are required to form micelles capable of hosting the drug.

It should be noted that the number of SV molecules that interact with each PO unit in the micelles is quite low (compared to the values achieved in the air–water monolayers), which indicates that the number of interaction sites in the micelles is notably lower because of the participation of most PO units in the self-assembling process. Thus, to compare the behavior at the air–water interface with that in the micellar bulk solution, one should focus on the mixed monolayer events that take place at low X_{sv} . In this regard, those copolymers that showed favorable interaction with SV at the air–water interface (namely Pluronic F87 and Tetronic 904) are the ones with the lowest capability to solubilize SV. This means that the higher the SV–copolymer attractive forces, the greater the disorders caused in the arrangement of the unimers to form the micelles. Consequently, the perturbed micelles cannot solubilize the drug as well as the less perturbed ones. The “negative” effect of the intercalation of the drug among the PPO blocks of the unimers resembles the perturbing effect caused by copolymers with high affinity for cell membrane components on the own membrane.³⁴

An aspect of practical relevance is to determine whether the hosted SV remains as lactone (hydrophobic) form in the micellar medium or undergoes hydrolysis to the hydroxyl acid (hydrophilic) form.¹⁵ HPLC analysis of the micellar solutions after 15 and 60 days of being prepared (the pH remained constant at 2.5) indicated that the lactone form predominates in the micellar systems of copolymers that possess the longest PPO blocks (Table 2). No influence of time on the lactone:hydroxyl acid form ratio was observed in the period evaluated. Compared to poloxamines, F87, F127, and P123 showed greater protection capability than T304, T901, T904, T908, and T1107, but less than T1301, T1307 and T150R1.¹² This suggests that the stabilization of the lactone form is positively correlated to the number of the PO units, while no correlation could be found with the number of EO units. Once again this finding suggests that strong hydrophobic cores are more adequate to form micelles that host SV lactone form and protect it from adverse environmental conditions. The results also suggest that SV molecules are preferably located in the core–shell interface, close to the PPO core but not interfering in its arrangement.

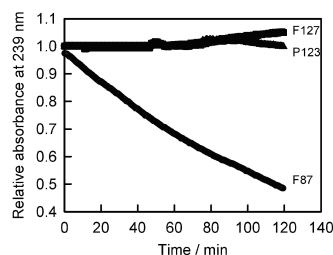


Figure 10. Evolution of SV concentration when drug-saturated 10% (w/w) poloxamer solutions were suddenly diluted 26 times with 10 mM HCl at 37 °C.

Finally, the stability of drug-loaded micelles against dilution was evaluated by adding a small volume (40 μ L) of drug-saturated 10% (w/w) copolymer solution to a spectrophotometer cell containing 1 mL of 10 mM HCl at 37 °C. As can be seen in Figure 10, F127 and P123 stood up quite well to such a sudden dilution and no changes in SV solubility were recorded for 120 min. By contrast, the dilution led to a progressive insolubilization of SV owing to disassembly of F87 micelles. In the case of Tetratics, T1307 micelles were the most stable and T904 micelles were the most unstable. Therefore, from a kinetic point of view, copolymers with long PPO and PEO blocks are the most suitable carriers for preventing premature drug leakage once diluted in the body fluids. This finding is in agreement with a preferential localization of the drug in the core–shell interface of the micelle, as explained below. PO–PO hydrophobic interactions make the micelle endure the dilution. On the other hand, an adequate balance between the PPO–SV interactions and the length of PEO blocks is required to load the drug into the micelles and to regulate its delivery. PPO–SV interactions should drive the hosting of the drug without significant detriment of copolymer self-assembly. PEO segments flanking the core and extending away from the interface into solution usually arrange themselves as double-stranded helices, extending normally from the center of their core of PPO and folding back across their parent cores.³⁵ The segment of PEO proximal to its corresponding PPO core has a restricted mobility, and thus, drug molecules trapped in between the core and the shell are also expected to find diffusion out difficult.

4. Conclusions

The overall analysis of π -A isotherms of mixed monolayers and the micellar solubilization and stabilization of SV revealed that this drug favorably interacts at the air–water interface with Pluronic or Tetronic unimers that bear short PPO blocks. Such an interaction leads to micelles that show a lower capability to solubilize SV, to protect it from chemical degradation, and to withstand extreme dilutions. A high affinity of the drug for the

Polymeric Micellar Carriers for Simvastatin

unimers is assumed to result in intercalation of the drug in the PPO blocks of the core, negatively affecting the conformation of the micelles and resulting in worse performance. On the other hand, exclusion of the drug from the PPO core (as observed in π -A isotherms for copolymers with long PPO blocks) renders more stable micelles that can host the drug mainly in the core-shell interface. Therefore, PPO-drug interactions seem to be a critical aspect for the development of efficient micellar drug carriers. The analysis of π -A isotherms of mixed monolayers can be used as a predictive tool of the behavior of drug-copolymer systems at bulk, by way of the capability of the micelles to host the drug and the physical stability of the drug-loaded micelles under dilution.

Acknowledgment. This work was financed by the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-01679), FEDER, and Xunta de Galicia (PGIDIT07CSA002203PR), Spain. We thank M. A. Rios for guidance in the ab initio studies, F. J. Otero-Espinar for help with HPLC assays, and BASF Corp. (Verena Geiselsart) for providing samples of Pluronic and Tetronic.

Supporting Information Available: Four figures showing conformation of SV at the air-water interface, excess areas of mixing of SV and poloxamers, excess areas of mixing of SV and poloxamines, and BAM images of poloxamine and poloxamine-SV mixtures. This information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- (1) Lindenberg, M.; Kopp, S.; Dressman, J. B. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 265.
- (2) Liu, R. *Water-insoluble drug formulation*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2008.
- (3) Mallick, S.; Pattnaik, S.; Swain, K. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2007**, *33*, 865.
- (4) Rangel-Yagui, C. O.; Pessoa, A., Jr.; Costa-Tavares, L. C. T. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2005**, *8*, 147.
- (5) Kabanov, A. V.; Alakhov, V. Y. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2002**, *19*, 1.
- (6) Chiappetta, D. A.; Sosnik, A. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66*, 303.
- (7) Mondon, K.; Gurny, R.; Moller, M. *Chimia* **2008**, *62*, 832.
- (8) Aliabadi, H. M.; Shahin, M.; Brocks, D. R.; Lavasanifard, A. *Clin. Pharmacokinet.* **2008**, *47*, 619.
- (9) Borisovitch, I. E.; Borges, C. P. F.; Yushmanov, V. E.; Tabak, M. *BBA-Biomembranes* **1995**, *1238*, 57.
- (10) Dumortier, G.; Grossiord, J. L.; Agnely, F.; Chaumeil, J. C. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 2709.
- (11) Alvarez-Lorenzo, C.; Gonzalez-Lopez, J.; Fernández-Tarrio, M.; Sánchez-Macho, M. I.; Concheiro, A. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66*, 244.
- (12) Gonzalez-Lopez, J.; Alvarez-Lorenzo, C.; Taboada, P.; Sosnik, A.; Sanchez-Macho, I.; Concheiro, A. *Langmuir* **2008**, *24*, 10688.
- (13) Dembowski, E.; Davidson, M. H. *J. Cardiopulm. Rehabil.* **2009**, *29*, 2.
- (14) Schachter, M. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2005**, *19*, 117.
- (15) Alvarez-Lueje, A.; Valenzuela, C.; Squella, J. A.; Nuñez-Vergara, L. J. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 1631.
- (16) Ding, Z.; Hao, A.; Zhang, P.; Wang, Z. *J. Dispersion Sci. Technol.* **2007**, *28*, 495.
- (17) Gomez-Serranillos, I. R.; Minones, J.; Dynarowicz-Latka, P.; Iribarnegaray, E.; Casas, M. *Colloids Surf., B* **2005**, *41*, 63.
- (18) Wang, Z.; Yang, S. *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 2284.
- (19) Yang, R.; Yang, X. R.; Evans, D. F.; Hendrickson, W. A.; Baker, J. J. *Phys. Chem.* **1990**, *94*, 6123.
- (20) Davies, J. T.; Rideal, E. K. *Interfacial Phenomena*; Academic Press: New York, 1963; p 25.
- (21) O'Connor, S. M.; Gehrke, S. H.; Retzinger, G. S. *Langmuir* **1999**, *15*, 2580.
- (22) Fauré, M. C.; Bassereau, P.; Lee, L. T.; Menelle, A.; Lheveder, C. *Macromolecules* **1999**, *32*, 8538.
- (23) Chang, L. C.; Chang, Y. Y.; Gau, C. S. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *322*, 263.
- (24) Kiss, E.; Keszhelyi, T.; Kormany, G.; Hakkell, O. *Macromolecules* **2006**, *39*, 9375.
- (25) Muñoz, M. G.; Monroy, F.; Ortega, F.; Rubio, R. G.; Langevin, D. *Langmuir* **2000**, *16*, 1083.
- (26) Zhao, L.; Feng, S.-S.; Go, M. L. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 86.
- (27) Grainger, D. W.; Sunamoto, J.; Akiyoshi, K.; Goto, M.; Knutson, K. *Langmuir* **1992**, *8*, 2479.
- (28) Gabrielli, G.; Baglioni, P. *J. Colloid Interface Sci.* **1980**, *73*, 582.
- (29) Barreiro-Iglesias, R.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A. *Prog. Colloid Polym. Sci.* **2003**, *122*, 95.
- (30) Alexandridis, P.; Athanassiou, V.; Fukuda, S.; Hatton, T. *Langmuir* **1994**, *10*, 2604.
- (31) Dong, J.; Chowdhry, B. Z.; Leharne, S. A. *Colloids Surf., A* **2004**, *246*, 91.
- (32) Nivaggioli, T.; Tsao, B.; Alexandridis, P.; Hatton, T. A. *Langmuir* **1995**, *11*, 119.
- (33) Munch, M. R.; Gast, A. P. *Polym. Commun.* **1989**, *30*, 324.
- (34) Amado, E.; Kerth, A.; Blume, A.; Kressler, J. *Langmuir* **2008**, *24*, 10041.
- (35) Rodriguez-Patino, J. M.; Sanchez, C. C. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 2065.

JP9094358

Poloxamines and poloxamers as polymeric micellar carriers for simvastatin: interactions at the air-water interface and in bulk solution

Jaime Gonzalez-Lopez, Isabel Sandez-Macho, Angel Concheiro, Carmen Alvarez-Lorenzo

Supporting Information

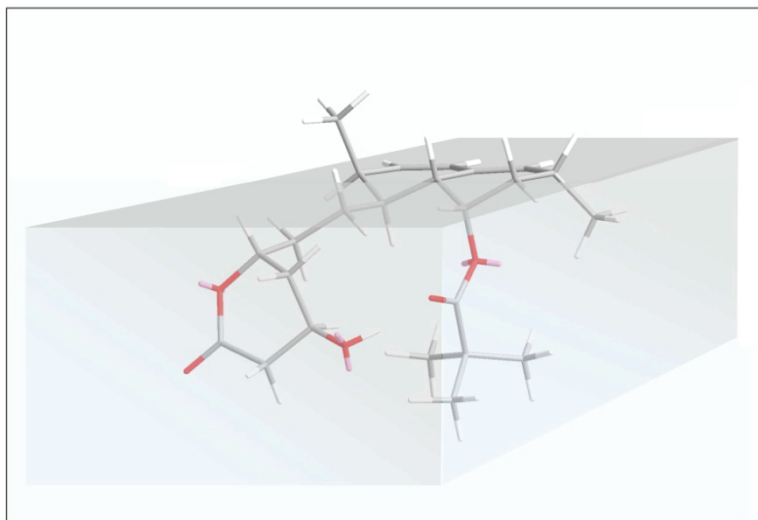


Figure S1. Most stable conformation of SV predicted by *ab initio* semiempiric studies in vacuo, which was used for discussion of the molecular shape in the air-water interface.

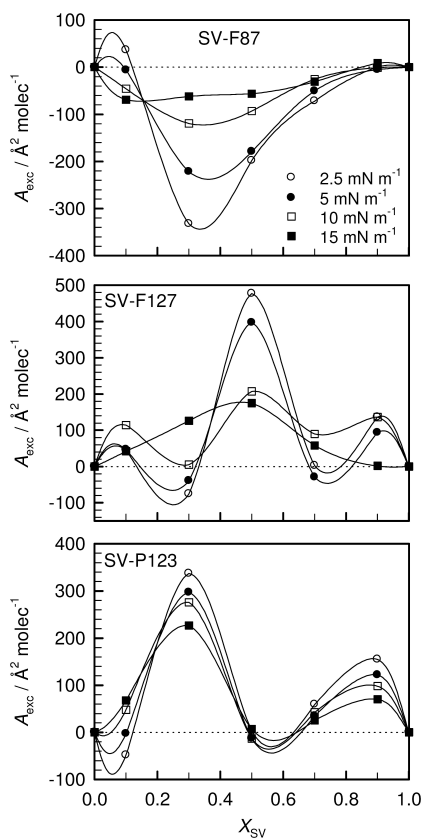


Figure S2. Excess areas of mixing of SV and poloxamers at the air-water interface plotted as a function of the mole fraction of SV at constant pressure. Data registered at four typical pressures.

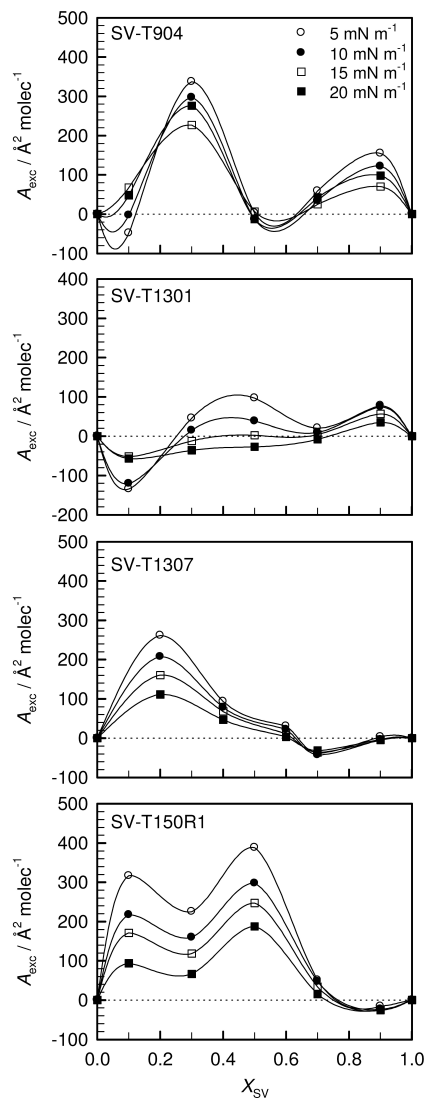


Figure S3. Excess areas of mixing of SV and poloxamines at the air-water interface plotted as a function of the mole fraction of SV at constant pressure. Data registered at four typical pressures.

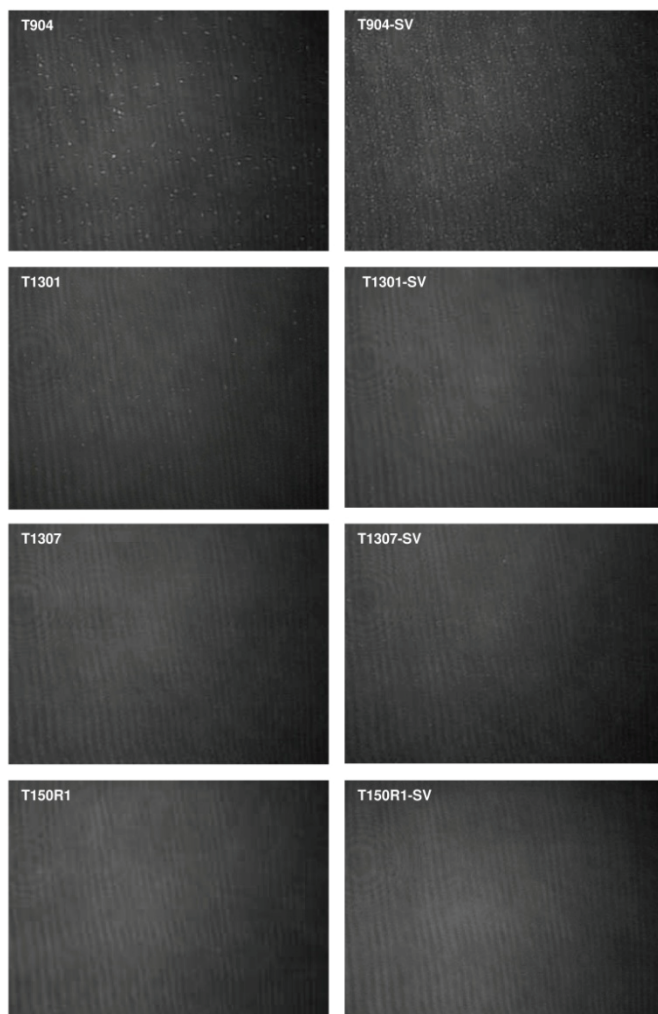


Figure S4. BAM images of poloxamine and poloxamine-SV mixtures ($X_{SV} = 0.5$) at a surface pressure of 25 mN m^{-1} . T904-SV began to show condensing nucleus at 15 mN m^{-1} (image not shown) while T904 only exhibited them at 25 mN m^{-1} . The number of nucleus raised in T904-SV as the pressure increased up to the collapse was reached. The presence of SV did not cause relevant changes in the BAM images of the other poloxamine varieties.

4 Resultados y discusión

De acuerdo con la declaración de objetivos que se presenta en el apartado segundo de la presente memoria, el trabajo se ha centrado en los copolímeros bloque de la familia de las poloxaminas. Para su desarrollo, se han seleccionado variedades representativas intentando cubrir una gama muy amplia de pesos moleculares, de longitudes de bloques óxido de etileno y óxido de propileno y de relaciones molares óxido de etileno y óxido de propileno. Adicionalmente y con el fin de obtener información que pueda servir de base para delimitar el potencial de las poloxaminas en la vehiculización de fármacos, se han evaluado tres variedades de poloxámeros representativas de este grupo de copolímeros sólidamente implantados en el ámbito de la tecnología farmacéutica (Tabla 7). En su conjunto, la información obtenida también debe servir para establecer relaciones estructura-funcionalidad para copolímeros bloque PEO-PPO, que puedan ser útiles a la hora de seleccionar las variedades más adecuadas para resolver distintos problemas de formulación.

Con respecto a la arquitectura molecular, la estructura más común de los poloxámeros y las poloxaminas es la secuencial. No obstante, en el caso de las poloxaminas, también se ha estudiado una estructura reversa (T150R1, Figura 5) y un derivado metilado de la secuencia original (T1107met) para tener una visión global de su comportamiento. Si bien los copolímeros comerciales pueden contener restos de cadenas poliméricas de bajo peso molecular remanentes del proceso de síntesis, las variedades seleccionadas para el estudio se utilizaron directamente, sin aplicar ningún procedimiento adicional de purificación, ya que es así la manera habitual de utilizarlos como excipientes farmacéuticos.

Tipo	Polímero	Peso molecular (Da)*	Unidades EO*	Unidades PO*	Relación EO/PO	HLB*	β
Poloxámeros	F127	12600	200	65	1.54	18-23	1.082
	F87	7700	122	40	1.53	24	1.088
	P123	5750	39	69	0.28	8	2.992
Poloxaminas	T1107	15000	60	20	3.00	18-23	1.100
	T1107met	15030	60	20	3.00	-	1.100
	T1301	6800	4	26	0.15	1-7	6.530
	T1307	18000	72	23	3.13	>24	1.070
	T150R1	7900	5	29	0.17	1-7	6.100
	T304	1650	3.7	4.3	0.86	12-18	2.320
	T901	4700	2.7	18.2	0.15	1-7	6.680
	T904	6700	15	17	0.88	12-18	2.290
	T908	25000	114	21	5.43	>24	0.770

*Datos tomados de BASF 2010.

Tabla 7. Características de los copolímeros estudiados.

Para clasificar los copolímeros en función de su polaridad, se han utilizado los valores de balance hidrofilia-lipofilia (HLB) indicados por el fabricante y se calculó el parámetro β . Este parámetro corresponde a la relación entre el radio de Flory del segmento PPO y del segmento PEO, y se puede estimar utilizando la expresión (Munch y Gast 1989):

$$\beta = \frac{I_{PO}(N_{PO})^{3/5}}{I_{EO}(N_{EO})^{3/5}} \quad \text{Ecuación 2}$$

en la que I_{PO} y I_{EO} representan la longitud (5.1 Å y 2.4 Å) y N_{PO} y N_{EO} el número de unidades PO y EO en la estructura del copolímero, respectivamente.

De acuerdo con los valores de HLB y β (Tabla 7) los copolímeros se pueden clasificar, desde el punto de vista de su polaridad, en los grupos siguientes:

- *Poloxámeros*
 - Altamente hidrofílicos ($\beta \approx 1$ y HLB > 18-24): F127 y F87
 - Polaridad intermedia ($\beta = 2-3$ y HLB = 8): P123.
- *Poloxaminas*
 - a) Altamente hidrofílicos ($\beta \approx 1$ y HLB > 18): T908, T1107 y T1307.
 - b) Polaridad intermedia ($\beta = 1-6$ y HLB = 8-18): T304 y T904.
 - c) Altamente hidrofóbicos ($\beta > 6$ y HLB = 1-7): T901, T1301 y T150R1.

A continuación se recogen y discuten los resultados obtenidos en cada una de las etapas del trabajo.

4.1 Caracterización de los fenómenos de micelización y gelificación de la poloxamina T904 en medios de distinto pH y fuerza iónica

En general, la agregación de los copolímeros transcurre en dos etapas. En la primera, los bloques insolubles se contraen y las macromoléculas se aproximan. A continuación, los bloques situados en el núcleo se ordenan para adoptar conformaciones de baja entropía. En el caso de los copolímeros tribloque, los bloques del núcleo se suelen entrelazar, lo que ralentiza el proceso de agregación (Katime 2003).

Aunque se suelen considerar como copolímeros neutros, las poloxaminas cuentan con un grupo central etilendiamino, que se puede protonizar si el pH es

suficientemente ácido. En consecuencia, se procedió a evaluar la influencia del pH sobre las propiedades de autoagregación del Tetronic® 904, una variedad de polaridad intermedia que ya se ha utilizado como componente de nanopartículas y de scaffolds en ingeniería de tejidos (Moghimi y Hunter 2000).

En primer lugar, se llevó a cabo una valoración potenciométrica para determinar el pK_a (Figura 13) y se calculó la proporción de especies no ionizadas, mono y diprotonadas en distintas condiciones de pH, utilizando las expresiones:

$$[T_{total}] = [T] + [TH^+] + [TH_2^{2+}] \quad \text{Ecuación 3}$$

$$[T] = \frac{[T_{total}]}{1 + \left(\frac{[H^+]}{K_{a2}}\right) + \left(\frac{[H^+]^2}{K_{a2} \cdot K_{a1}}\right)} \cdot \left(\frac{V_{inicial}}{V_{inicial} + V_{base}}\right) \quad \text{Ecuación 4}$$

$$[TH^+] = \frac{[T][H^+]}{K_{a2}} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$[TH_2^{2+}] = \frac{[T][H^+]^2}{K_{a2} \cdot K_{a1}} \quad \text{Ecuación 6}$$

en las que K_{a1} y K_{a2} representan las constantes de disociación y $V_{inicial}$ es el volumen de disolución inicial de T904 en medio con HCl (0.01 M, 25 mL) y V_{base} el volumen de NaOH (0.01 M) añadido.

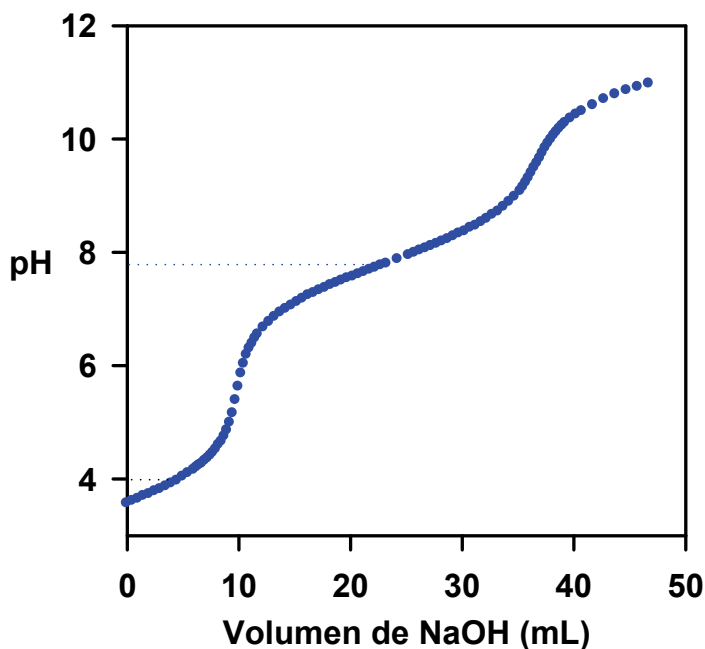


Figura 13. Perfil potenciométrico de la valoración de T904 con NaOH.

Se observaron dos valores de pK_a , a pH 4.0 (pK_{a1}) y a pH 7.9 (pK_{a2}), que corresponden a la disociación del primer y el segundo protón de los átomos de nitrógeno del grupo etilendiamino central. Para otras variedades de Tetronic[®], como el T701, se han publicado valores similares (Dong y col. 2004). En la Figura 14 se muestra la dependencia de la concentración de las distintas especies de T904 respecto del pH.

La forma diprotonada predomina a pH inferior a 4, siendo su concentración superior a la de la forma no protonada hasta pH 5.8. La forma monoprotónada es la predominante en el intervalo 4.0-7.9.

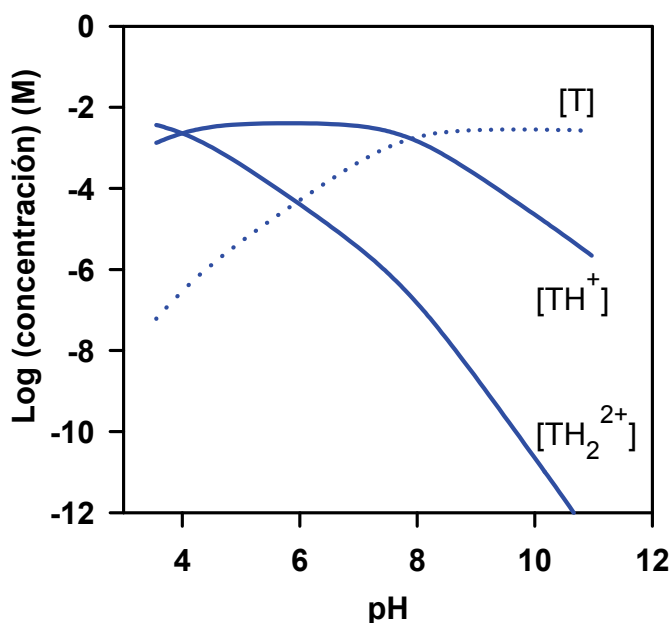


Figura 14. Concentración de especies de T904 en función del pH a 25°C.

Dado que las repulsiones electrostáticas entre los grupos amino cargados positivamente en el centro de las cadenas PPO pueden dificultar la agregación (Armstrong y col. 2001), la relación entre la energía libre de micelización y la energía libre de protonación determina la posibilidad de que se formen micelas:



$$K_{micelización} = \frac{[T_n][H^+]^n}{[TH^+]^n} \quad \text{Ecuación 8}$$

Para evaluar las repercusiones de la protonización sobre la autoagregación del T904, se determinaron las variaciones de energía asociadas al proceso de micelización/desmicelización, la CMC y el tamaño de las micelas en medios de distinto pH y fuerza iónica. Para determinar los cambios energéticos, se cuantificó el calor asociado al proceso de dilución de una disolución de T904

(10% p/p) al verterla desde una bureta a un vaso Dewar conteniendo medios de distinta naturaleza. Durante el ensayo se produce la demicelización del copolímero contenido en las primeras fracciones vertidas y, cuando se alcanza la CMC en el Dewar, se produce de nuevo la micelización. El proceso de demicelización fue exotérmico en todos los casos, si bien se observaron marcadas diferencias entre los perfiles calorimétricos en función del pH y la fuerza iónica (Figura 15). Para estimar la entalpía de demicelización se tuvo en cuenta la contribución de la ionización del copolímero y del tampón (Fukada y Takahashi 1998).

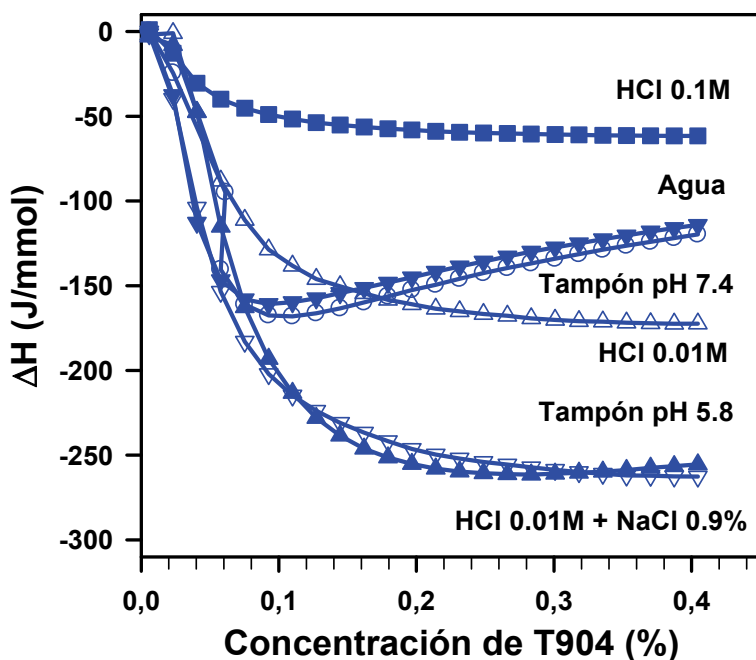


Figura 15. Perfiles calorimétricos del proceso de demicelización del T904 a 37°C en diferentes medios: agua (círculos abiertos), tampón pH 7.4 (triángulos invertidos llenos), tampón pH 5.8 (triángulos llenos), HCl 0.1 M (cuadrados llenos), HCl 0.01 M (triángulos abiertos) y HCl 0.01 M con NaCl 0.9% (triángulo invertido vacío).

Cuando se vierte la disolución concentrada de T904 en el Dewar, algunos protones pueden ser intercambiados con otros componentes del medio. Como la contribución energética a este proceso se debe al grupo etilendiamino central, se llevaron a cabo valoraciones adicionales con N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina (TEMED), que cuenta con un grupo etilendiamino en el que hay dos grupos metilos unidos a cada nitrógeno, en lugar de los segmentos PPO-PEO. A la concentración ensayada, no es previsible que el TEMED experimente procesos de agregación, por lo que las medidas calorimétricas deben reflejar únicamente los cambios de entalpía asociados a la protonización del grupo etilendiamino. Para los medios evaluados, la entalpía de ionización se situó entre -5 y -10 J/mmol, valores sensiblemente inferiores a los asociados al proceso de desmicelización cuando se emplea T904. En la Tabla 8 se muestran los valores corregidos de entalpía de micelización y los estimados para otros parámetros termodinámicos.

Medio	pH	X_{CMC} (fracción molar)	ΔH_{mic} (KJ/mol)	ΔG_{mic} (KJ/mol)	ΔS_{mic} (J/molK)	CMC (%)
Agua	8.5	2.69×10^{-6}	168	-49.56	701	0.09-0.10
Tampón fosfato pH 7.4	7.4	2.42×10^{-6}	161	-49.97	680	0.09-0.10
Tampón fosfato pH 5.8	5.8	7.00×10^{-6}	261	-61.15	1039	0.25
HCl 0.01 M	6.0	7.00×10^{-6}	167	-61.15	735	0.25
HCl 0.01 M + NaCl 0.9%	6.0	7.00×10^{-6}	255	-61.15	1019	0.25
HCl 0.1 M	1.2	1.08×10^{-5}	60	-88.40	478	> 0.40

Tabla 8. Parámetros termodinámicos de micelización del T904.

Los perfiles calorimétricos indican que la micelización es un proceso endotérmico promovido por la variación de entropía asociada a interacciones

hidrofóbicas entre cadenas PPO. El proceso exotérmico de dilución se debe a la formación de puentes de hidrógeno entre los segmentos PEO y las moléculas de agua, tras la ruptura de los enlaces agua-agua y PEO-PEO (Irwin y col. 2002). Este comportamiento es típico de otras copolímeros relacionados con las poloxaminas, como los Pluronic[®] (Alexandridis y col. 1994).

En medio acuoso no tamponado (pH 8-9) y en tampón fosfato pH 7.4, así como en NaOH 0.02M o en NaCl 0.9%, se obtienen perfiles superponibles y se observa claramente la CMC a 0.09-0.10%. A pH ácido la formación de micelas se ve dificultada, hasta el punto de que en medio HCl 0.1 M (pH 1.2) no se observa la formación de agregados hasta una concentración de T904 de 0.4%. A medida que el pH se va haciendo menos ácido, la formación de micelas se produce a concentraciones cada vez más bajas: 0.25% en HCl 0.01 M y en tampón fosfato pH 5.8. Las reducciones en los valores de entalpía van acompañadas de valores más bajos de entropía, al igual que se observó con Pluronic[®] modificados con cadenas amino terminales (Anderson y col. 2003). La incorporación de sales (NaCl 0.9%) al medio HCl 0.01M dio lugar a una mayor entalpía de demicelización, obteniéndose valores similares a los registrados en tampón fosfato de pH 5.8. El incremento de la fuerza iónica apantalla las repulsiones electrostáticas y puede producir un ligero efecto salino, que disminuye la hidrofilia de las cadenas PEO y promueve las interacciones por puentes de hidrógeno (Pandit y col. 2000; Anderson y col. 2003; Barreiro-Iglesias y col. 2003). Consecuentemente, el componente entrópico que promueve la agregación se ve favorecido e indirectamente también se incrementa la entalpía.

El tamaño de las micelas también se ve afectado por los cambios de pH y de fuerza iónica (Figura 16). Las microfotografías de TEM mostraron que en HCl 0.1 M las micelas son más pequeñas (2 nm) que en agua o en NaOH 0.02 M (10-

20 nm). En tampón fosfato, la distribución de tamaños micelares es muy abierta, debido a la coexistencia de las micelas individualizadas con clústeres de mayor tamaño. Los análisis de DLS confirmaron estos resultados, registrándose a 20°C una distribución bimodal en tampón fosfato pH 7.4, si bien a 37°C todas las distribuciones fueron unimodales. Un efecto similar de la temperatura sobre el proceso de micelización ha sido descrito para el Pluronic® 94, mientras que a 20°C se observaron micelas y clústeres, a 40°C sólo se detectó un pico estrecho correspondiente a las micelas (Bahadur y Pandya 1992). El incremento de temperatura promueve las interacciones hidrofóbicas y favorece la formación de micelas con un bajo contenido en agua, de manera que los clústeres se disuelven y el radio hidrodinámico de las micelas disminuye (Bahadur y Pandya 1992; Yang y Alexandridis 2000).

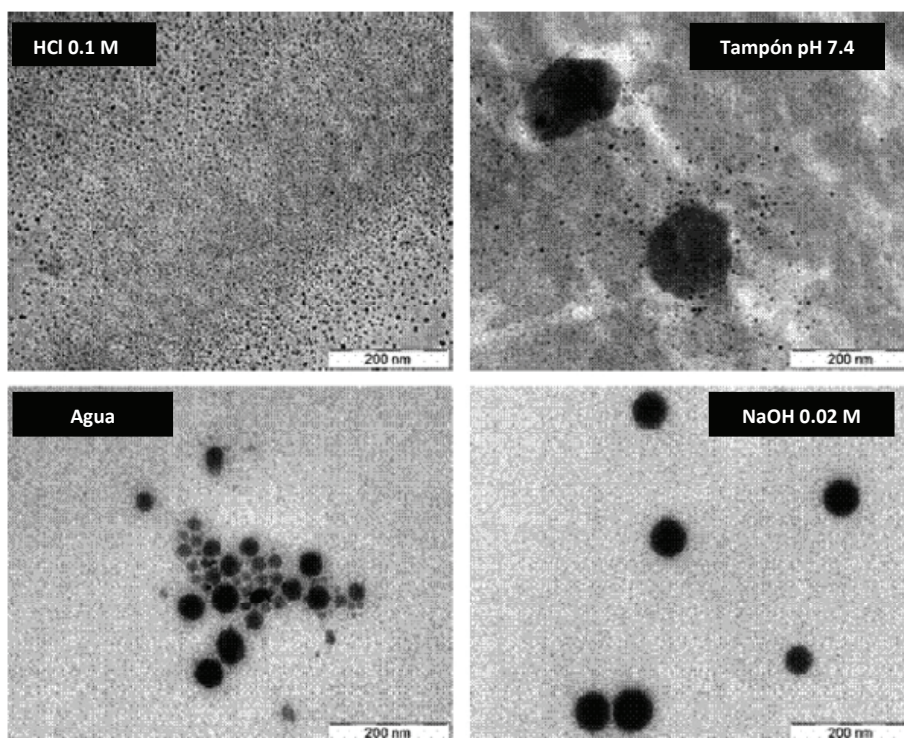


Figura 16. Microfotografías TEM de T904 al 30% en diferentes medios.

El proceso de gelificación también resultó ser dependiente de la temperatura y del pH, para una concentración dada del T904. A 20°C, el módulo de almacenamiento (G') de la disolución al 30% fue indetectable y el sistema se comportó como líquido viscoso Newtoniano. El valor más bajo del módulo de pérdida (G'') de las disoluciones preparadas en HCl 0.1 M se justifica por la protonización del copolímero y por el pequeño tamaño de las micelas. Todas las dispersiones, salvo la preparada en HCl 0.1 M, experimentaron una transición sol-gel en torno a 30°C. Por lo tanto, en condiciones fisiológicas de pH marcadamente ácido no cabe esperar que las dispersiones de T904 gelifiquen.

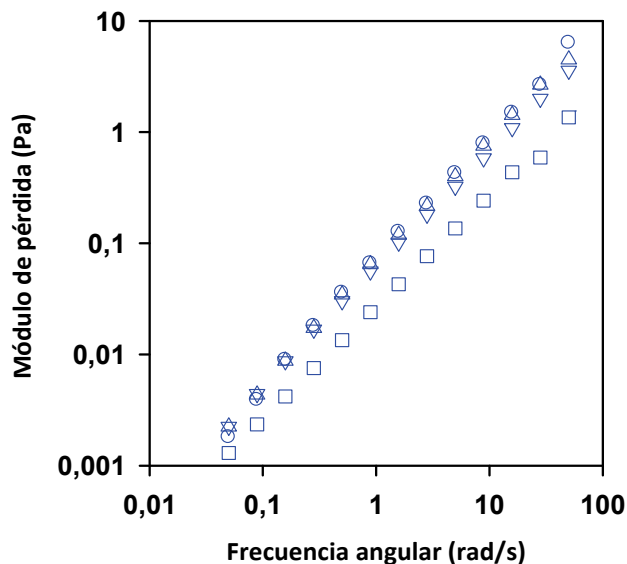


Figura 17. Dependencia del módulo de pérdida (G'') del T904 al 30% en medios de distinto pH a 20°C respecto de la frecuencia angular. Agua (círculos), HCl 0.1 M (cuadrados), tampón fosfato pH 7.4 (triángulos) y NaOH 0.02 M (triángulos invertidos).

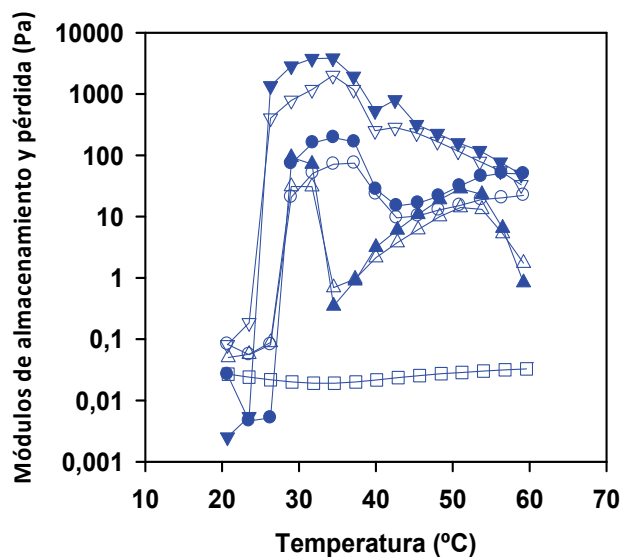


Figura 18. Dependencia de los módulos de almacenamiento (G' , símbolos llenos) y pérdida (G'' , símbolos vacíos) del T904 al 30% con respecto a la temperatura, para una velocidad angular de 1 rad/s. Agua (círculos), HCl 0.1 M (cuadrados), tampón fosfato pH 7.4 (triángulos) y NaOH 0.02 M (triángulos invertidos).

La solubilización micelar de fármacos hidrofóbicos se produce por incorporación del fármaco a las micelas. Por lo tanto, el marcado efecto del pH y la fuerza iónica sobre la micelización se puede ver reflejado en la capacidad solubilizante del T904. Para evaluar este posible efecto se utilizó la griseofulvina, un fármaco antifúngico de solubilidad baja (4 mg por 100 mL) e independiente del pH (Figura 19).

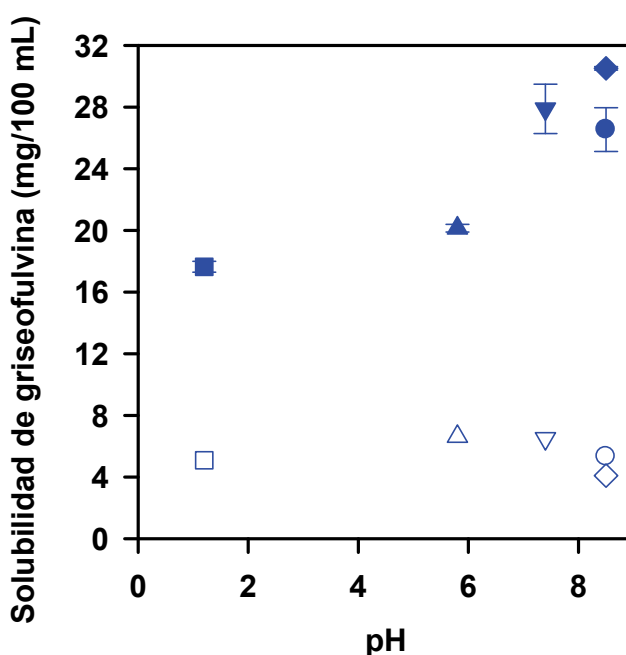


Figura 19. Solubilidad de griseofulvina en medios de diferente pH (símbolos vacíos) y fuerza iónica (símbolos llenos) en T904 10%. Leyenda: HCl 0.1 M (cuadrados), tampón fosfato pH 5.8 (triángulos), tampón fosfato pH 7.4 (triángulos invertidos), agua (círculos) y disolución NaCl 0.9% (diamantes).

En disoluciones de T904 al 10%, la solubilidad de la griseofulvina se incrementó de forma considerable (hasta 3 veces) incluso en el medio más desfavorable para la micelización (HCl 0.1 M). A pH neutro-alcalino, la solubilidad se incrementó hasta 6 veces; aumentando tanto la fracción de fármaco incorporada en las micelas como la cantidad total de fármaco solubilizado por gramo de bloque PPO (Tabla 9). En estas condiciones, la capacidad de solubilización de griseofulvina del T904 es comparable a la descrita para el Tween 80 (3.4 mg/g) y Cremophor EL (2.6 mg/g) (Balakrishnan y col. 2004).

Medio	Distribución del fármaco		Capacidad de solubilización		
	f_f	f_m	mg/g T904	mol/mol T904	mg/g PPO
NaCl 0.9%	0.134	0.866	2.64 (0.01)	0.050 (0.001)	4.48 (0.02)
Agua	0.201	0.799	2.12 (0.14)	0.040 (0.002)	3.60 (0.24)
Tampón pH 7.4	0.250	0.750	2.09 (0.16)	0.040 (0.003)	3.54 (0.27)
Tampón pH 5.8	0.379	0.621	1.25 (0.02)	0.024 (0.001)	2.12 (0.04)
HCl 0.1 M	0.288	0.712	1.25 (0.03)	0.024 (0.001)	2.13 (0.06)

Tabla 9. Distribución y capacidad de solubilización de griseofulvina en disoluciones de T904 al 10%.

4.2 Caracterización de los procesos de autoagregación en medio ácido de diversas poloxaminas

En la segunda etapa del trabajo se procedió a evaluar el comportamiento de siete variedades de Tetronic® secuencial de distinta hidrofilia (T304, T901, T904, T908, T1107, T1301 y T1307), una variedad reversa (T150R1) y otra químicamente modificada (met-T1107), en un medio desfavorable para la micelización (HCl 10 mM).

Las disoluciones de poloxaminas en HCl 10 mM mantuvieron un pH en torno a 2 hasta una concentración de copolímero del 1%. Únicamente el T304 dio lugar a un aumento marcado del pH llegando a alcanzarse valores superiores a 7 para concentraciones por encima del 4% (Figura 20). Para la caracterización de la CMC se acudió a una amplia batería de técnicas que aportan información complementaria. A continuación se comentan los resultados obtenidos.

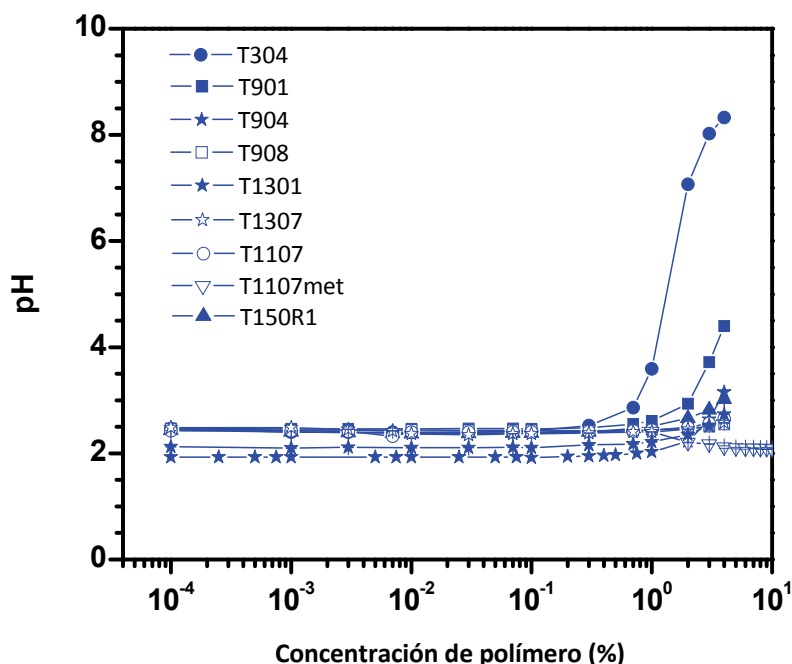


Figura 20. Variación del pH con la concentración de poloxamina.

En primer lugar, se procedió a medir la evolución de la tensión superficial en función de la concentración (Figura 21). Para determinar la CMC se estimó el valor de concentración a partir del cual la tensión superficial se hace prácticamente constante. Este criterio es habitual cuando se observan en el

gráfico zonas con distintas pendientes, que corresponden a cambios conformacionales en la estructura polimérica que facilitan la incorporación de nuevas moléculas a la interfase (Alexandridis y col. 1994; Dong y col. 2004).

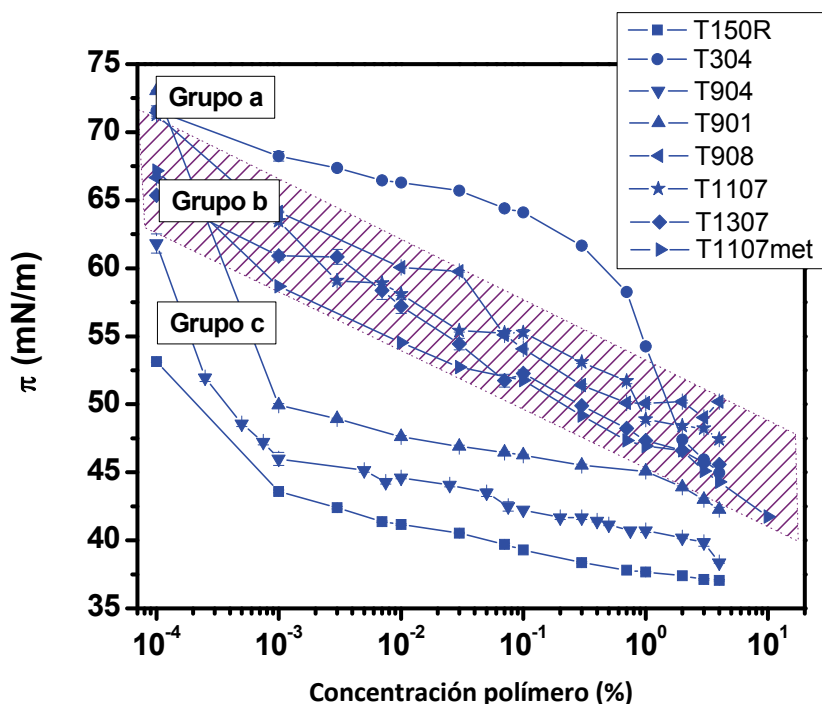


Figura 21. Tensión superficial de poloxaminas en HCl 10 mM a 25 °C.

La representación semilogarítmica de la evolución de la tensión superficial frente a la concentración (Figura 21) permite clasificar las poloxaminas en tres grupos:

- a) T304: exhibe la actividad superficial más baja, mostrando dos zonas bien diferenciadas:
 - I. Concentraciones < 0.5 mM: la tensión desciende lentamente a medida que aumenta la concentración.

- II. Concentraciones > 0.5 mM: se produce una caída brusca de tensión superficial hasta un valor de concentración de 12 mM, en el que se inicia una meseta. La CMC se estableció en 12 mM.

Este comportamiento indica que, dado el pequeño tamaño molecular del T304, se requiere un gran número de moléculas para que empiece a manifestarse algún efecto sobre la tensión superficial y se sature la interfase aire-agua.

- b) T908, T1107, met-T1107 y T1307: muestran perfiles muy similares. La relación PO/EO es la más baja de la serie y por lo tanto, su HLB el más alto. La tensión superficial disminuye progresivamente al aumentar la concentración de polímero hasta que por encima de 0.2-0.6 mM los cambios en la tensión superficial se atenúan.
- c) T901, T904, T1301 y T150R1: presentan la relación PO/EO más alta y su HLB es medio-bajo. Son las que muestran una mayor actividad superficial, exhibiendo un brusco descenso de la tensión superficial a bajas concentraciones de polímero (10^{-3} mM) seguidas de una zona en la que la caída es menos pronunciada.

En la Tabla 10 se recogen los valores de las CMC estimados para las distintas variedades de poloxaminas.

Poloxamina	CMC (mM)	
	Tensión superficial	I_1/I_{III}
T1107	0.67	0.46
T1107met	0.67	0.67
T1301	1.47	0.15
T1307	0.56	0.56
T150R1	0.88	0.09
T304	12.1	6.06
T901	2.12	1.48
T904	0.29	1.04
T908	0.28	0.40

Tabla 10. Valores de CMC estimados para las poloxaminas a partir de datos de tensión superficial y de fluorescencia de pireno.

Los cambios en el patrón de fluorescencia del pireno aportan información muy interesante acerca de los procesos de autoagregación de los copolímeros anfifílicos. La solubilización del pireno en el entorno hidrofóbico de los núcleos micelares de las poloxaminas se puede detectar como un descenso en la relación I_1/I_3 (Tabla 10).

Los perfiles observados para el T1301 y T150R1 evidencian un marcado incremento en la hidrofobicidad del medio cuando los unímeros se asocian en micelas. Las restantes variedades de poloxaminas muestran una pendiente menos pronunciada, existiendo una marcada diferencia entre la concentración a la que se observan los primeros cambios en la relación I_1/I_3 y la concentración a la que se alcanza la meseta.

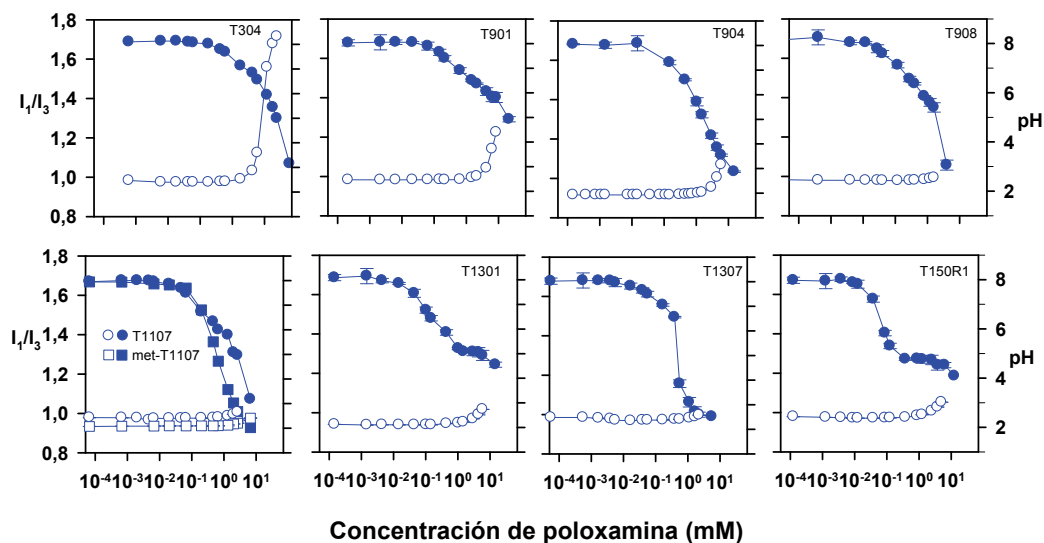


Figura 22. Variación de I_1/I_{III} con la concentración de poloxamina.

La CMC se estimó como la concentración en el punto medio del salto en los valores de la relación I_1/I_3 . Este punto de inflexión ocurrió a concentraciones más bajas en el caso del T1301 y el T150R1 que en el de las restantes poloxaminas (Tabla 10). T1301 y T150R1 están formados por largos bloques PPO, con una alta relación PO/EO, que lleva a un bajo HLB y un alto β . Para las restantes poloxaminas, la estabilización de la relación I_1/I_3 ocurre sólo a concentraciones elevadas ($\approx 10\%$). Estos hallazgos revelan que se requiere un gran número de estructuras micelares de T901, T904, T908 y T1307 para proporcionar un ambiente suficientemente hidrofóbico para alojar la molécula de pireno. Los perfiles del T1107 y de su derivado metilado (met-T1107) fueron casi superponibles, lo que prueba que la metilación no afecta significativamente a la micelización de esta poloxamina.

La evolución de la fluorescencia de pireno en el caso del T304 es más compleja. Su baja tendencia a la micelización no explica por sí sola la importante

caída en la relación I_1/I_3 . El aumento de concentración del T304 está asociado a un incremento significativo del pH del medio (Figura 20). Por lo tanto, las moléculas de pireno que interactúan con las unidades PO deben estar muy próximas al grupo etilendiamino central, pudiendo producirse fenómenos de transferencia electrónica fotoinducida desde los grupos amino hacia las moléculas de pireno excitado (Suzuki y col. 2006).

Las CMCs observadas para las poloxaminas estudiadas son del mismo orden de magnitud que las encontradas para copolímeros PO-EO dibloque y tribloque, incluyendo poloxámeros. A modo de ejemplo, se muestra el comportamiento observado para tres variedades de poloxámero, F87, F127 y P123 (Figura 23).

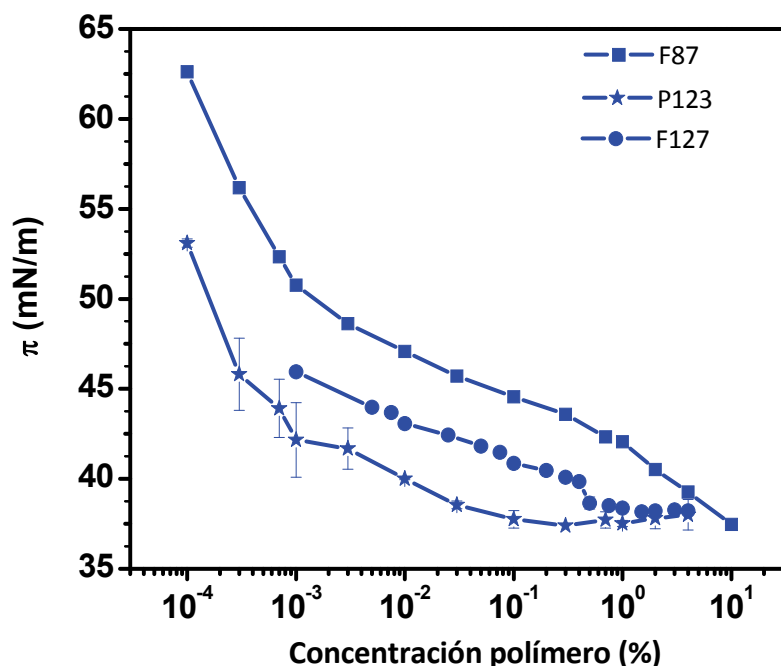


Figura 23. Tensión superficial de poloxámeros en HCl 10 mM a 25 °C

Los tres poloxámeros se comportaron de manera diferente, siendo el P123 el que presentó una menor CMC, seguido del F87 y el F127. Además, tanto el P123 como el F87 presentaron un valor inicial de I_1/I_3 de 1.31 frente a 1.79 del F127. Estos resultados están en concordancia con los pequeños valores de β y HLB (2.99 y 8, respectivamente) del P123 con respecto al F87 y F127 (β 1.09 y 1.08 y HLB 24 y 18-23, respectivamente). Teniendo en cuenta estos valores, los unímeros de P123 y los núcleos de sus micelas pueden considerarse mucho más hidrofóbicos que sus homólogos. Esto explica la baja relación I_1/I_{III} observada para el P123 por encima de la CMC.

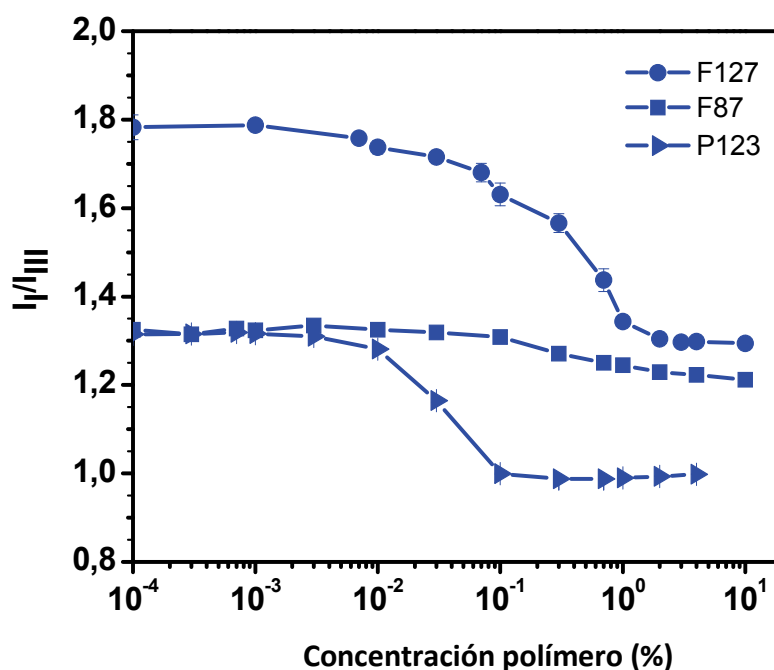


Figura 24. Dependencia de I_1/I_{III} respecto de la concentración de poloxámero.

Poloxámero	CMC (mM)	
	Tensión superficial	I _I /I _{III}
F127	0.51	0.53
F87	2.04	3.01
P123	0.12	0.32

Tabla 11. Valores de CMC estimados para los poloxámeros a partir de las medidas de tensión superficial y de fluorescencia de pireno.

Las discrepancias entre los resultados obtenidos por las dos técnicas de determinación de la CMC, que también se han descrito previamente para otros materiales, se pueden atribuir a que cada técnica se basa en la medida de propiedades distintas.

Es interesante destacar que el logCMC (proporcional a la energía libre de Gibbs de micelización cuando la concentración se expresa en mol/dm³) resultó ser inversamente proporcional a la longitud total de la cadena hidrófoba. Por lo tanto, cuanto mayor es el número de unidades PO, más baja es la CMC. Correlaciones similares a ésta se han descrito previamente para copolímeros dibloque y tribloque con bloques hidrofílicos PEO (Booth y Attwood 2000). Para estos copolímeros se ha observado un incremento de una unidad en el logCMC por cada 100 unidades PEO. Las poloxaminas evaluadas difieren significativamente en la longitud de los segmentos PEO (desde 3 a 114 unidades de EO) pero los cambios en la CMC en función del número de unidades EO son poco marcados, lo que explica la pequeña dispersión de los datos en el gráfico semilogarítmico. En el caso de las poloxaminas, la pendiente (0.019) es menor que las encontradas para copolímeros dibloque y tribloque de similares características (0.041-0.056). Por lo tanto, la forma en X de las poloxaminas se manifiesta como un factor que afecta de manera importante al proceso de autoasociación. La menor pendiente del gráfico logCMC vs número de unidades PO puede estar relacionada con el hecho de que los bloques PO se encuentran

distribuidos en cuatro brazos conectados a un segmento central hidrofílico etilendiamino. Esto implica que un incremento de cuatro unidades de PO por molécula suponga sólo una unidad adicional de PO en cada brazo.

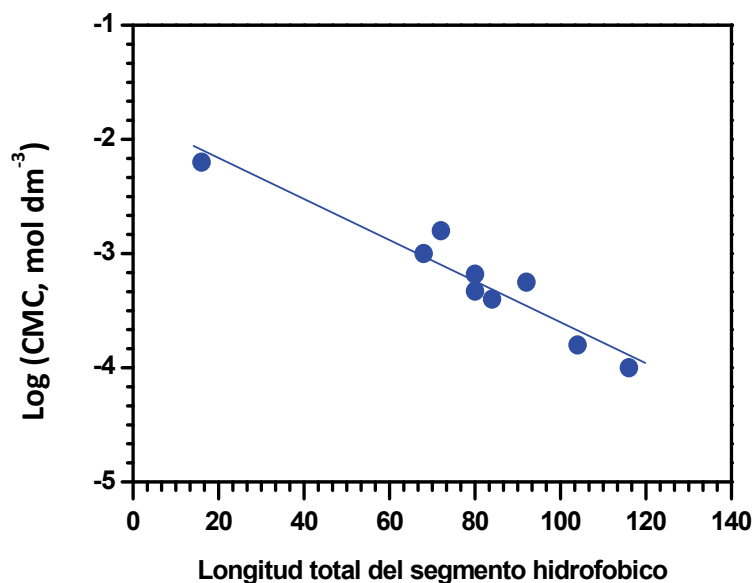


Figura 25. Dependencia del logaritmo de la CMC obtenida de los ensayos de fluorescencia frente a la longitud total del segmento hidrofóbico de las poloxaminas (cuatro veces la longitud del segmento PPO de un brazo).

La caracterización del proceso de agregación se completó con medidas de DLS y SLS. En la Tabla 12 se resumen los resultados obtenidos para las poloxaminas en HCl 10 mM a 37°C. El T304 y el T150R1 no se pudieron caracterizar por esta técnica debido a la escasa tendencia a formar micelas del primero y a la baja solubilidad del segundo en las condiciones del ensayo. En general, los números de agregación de las restantes variedades fueron pequeños, salvo para el T904 y el T1301.

Poloxamina	Peso molecular micelar (Da)	N	r_h (nm)	δ_t	r_t (nm)	$A_2 \times 10^4$ ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-2} \text{g}^{-2}$)	r_c (nm)	v_e (nm^3)	n_w
T901	-	-	40	1	-	-	-	-	-
T904	92000	14	5.9	2.2	4.1	0.9	3.5	0.52	15
T908	167000	7	5.6	1.1	4	0.3	3		5
T1107	63000	4	7.6	3.2	4.1	2.1	2.4	0.98	33
T1107-met	47000	3	4.9	2.2	3.7	1.4	2.2	0.75	27
T1301	346000	51	12.1	1.9	6.3	0.2	5.7		35
T1307	88000	5	8.3	3.6	4.9	2	2.7	0.83	34
T150R1	-	-	50	1	-	-	-	-	-

N = número de agregación, r_h = radio hidrodinámico, δ_t = factor de expansión, r_t = radio termodinámico, A_2 = coeficiente virial, r_c = radio del núcleo micelar, v_e = volumen de la unidad EO hidratada, n_w = número de moléculas de agua asociadas a cada unidad EO.

Tabla 12. Parámetros micelares de las poloxaminas en HCl 10 mM a 37°C.

Las microfotografías de TEM mostraron nanoestructuras esféricas (Figura 26). En concordancia con los resultados de DLS, un incremento en la relación PO/EO dio lugar a un aumento de tamaño en las micelas. En el caso del T901, T1301 y T150R1 se puso de manifiesto la coexistencia de agregados de distintos tamaños. El tamaño micelar de las restantes poloxaminas fue concordante con el peso molecular y el número de agregación de los copolímeros. Por ejemplo, aunque T1107 y T1307 tienen un contenido similar en PEO (70%), el primero es menos hidrofílico (bloque PEO más corto) debido a su menor peso molecular y, por lo tanto, da lugar a micelas más pequeñas. Por otra parte, el T1107 metilado forma micelas de tamaño inferior al de las que origina el T1107 no modificado.

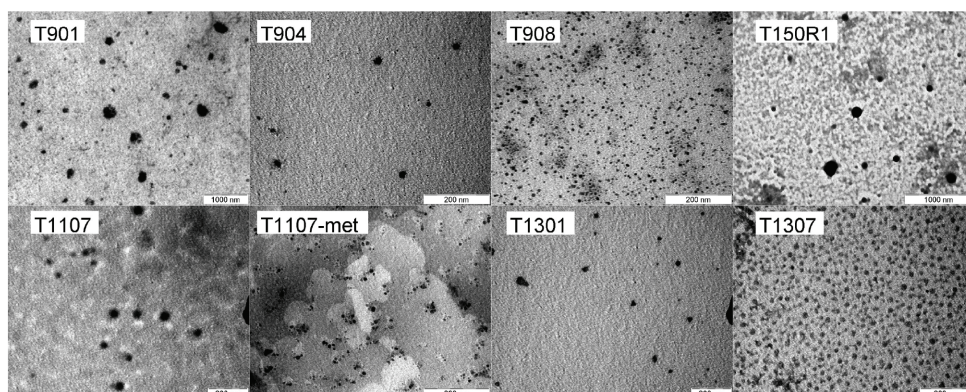


Figura 26. Microfotografías TEM de las disoluciones de poloxaminas al 10% en HCl 10 mM previamente tratadas con ácido fosfotúngstico.

4.3 Comportamiento de los copolímeros y sus mezclas con simvastatina en la interfase aire-agua

4.3.1 Isotermas π -A de las poloxaminas

Las interacciones copolímero-copolímero también se evaluaron a través de los registros de las isotermas presión superficial vs área en la interfase aire-HCl 10 mM. Para ello, se utilizó un dispositivo que permite la formación de una monocapa de copolímero sobre la superficie de la disolución acuosa de HCl 10 mM y, a continuación, se registraron los cambios de presión en la monocapa a medida que se fue comprimiendo a velocidad constante.

En la Figura 27 se recogen las isotermas π -A de las poloxaminas usando HCl 10 mM como subfase. El T304 ejerce una resistencia a la compresión relativamente pequeña, debido a su bajo peso molecular, la corta longitud de sus segmentos PPO y PEO, y su alta hidrosolubilidad. El resto de las poloxaminas se pueden encuadrar en dos patrones de comportamiento:

- Poloxaminas con bajo contenido en PEO: T901, T904, T1301 y T150R1.
- Poloxaminas con alto contenido en PEO: T1107, T1107met, T1307 y T908.

El primer grupo, con bajo contenido en PEO, muestra dos regiones bien diferenciadas en contraste con el segundo grupo, que presenta tres o cuatro regiones en cada isoterma.

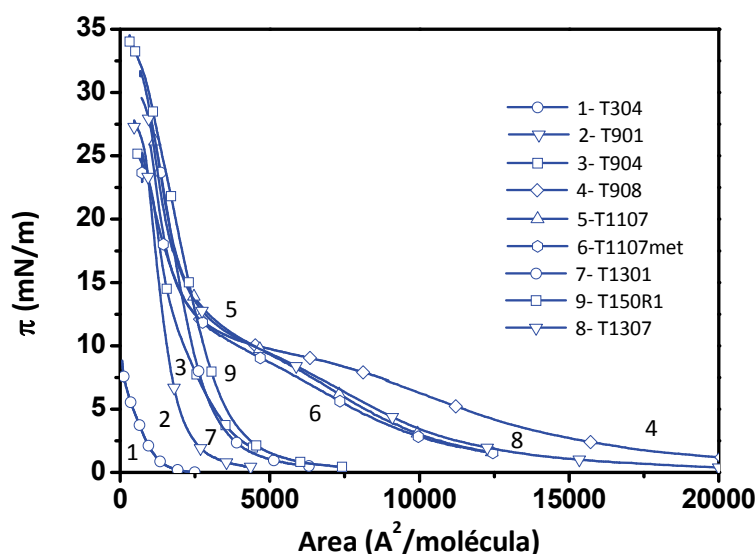


Figura 27. Isotermas π -A de las poloxaminas empleando HCl 10 mM como subfase.

4.3.1.1 Efecto del grupo hidrofílico (PEO)

Para evaluar el efecto del grupo EO sobre la forma de la isoterma, se compararon por una parte las isotermas π -A del T901, el T904 y el T908 (Figura 28) y, por otra, las del T1301 y el T1307 (Figura 29). Las isotermas de copolímeros que tienen un número similar de unidades PO pero diferente contenido en

unidades EO se diferencian fundamentalmente en su forma a bajas presiones. Sin embargo, a presiones altas, los perfiles de las isothermas se superponen.

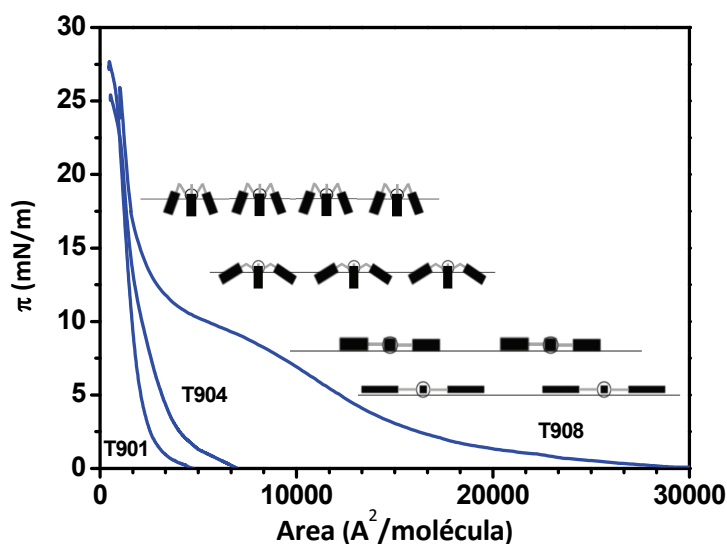


Figura 28. Isothermas π -A del T901, T904 y T908.

Cuando no se ejerce presión, el copolímero se dispone en la interfase con una conformación plana (“pancake” o “torta”) paralela al plano superficial. El área ocupada es función del número de unidades EO y PO. Una unidad EO ocupa aproximadamente un área transversal máxima de 13-16.5 Å² y una unidad PO un área de 17.5 Å² (Muñoz y col. 1999; O'Connor y col. 1999). Una vez hidratadas, las áreas de las unidades EO y PO se incrementan en 8.5 Å² (correspondientes a una molécula de agua). El grupo etilendiamino puede ocupar aproximadamente ~25 Å². Por ejemplo, una vez que se inicia la compresión de la monocapa de T908 (con 80% EO), la presión superficial se incrementa paulatinamente hasta 13500 Å²/molécula, valor similar al esperado como área transversal resultante de la suma de todas las unidades EO y PO junto con el grupo etilendiamino central. A medida que la presión aumenta, los bloques hidrofóbicos PPO que inicialmente estaban paralelos a la interfase aire-HCl 10 mM se contraen y se expulsan hacia

el aire. Este fenómeno sucede a presiones muy bajas debido a la debilidad de la interacción entre el medio acuoso y los grupos hidrófobos (Hann 1990). En el caso concreto del T908, esta presión se corresponde con un área de 8700 Å²/molécula, que equivale a la suma de 348 unidades de PO y EO; es decir, el ordenamiento de las moléculas determina que el área ocupada pase a ser un 36% menor que el valor inicial (13500 Å²/molécula). Entre 7.3 y 11 mN/m se observa otra región de pendiente más baja que se debe a un cambio en la conformación de las poloxaminas para permitir la inmersión de los bloques hidrofílicos PEO en la subfase; el copolímero adopta la conformación denominada “hongo” (“mushroom”). En esta región existe un ligero incremento en la presión superficial a medida que disminuye el área disponible, indicando que no ocurre una verdadera transición de primer orden. Esta “meseta” (Wesemann y col. 2003) o “pseudomeseta” (Szleifer 1998; Bijsterbosch y col. 2002) en las isothermas π -A, es interpretada como un reordenamiento de las unidades PPO en lazos (loops) y la inmersión de más unidades EO en la subfase acuosa. El final de la meseta corresponde a valores de área superficial ~1900 Å²/molécula, que indica que todas las unidades EO se encuentran en la subfase y al mismo tiempo la superficie se encuentra ocupada exclusivamente por los segmentos PPO. Compresiones mayores causan un aumento brusco de la presión (Figura 28). Las moléculas de poloxamina se aproximan gradualmente, restringiendo la movilidad de los bloques debido tanto a limitaciones espaciales como a un incremento de las interacciones laterales. Las moléculas de copolímero se reorganizan en una conformación “cepillo” (“brush”)-(Muñoz y col. 1999; Chen y col. 2003; Kiss y col. 2006). En la subfase, las cadenas PEO en forma de hélice interaccionan con cadenas PEO vecinas, mientras en la interfase los bloques PPO pueden formar lazos e incluso solubilizarse parcialmente. Este proceso se ve facilitado por los grupos etilendiamina protonados. Si el área se

restringe más, los bloques PEO y PPO se estiran para ocupar la menor área posible (estado condensado).

Debido a su bajo contenido en unidades EO, el T901 y el T904 exhibieron isothermas π -A con dos regiones diferenciadas, encontrándose las monocapas mucho menos expandidas a bajas presiones que la del T908. A presiones relativamente altas ($\pi > 15$ mN/m) predomina la contribución de los bloques PPO y las isothermas del T908, T904 y T901 se superponen. De esta manera, para un determinado tamaño del grupo hidrófobo (PPO), cuanto mayor es el número de unidades hidrofílicas (PEO), mayor es la región que corresponde al estado expandido. Además, cuando se comparan las isothermas π -A del T1107, met-T1107 y T1307 con la obtenida para el T908 se observa que cuanto mayor es el número de unidades EO, más amplia es la región de la meseta.

4.3.1.2 Efecto del grupo hidrófobo (PPO)

La influencia del tamaño de los bloques PPO se evaluó comparando el comportamiento del T901, T1301 y T150R1 (Figura 29), que tienen un número similar de unidades EO y un número de unidades PO muy diferente. Como era de esperar, la presión superficial de la monocapa de T901 fue medible a áreas por molécula mucho menores que en el caso de las monocapas de copolímeros de mayor tamaño molecular, tales como el T1301 y T150R1. En la isoterma se distinguen dos regiones bien diferenciadas. Cuando el área por molécula es grande, la presión superficial aumenta lentamente al reducirse el área. Por encima de 12 mN/m, se produce un brusco incremento en la presión. El área extrapolada por encima de esta presión indica que el área ocupada por molécula en el estado condensado es 1900 \AA^2 para el T901, 2900 \AA^2 para el T1301 y 3400 \AA^2 para el T150R1. Estos valores están en concordancia con las áreas estimadas a partir del número de unidades PO del T901, T1301 y T150R1, y apoyan la

hipótesis de que la superficie esté ocupada casi de manera exclusiva por bloques PPO. Un comportamiento similar se observó para el T304, que tiene un número de unidades EO parecido al T901, T1301 y T150R1, pero un contenido en unidades PO sensiblemente inferior. El área de colapso del T304 ($500 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$) también coincide con el área ocupada por sus unidades PO. Las similitudes entre las isothermas π -A del T1301 y T150R1 indican que el cambio estructural en la posición de los bloques PPO y PEO no afecta al comportamiento en la interfase aire-agua.

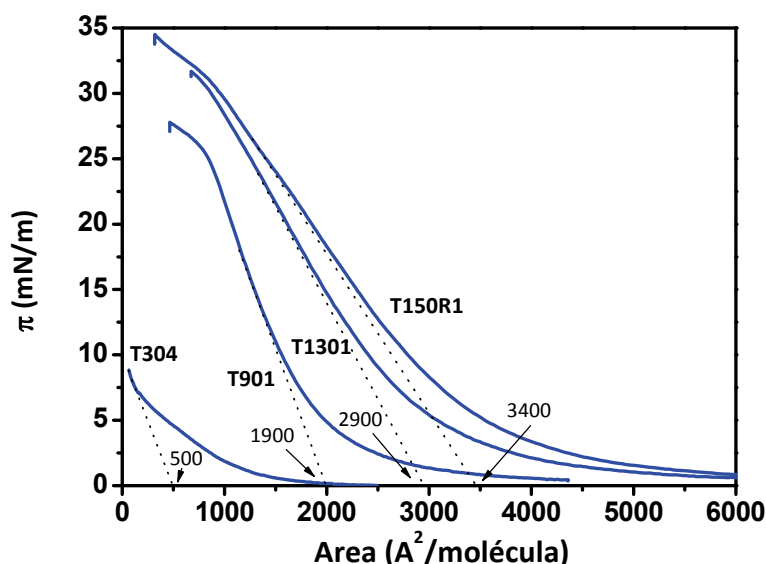


Figura 29. Isothermas π -A del T904, T901, T1301 y T150R1.

4.3.2 Isothermas π -A de los poloxámeros

Las isothermas de algunos poloxámeros en agua se encuentran descritas en distintas publicaciones (O'Connor y col. 1999), pero no se dispone de información relativa al comportamiento interfacial de estos materiales con HCl

10 mM como subfase. En consecuencia, se procedió a registrar las isothermas π -A de F87, F127 y P123 (Figura 30).

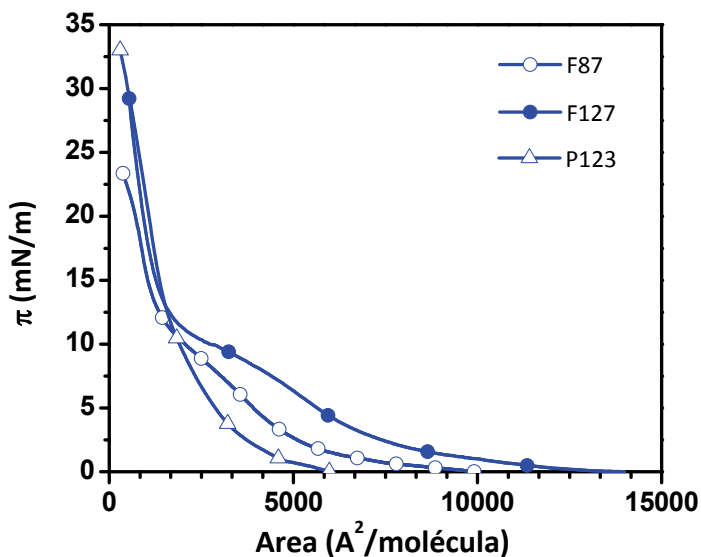


Figura 30. Isothermas π -A de los poloxámeros.

Aunque se observaron diferencias significativas a bajas presiones, en términos generales la evolución del comportamiento de estos tres copolímeros en la monocapa a medida que se incrementa la presión, se puede ver como una sucesión de los siguientes cambios conformacionales.

- A presiones bajas, el copolímero presenta una conformación relajada plana ("pancake") con los grupos PO y EO sobre la interfase aire-agua (Chang y col. 2008), ocupando un área que es igual a la suma del área ocupada por la totalidad de los bloques EO ($13\text{-}16 \text{ \AA}^2$) y PO (17.5 \AA^2) con sus correspondientes moléculas de agua de hidratación ($8.5 \text{ \AA}^2/\text{molécula de agua}$). Cuando se alcanzan áreas por molécula de 6390 , 3907 ó 2710 \AA^2 , se puede

considerar que la superficie está cubierta en su totalidad por moléculas de F127, F87 o P123, respectivamente.

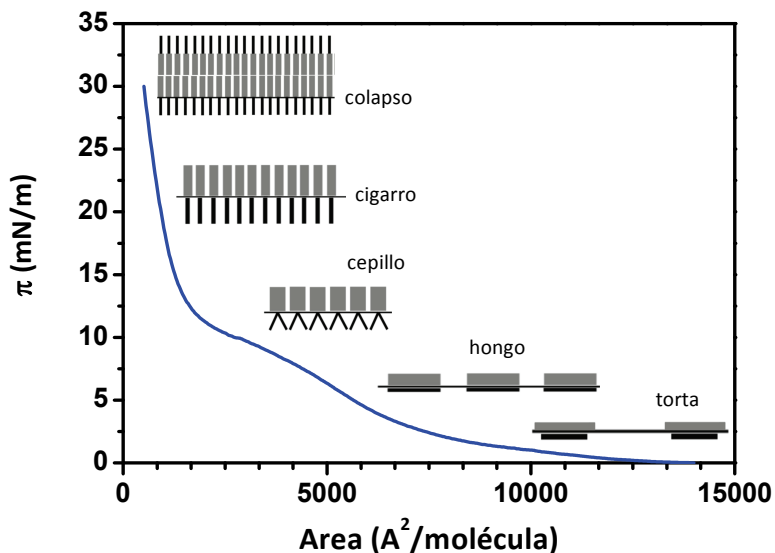


Figura 31. Esquema de plegamiento de los poloxámeros en monocapa.

- b) A medida que aumenta la presión, se va produciendo el cambio hacia la conformación “*hongo*”. En esta región la presión crece progresivamente a medida que el área se reduce. La meseta que se observa se explica por el reordenamiento de las estructuras PPO en forma de lazos y la inmersión parcial de los bloques hidrofílicos (PEO) en la subfase. En la parte final de la meseta todas las unidades EO se encuentran sumergidas y sólo los bloques PPO cubren la interfase. El F127, que cuenta con el mayor número de unidades EO, es el copolímero que da lugar a isoterms con una meseta más amplia. La monocapa del F127 puede ser comprimida sin que se produzca un aumento relevante de la presión, puesto que los grupos PEO se sumergen con

facilidad facilitando la reducción del área. Por el contrario, en el caso del P123, que contiene un número muy pequeño de unidades EO, la meseta es prácticamente imperceptible. Por lo tanto, las monocapas de P123 pueden considerarse como un film condensado mientras que las de F127 y F87 se comportan como films expandidos.

- c) Una reducción adicional del área, provoca un rápido aumento de la presión. En esta región, los bloques PPO que cubren la interfase adoptan una disposición en cepillo, que se caracteriza por su estiramiento debido a restricciones de área y a un aumento de las interacciones laterales. A presiones altas ($\sim 14-15$ mN/m), los perfiles de las isotermas del F127 y P123, que cuentan con el mismo número de unidades PO, se superponen. En el caso de los copolímeros con largas cadenas PEO, F87 y F127, se puede producir una inmersión parcial de los segmentos PPO en la subfase (Chang y col. 2008).
- d) Finalmente, la monocapa alcanza el estado condensado y se produce el colapso ($\sim 25-35$ mN/m). En términos generales, las isotermas π -A de los Pluronic[®] sobre HCl 10 mM son similares a las que se obtuvieron previamente utilizando agua como subfase (Chang y col. 2008).

Los Pluronic[®] F127, F87 y P123 mostraron módulos de compresibilidad (< 30 mN/m) característicos de monocapas que ofrecen una escasa resistencia a la compresión (Figura 32). Este comportamiento se explica por la flexibilidad de los enlaces entre las unidades EO (Faure y col. 1999; Kiss y col. 2006; Chang y col. 2008). Los cambios que se observan en el módulo de compresibilidad a una

presión de 10 mN/m, se explican por el reordenamiento de los bloques PPO, relativamente rígidos, en forma de lazos. El aumento más marcado del valor del módulo de compresibilidad (desde 4.9 mN/m a π 5 mN/m hasta 22.3 mN/m a π 18 mN/m) en el caso del P123 se debe a que este copolímero cuenta con menos unidades EO, lo que también explica la mayor resistencia a la reducción del área comparativamente con los otros dos poloxámeros. El F127 y el F87 parecen tener una dependencia similar, en lo que respecta al módulo de compresibilidad, hasta que alcanzan una presión de 16 mN/m. A partir de ese valor, el F127 ofrece una mayor resistencia a la compresión, debido a su alto contenido en unidades PO, lo que explica su mayor presión de colapso (32 mN/m vs 22 mN/m).

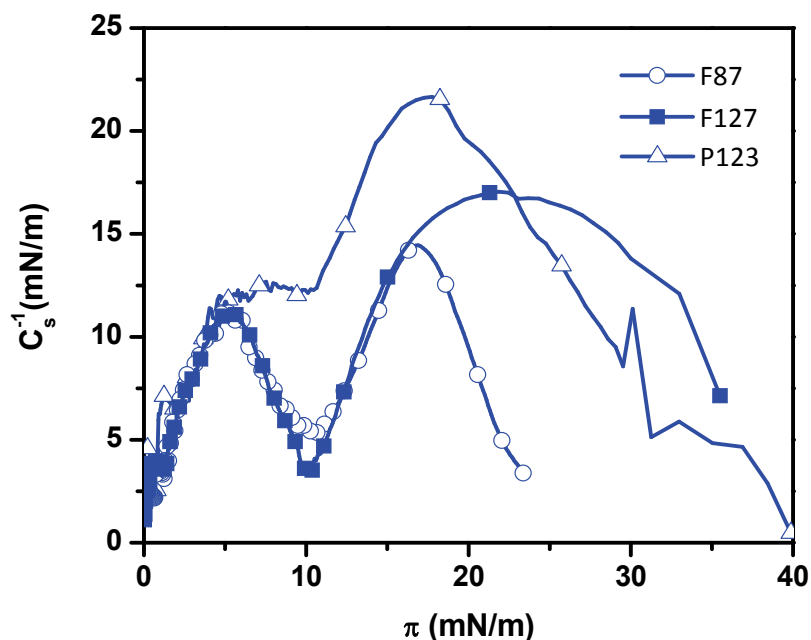


Figura 32. Módulo de compresibilidad de monocapas de poloxámeros.

4.3.3 Isothermas π -A de los sistemas mixtos copolímero-simvastatina

El registro de las isothermas π -A de monocapas de sistemas mixtos se viene utilizando desde hace años como medio para poner de manifiesto fenómenos de interacción y evaluar la miscibilidad de moléculas pequeñas y de macromoléculas de naturaleza diversa (Winterhalter y col. 1995; Sandez-Macho y col. 2005; Lee y col. 2008; Ariga y col. 2009; Jackson y col. 2009). Esta etapa de la tesis se planteó con el objetivo de dotar de un valor añadido a estos estudios, utilizándolos como herramienta para la predicción del comportamiento de los sistemas mixtos copolímero bloque-simvastatina en disolución y, en particular, para predecir la capacidad de las micelas de poloxamina y poloxámero para

hidrosolubilizar fármacos y la estabilidad de estos sistemas frente a la dilución. Comparativamente con otros métodos de análisis, el registro de isothermas π -A requiere cantidades mínimas de fármaco y copolímero y tiempos mucho más reducidos, lo que supone dos ventajas de indudable trascendencia práctica.

4.3.3.1 Simvastatina

Para llevar a cabo el análisis de monocapas mixtas es necesario que los dos componentes se localicen en la interfase. Puesto que no se disponía de información a cerca de la simvastatina a este respecto, se comenzó por registrar la isoterma π -A de este fármaco (Figura 33). Cuando la monocapa de simvastatina se comprimió a temperatura constante (25°C) se obtuvo una isoterma π -A con regiones bien diferenciadas. El área de despegue se alcanzó a 75 Å²/molécula. La compresión de la monocapa causó un progresivo incremento en la presión superficial hasta llegar a 30 mN/m, valor al que la monocapa se colapsó. El área extrapolada en la fase condensada fue de 52.3 Å²/molécula, lo que indica que los grupos hidrofóbicos de las moléculas de simvastatina están orientados paralelamente a la interfase. La microscopía de ángulo de Brëwster se empleó complementariamente para conocer la estructura y homogeneidad de la monocapa. Las imágenes BAM revelaron un incremento de los núcleos brillantes y de la reflectividad a medida que se comprime la monocapa (Figura 34). Alrededor de 30 mN/m se observan las bandas estriadas características del colapso.

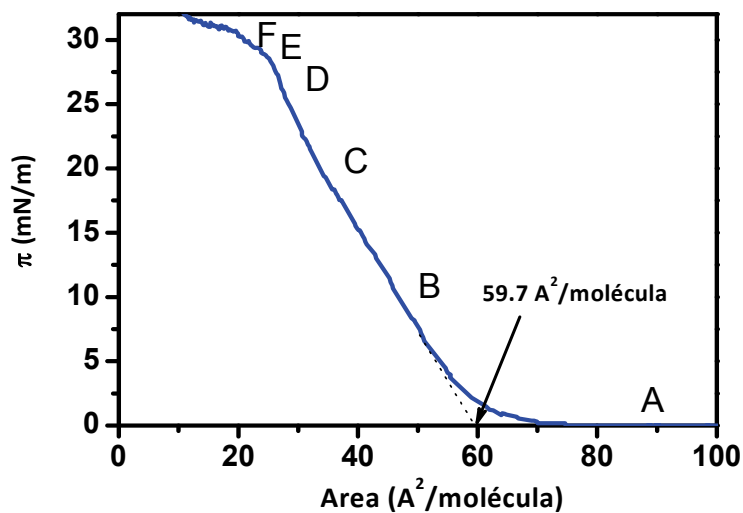


Figura 33. Isoterma π -A de la simvastatina pura.

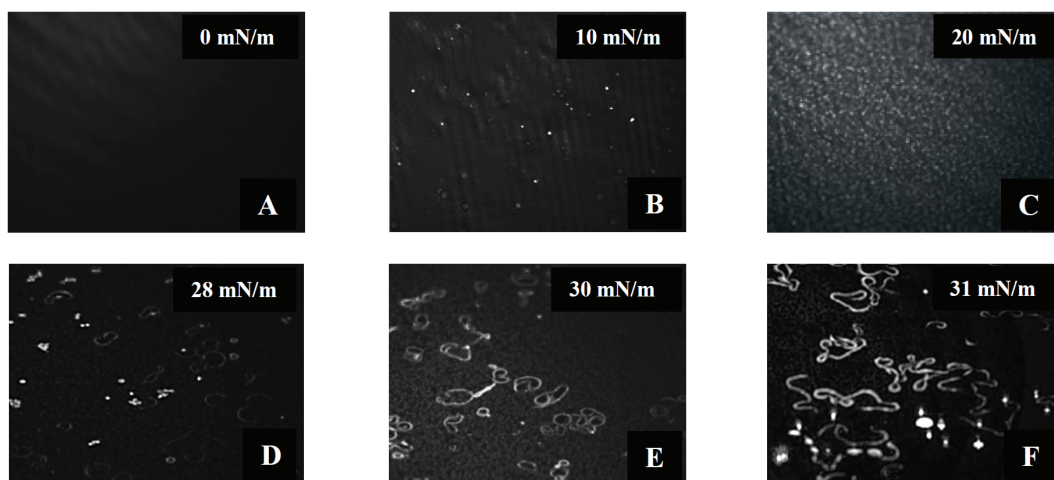


Figura 34. Imágenes BAM de la isoterma de simvastatina pura.

El módulo de compresibilidad (C_s^{-1}) a presiones superiores a 5 mN/m fue de unos 50 mN/N. Este valor es característico de un líquido intermedio y corresponde a la transición de líquido expandido a líquido condensado (Tabla 13).

Estado de la monocapa (fase)	Cs ⁻¹ (mN/m)
<i>Gaseoso</i>	0-12
<i>Líquido expandido (L1)</i>	15-50
<i>Líquido intermedio (I)</i>	50-100
<i>Líquido condensado (Lc)</i>	100-250
<i>Sólido (S)</i>	1000-2000

Tabla 13. Estado de la monocapa en función del módulo de compresibilidad (Davies y Rideal 1963).

Con el fin de definir con mayor exactitud la conformación de la simvastatina en la interfase, se llevó a cabo una modelización estructural basada en métodos *Ab initio* y semiempíricos (Gaussian 2003). La conformación energéticamente más estable en fase gas es la que presenta un ángulo ϕ (OCOC) del grupo éster del α -dimetil-propionato de 5°. En estas condiciones, el área que ocuparía la molécula sobre la interfase se estimó unos 60 Å², valor coincidente con el estimado experimentalmente al analizar la monocapa (59.7 Å²).

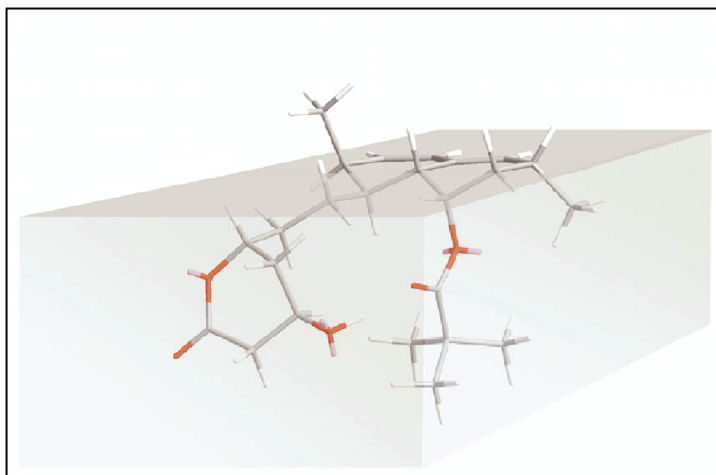


Figura 35. Estimación de la conformación más estable de la simvastatina en la interfase aire-agua según las predicciones del estudio *ab initio*-semiempírico.

4.3.3.2 Monocapas mixtas copolímero-simvastatina

Una vez caracterizado el comportamiento superficial de los componentes puros se procedió a analizar las mezclas de simvastatina con los distintos tipos de poloxámeros y poloxaminas.

La información obtenida se evaluó a través del análisis de funciones termodinámicas de exceso, que permiten estudiar de forma cuantitativa las desviaciones del sistema en estudio con respecto al esperado si tuviese un comportamiento ideal. Una primera aproximación al comportamiento de una mezcla multicomponente se puede hacer mediante la aplicación de la ley de aditividad de las áreas. La aplicación de esta regla permite poner de manifiesto diferencias en el área ocupada por molécula en los sistemas mixtos (Gaines 1966). Si la monocapa mixta se comporta de forma ideal:

$$A_{1,2}^{ideal} = X_1 A_1 + X_2 A_2 \quad \text{Ecuación 9}$$

Por lo tanto, en un sistema formado por una mezcla de dos componentes (1 y 2), el área ocupada en cada momento ($A_{1,2}$) debería ser la suma de áreas ocupadas por cada componente por separado (A_1 y A_2) teniendo en cuenta el porcentaje en el que participan en la mezcla (fracción molar, X_1 y X_2). Es importante tener en cuenta que esta expresión además de cumplirse cuando el sistema se comporta de forma ideal, también lo hace cuando existe inmiscibilidad entre los componentes (Muñoz y col. 1999).

El área de exceso, A_{exc} , es la magnitud resultante de comparar el valor real de área ocupada por la mezcla, $A_{1,2}$, con el esperado si ésta se comportase de manera ideal.

$$A_{exc} = A_{1,2} - A_{1,2}^{ideal} \quad \text{Ecuación 10}$$

Si los valores de A_{exc} correspondientes a las diferentes mezclas se desvían del valor cero, significa que existen desviaciones del comportamiento ideal, que son tanto más acusadas cuanto mayor es la desviación. Cuando $A_{exc} < 0$, las interacciones entre los componentes son de naturaleza atractiva, de modo que las atracciones moleculares son más intensas que las que se producirían si se comportasen de forma ideal, en cuyo caso serían iguales a las de los componentes puros. Por el contrario, valores de $A_{exc} > 0$ indican predominio de repulsiones entre los componentes o que las atracciones entre ellos cuando están mezclados son inferiores a las existentes entre los componentes puros.

Además del área de exceso, otro parámetro útil para el estudio de los sistemas multicomponente es la variación de energía libre de exceso, ΔG_{exc} . Siguiendo la metodología de Goodrich (1957) se llega a la expresión:

$$\Delta G_{exc} = N \int_{\pi^*}^{\pi} (A_{1,2} - X_1 A_1 - X_2 A_2) d\pi \quad \text{Ecuación 11}$$

donde N es el número de Avogadro, π la presión superficial, A_1 , A_2 y $A_{1,2}$ son las áreas superficiales de los componentes puros y de la mezcla, respectivamente, y X la fracción molar.

Al igual que en la ley de la aditividad de las áreas, si los valores de ΔG_{exc} correspondientes a las diferentes mezclas se desvían del valor cero, existen desviaciones del comportamiento ideal. Cuando $\Delta G_{exc} < 0$, las interacciones entre los componentes son más favorables que las existentes si se comportasen de forma ideal, en cuyo caso serían iguales a las de los componentes puros. Por el contrario, valores de $\Delta G_{exc} > 0$ indican una interacción desfavorable entre componentes o que las interacciones entre ellos cuando están mezclados son inferiores a las existentes entre los componentes puros.

4.3.3 Mezclas simvastatina-poloxámeros

En la Figura 36 se muestran las isotermas de las mezclas de simvastatina con poloxámeros. De manera general, a medida que aumenta la proporción de simvastatina en la mezcla, para un mismo valor de área se registran presiones más bajas. En lo que se refiere al perfil de las isotermas, los de las mezclas F87-SV y F127-SV difieren de los de las isotermas de sus correspondientes componentes puros, resultando menos evidente la meseta. En las mezclas P123-SV, la forma de las isotermas no cambia sustancialmente al incrementar la proporción de estatina.

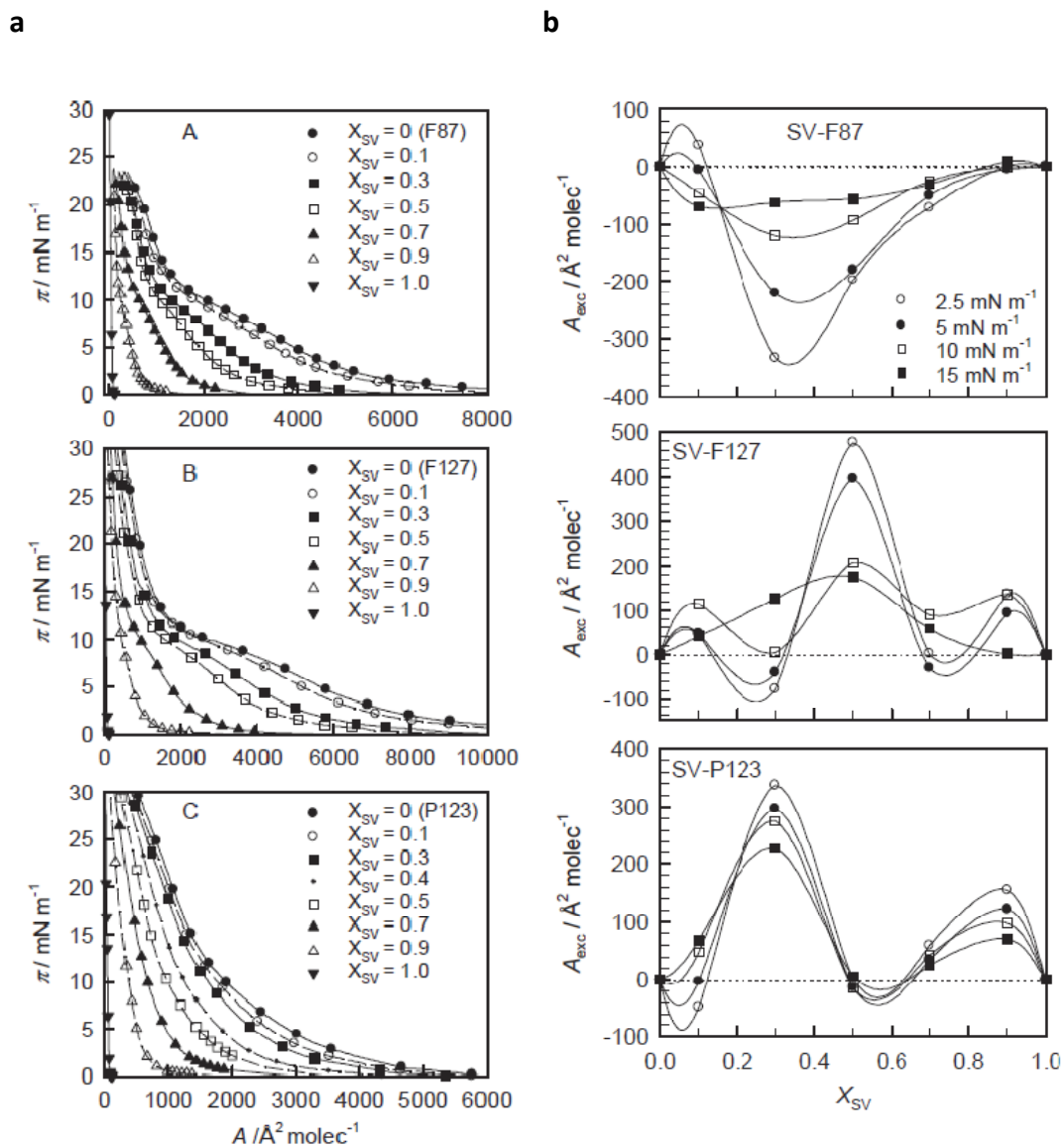


Figura 36. Monocapas mixtas de simvastatina con poloxámeros (a) y áreas de exceso estimadas para las mezclas de poloxámeros con simvastatina (b).

Para evaluar la miscibilidad de los componentes, se analizaron las áreas de exceso de las mezclas. Los sistemas F127-SV y P123-SV mostraron áreas de exceso positivas mientras que con la mezcla F87-SV se observó el efecto opuesto (Figura 36). El área de exceso de esta última mezcla, F87-SV, mostró un mínimo para fracciones molares de simvastatina comprendidas entre 0.3-0.5, que resultó especialmente marcado a bajas presiones (π : 2.5 y 5 mN/m). Por el contrario, la representación del área de exceso para la mezcla F127-SV, mostró desviaciones positivas a X_{sv} 0.5 y, de menor intensidad, a X_{sv} 0.9. La mezcla P123-SV se desvió del comportamiento ideal a X_{sv} 0.3 y X_{sv} 0.9. Estos resultados revelan que los distintos polímeros interactúan de manera muy diferente con las moléculas del fármaco en la interfase. Este hecho se explica por las diferencias en la relación EO/PO, que pueden afectar a las transiciones conformacionales en la interfase. Para caracterizar las interacciones entre los copolímeros y la simvastatina desde un punto de vista termodinámico, se estimó la energía libre de exceso de las monocapas mixtas. Los sistemas F127-SV y P123-SV mostraron desviaciones positivas de ΔG_{exc} , revelando que las interacciones entre la estatina y los copolímeros son menos favorables que las interacciones SV-SV y copolímero-copolímero. La magnitud de las desviaciones fue similar en ambos casos. Este hecho pone de manifiesto que la simvastatina interactúa con ambos polímeros de forma análoga. Dado que el F127 y el P123 difieren en el número de unidades EO y cuentan con un número similar de unidades PO, el grupo hidrófobo parece ser el responsable de la interacción con la simvastatina.

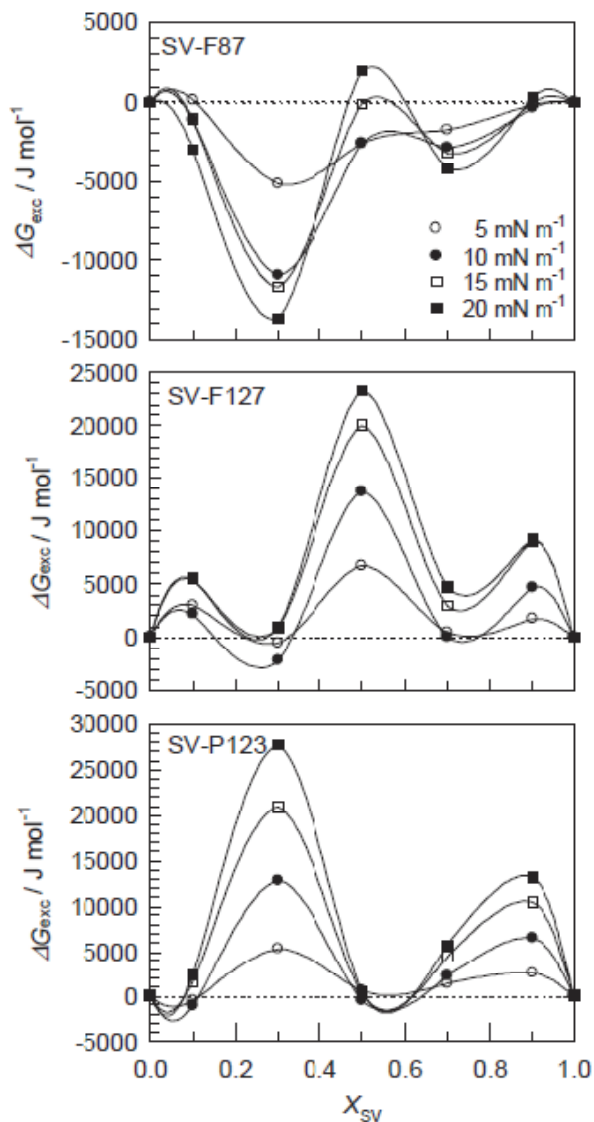


Figura 37. Energía libre de exceso estimada para las mezclas de poloxámeros-SV.

La mezcla F87-SV mostró desviaciones negativas de ΔG_{exc} , lo que indica que la interacción entre el F87 y la simvastatina es más favorable que la que se produce entre los componentes puros por separado. El F87 presenta un bloque PO más corto que el F127 y el P123. Probablemente, el factor determinante para la compatibilidad en la interfase entre estos componentes sea la orientación favorable de las regiones hidrofóbicas de los dos componentes, el polímero y la

simvastatina, como se ha postulado previamente para mezclas de otras sustancias macromoleculares y moléculas de pequeño peso molecular (Grainger y col. 2002). Sin embargo, en el caso de los poloxámeros, parece necesario que el balance hidrofilia/lipofilia (HLB) resulte adecuado para que la simvastatina se pueda intercalar entre los unímeros. La interacción entre el F87 y la simvastatina produce una reducción del área ocupada por molécula (fuerzas atractivas) que va acompañada de desviaciones negativas de ΔG_{exc} . Este comportamiento se traduce en una mayor estabilidad de la monocapa de la mezcla con respecto a las de los componentes por separado. En cambio, en las monocapas de las mezclas F127-SV y P123-SV se evidencia una repulsión entre los componentes, con un incremento del área ocupada por molécula que se refleja en valores positivos de ΔG_{exc} . En resumen, estos resultados sugieren que la simvastatina tiene mayor tendencia a intercalarse entre los unímeros de F87 que entre los unímeros de F127 y P123. De hecho, en las imágenes obtenidas por microscopía de ángulo de Brèwster (BAM) se observó un aumento en el número de dominios brillantes en la monocapa de la mezcla F87-SV.

Las observaciones por microscopía BAM de las monocapas de poloxámeros no mostraron cambios durante la compresión hasta π : 17 mN/m. Por encima de esta presión, se empiezan a detectar estructuras aisladas en las monocapas del F87 y del F127. A medida que aumenta la presión, el número de dominios brillantes se incrementa hasta condensarse de manera uniforme justo antes del colapso. La distancia entre dominios se reduce al aumentar la presión, manteniéndose prácticamente constante su tamaño.

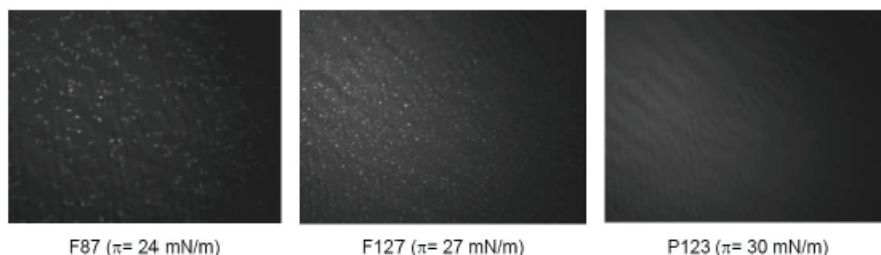


Figura 38. Imágenes BAM de monocapas de Pluronic® F87, F127 y P123.

Las observaciones con el F127 y F87 fueron coherentes con las imágenes BAM descritas previamente para copolímeros con largas cadenas PEO como el poliestireno-PEO (Muñoz y col. 1999). Por el contrario, las monocapas de P123 no mostraron ningún dominio con mayor brillo, visualizándose como un campo uniforme durante todo el proceso de compresión. Las imágenes BAM del P123 fueron similares a las publicadas para copolímeros con cadenas PEO relativamente cortas (Faure y col. 1999). Las diferencias en el comportamiento de los copolímeros se justifican por los cambios conformacionales necesarios para el movimiento de los bloques PEO desde la interfase a la subfase.

4.3.3.4 Mezclas simvastatina-poloxaminas

Las isothermas π -A de las monocapas mixtas poloxaminas-SV (Figura 39) fueron similares a las encontradas para los poloxámeros. La poloxamina con el contenido más alto en unidades EO, el T1307, es la única que presenta una meseta en la isoterma π -A cuando se aumenta la presión. Como ocurre en el caso de los poloxámeros F87 y F127, esta meseta desaparece progresivamente a medida que se incrementa la proporción de simvastatina en las mezclas.

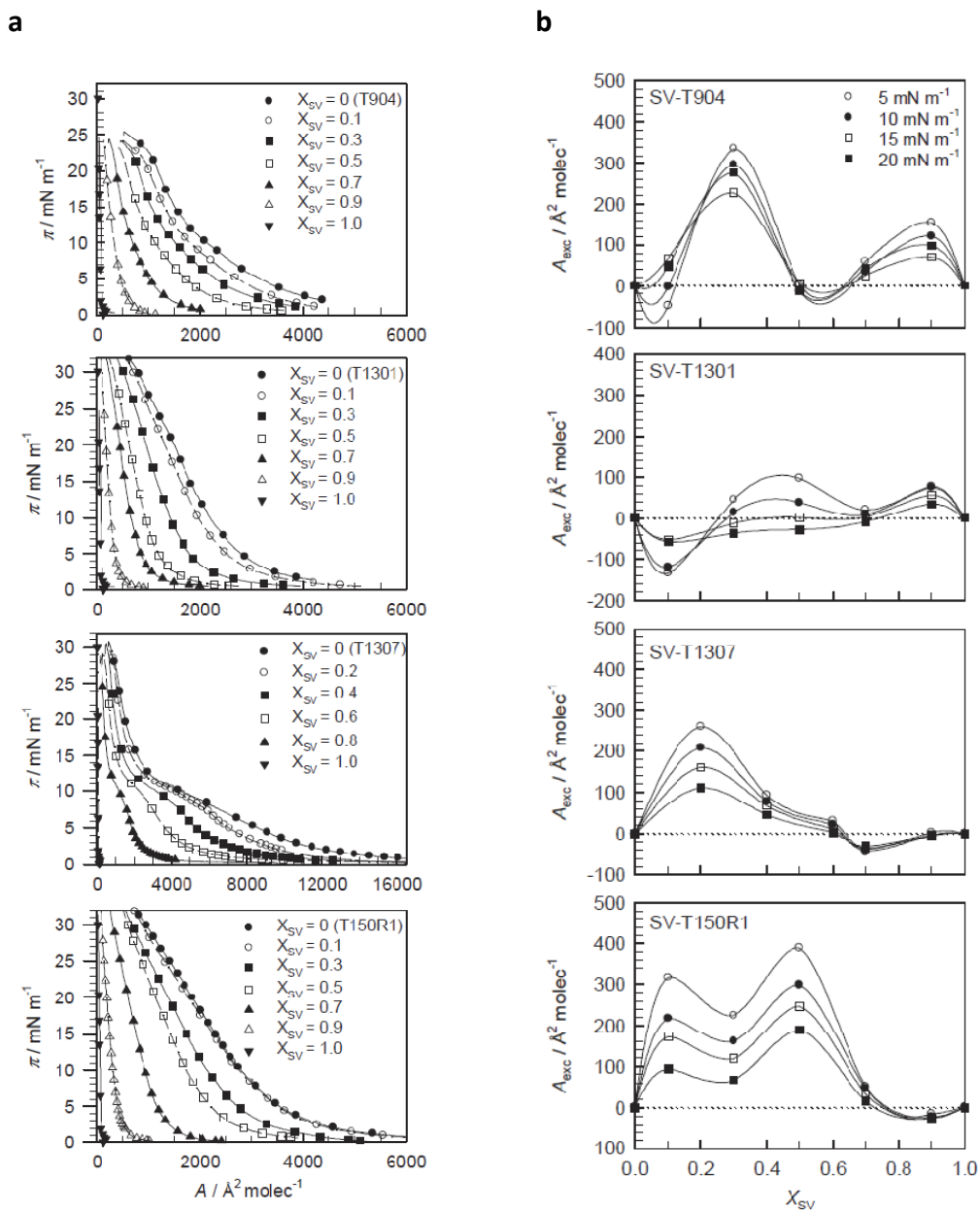


Figura 39. Monocapas mixtas de simvastatina con poloxaminas (a) y áreas de exceso estimadas para las mezclas de poloxaminas-SV (b).

En cuanto al A_{exc} , todas las variedades de las poloxaminas mostraron desviaciones positivas similares (Figura 39). Las monocapas mixtas de T1307 o T150R1 también presentaron valores de ΔG_{exc} positivos para cualquier proporción de simvastatina (Figura 40). En cambio, en las monocapas mixtas de T904 –SV se observó un mínimo en ΔG_{exc} para X_{sv} 0.1 a cualquier presión, e imágenes BAM con numerosos núcleos brillantes (Figura 41). El sistema T1301-SV sólo exhibió desviaciones negativas de ΔG_{exc} para X_{sv} 0.6 a altas presiones. Las diferencias entre las variedades de las poloxaminas siguen la misma tendencia que entre los poloxámeros; es decir, cuando el copolímero tiene un número relativamente alto de unidades PO, las interacciones copolímero-copolímero son termodinámicamente más favorables que en el sistema copolímero-simvastatina.

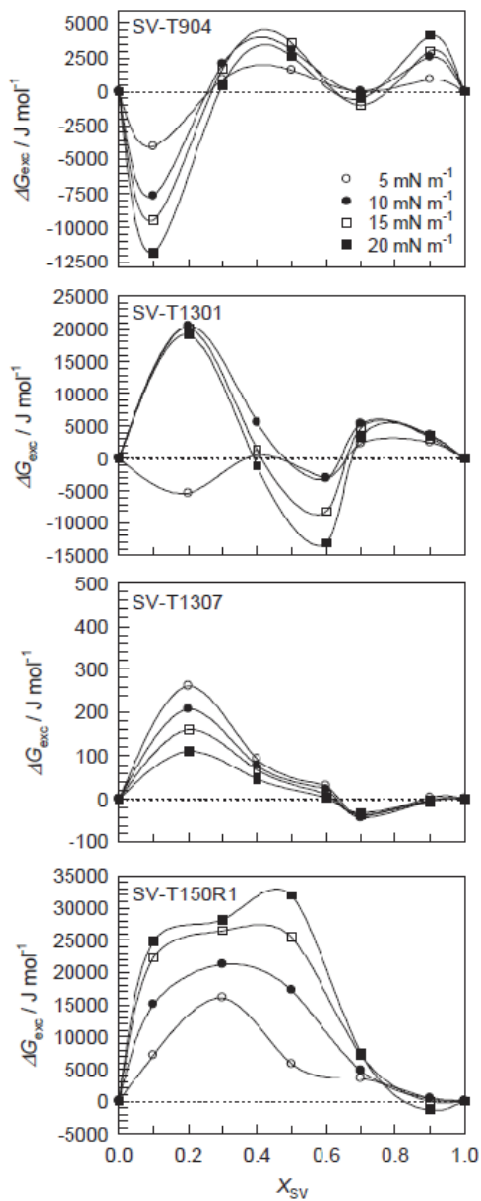


Figura 40. Energía libre de exceso estimada para las mezclas de poloxamina-SV.



Figura 41. Imágenes BAM de mezclas poloxamina-SV.

El análisis global de las interacciones en la interfase reveló que la intercalación del fármaco entre los unímeros es más favorable en el caso del Pluronic® F87 y del Tetronic® 904 que con el resto de copolímeros. La intercalación puede alterar significativamente las interacciones hidrofóbicas

entre unidades PO, que son las principales responsables del proceso de autoagregación de los unímeros para formar las micelas. Si las interacciones se modifican, cabe esperar que se produzcan cambios relevantes en la eficacia de las micelas para solubilizar fármacos. Además, la magnitud de las interacciones SV-PO pueden afectar a la estabilidad física de las micelas. Teniendo en cuenta que los bloques PPO son los responsables de formar los núcleos micelares, la interacción del fármaco con las unidades PO puede inducir la desestabilización de los núcleos y, consecuentemente, de las micelas. Paradójicamente, estos fenómenos podrían afectar negativamente a la capacidad de las micelas para solubilizar el fármaco. Para contrastar esta hipótesis se evaluó la capacidad de las micelas de Pluronic® y de Tetronic® para solubilizar simvastatina y proteger su grupo lactona, y se analizó la estabilidad física de las micelas cargadas.

4.4 Capacidad de solubilización de simvastatina

Para definir la capacidad de los sistemas poliméricos para solubilizar la simvastatina se utilizaron los siguientes descriptores (Rangel-Yagui y col. 2005):

- a) **Capacidad de solubilización molar, χ** , que se define como el número de moléculas de fármaco solubilizadas por cada mol de copolímero en estado micelar,

$$\chi = \frac{S_{total} - S_{agua}}{C_{copolimero} - CMC}$$

- b) **Coefficiente de partición micela-agua, P**, que se calcula para una concentración determinada de copolímero, como el cociente entre las concentraciones de fármaco en la micela y en el medio acuoso circundante,

$$P = \frac{S_{total} - S_{agua}}{S_{agua}}$$

- c) **Energía libre de solubilización**, que se estima a partir del coeficiente de reparto micela-agua en una disolución 1M de copolímero,

$$\Delta G_S^0 = -RT \ln \frac{\chi(1 - CMC)}{S_{agua}}$$

- d) **Capacidad de solubilización** o masa de fármaco solubilizada por unidad de masa de bloque hidrofóbico,

- e) **Número de moléculas de soluto solubilizadas por micela**,

$$n_s = \frac{(S_{total} - S_{agua}) \cdot N_A}{n_m}$$

siendo n_m el número de micelas por litro de disolución, estimado aplicando la expresión:

$$n_m = \frac{(C_{copo\ lim\ ero} - CMC) \cdot N_A}{N}$$

En estas expresiones, S_{total} y S_{agua} representan la solubilidad molar total del fármaco en el medio micelar y el medio acuoso, respectivamente, $C_{copolímero}$ es la concentración molar de copolímero, N_A el número de Avogadro y N el número de agregación. Como por encima de la CMC la concentración de unímero es prácticamente constante e

igual a la CMC, la concentración de copolímero en forma de micelas se puede estimar como $C_{\text{copolímero}} - \text{CMC}$.

Polímero (4%)	χ	P	ΔG_s^0 (cal/mol)	f_{micela}^a	SV/PO (mg/g)	Relación ^b L/H
F127	1.30E-01	1.5	-5306.6	0.96	15	1.2:1
F87	4.00E-03	1.5	-3245.3	0.59	0.8	0.8:1
P123	2.30E-02	210	-5644.5	0.99	42	1.2:1
T304	12.8E-03	9.32	-3927.5	0.90	2.73	0:1
T901	4.01E-03	1.69	-3245.7	0.63	0.33	0.2:1
T904	2.10E-03	100	-2871.5	0.99	0.21	0:1
T908	7.81E-03	0.38	-3641.5	0.28	0.21	0.2:1
T1107	12.6E-03	1.51	-3923.3	0.60	0.87	0:1
T1107met	20.9E-03	3.49	-4418.1	0.77	1.99	1.5:1
T1301	3.79E-01	100	-5940.0	0.99	20.1	20:1
T1307	22.0E-03	2.2	-4255.1	0.69	1.32	8:1
T150R1	1.71E-01	47.5	-5469.8	0.98	9.90	7.5:1

a: fracción de fármaco solubilizada por incorporación a la micela. b: una disolución de simvastatina en la fase móvil muestra una relación lactona/hidroxiácido 1:0.

Tabla 14. Descriptores de la eficacia de solubilización de la simvastatina en dispersiones de polímeros al 4% en HCl 10 mM y relación entre las formas lactona/hidroxiácido de la simvastatina en disoluciones de polímero al 10% en HCl 10 mM.

En la Figura 42 y en la Figura 43 se muestra la dependencia de la capacidad de solubilización de los distintos poloxámeros y poloxaminas evaluados, respecto de la concentración de copolímero.

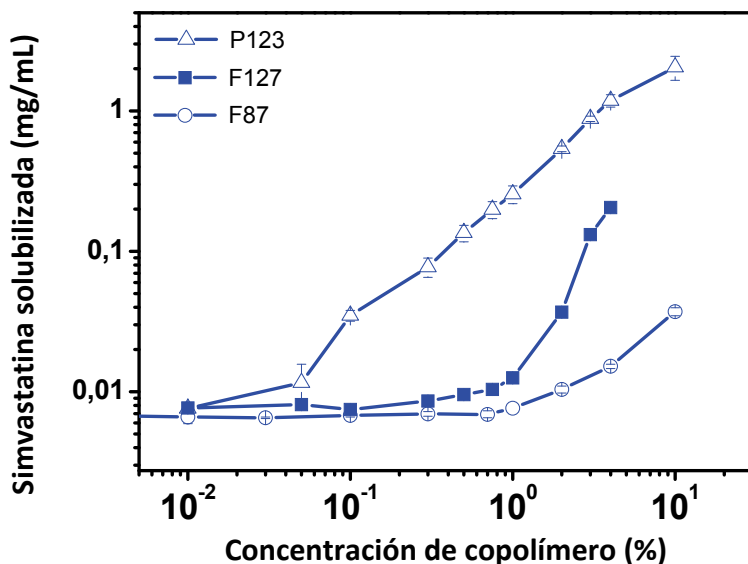


Figura 42. Solubilidad de la simvastatina en disoluciones de poloxámeros.

El poloxámero con mayor capacidad de solubilización es el P123 (1.18 mg/mL cuando la concentración es 4 mM) seguido del F127 (0.44 mg/mL cuando la concentración es 4 mM). El F87 presentó valores de solubilidad relativamente bajos con respecto a los dos polímeros anteriores (0.02 mg/mL). Se observa una cierta correlación entre los perfiles de solubilidad y los valores de HLB y CMC estimados por tensión superficial. La mayor capacidad de solubilización corresponde al copolímero con HLB y CMC más bajos.

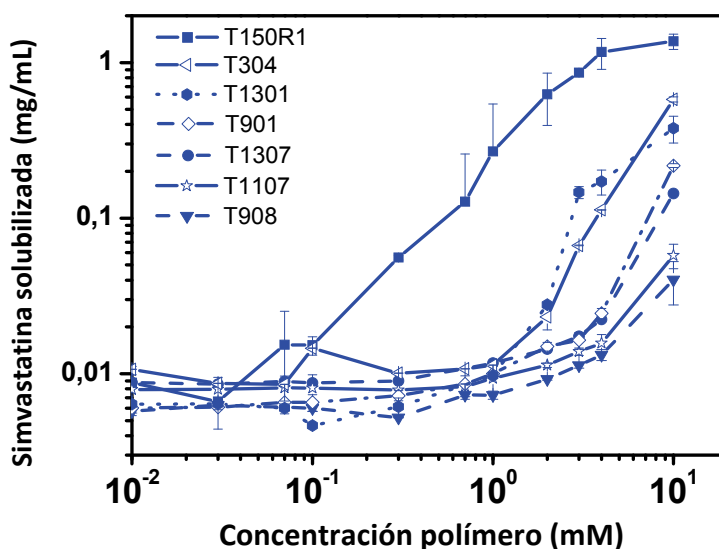


Figura 43. Solubilidad de la simvastatina en disoluciones de poloxaminas.

Todas las poloxaminas – en especial el T1301 y el T150R1- a concentraciones superiores a la CMC incrementaron de forma notable la solubilidad aparente de la SV. Las marcadas diferencias entre la capacidad de solubilización de las distintas poloxaminas se explican por sus diferentes relaciones EO/PO. El T1301 y el T150R1 presenta una alta actividad superficial y dan lugar a los núcleos micelares más hidrofóbicos. Estas dos propiedades determinan la capacidad de cada polímero para humectar la superficie de las partículas de fármaco y para albergarlo en el núcleo micelar. En términos cuantitativos, las dispersiones al 10% de T901, T904, T908, T1107, met-T1107, T1301, T1307 y T150R1 aumentan la solubilidad de la simvastatina en un factor de 3.7, 8.5, 2.4, 4.7, 8.3, 391, 21 y 152, respectivamente.

Los valores de los descriptores de la eficacia de solubilización indican que la incorporación a las micelas es particularmente eficaz en el caso del P123, T1301 y T150R1, que mostraron coeficientes de reparto de hasta 210, 100 y 47.5,

respectivamente. Estos resultados están en concordancia con la mayor hidrofobicidad de P123, T1301 y T150R1 y sugieren la necesidad de que se establezcan interacciones hidrofóbicas PO-PO intensas para formar micelas capaces de alojar el fármaco.

La solubilidad relativamente alta en las dispersiones de T304 (39 veces la solubilidad intrínseca del fármaco) se explica no sólo por la carga en las micelas, que previsiblemente es poco eficaz a la vista de los datos de autoagregación mostrados anteriormente, sino también por el incremento en el pH del medio que produce este copolímero, que puede facilitar la transformación de la forma lactónica de la SV en una sal de la forma hidroxilada. A este respecto, se ha descrito una interacción de la SV con resinas catiónicas, que sugiere que podría formarse una sal soluble del hidroxilado con la poloxamina T304. Además, la forma aniónica de la SV es más soluble que la forma lactónica y que el hidroxilado libre (Ellison y col. 1993). Por lo tanto, la ionización de la SV y su interacción electrostática con el T304 explican el marcado incremento de solubilidad. Por otra parte, al comparar el T1107 con su derivado metilado, se observa que met-T1107 es un solubilizante más eficaz, posiblemente por la creación de un microentorno más ácido en el núcleo micelar.

Es interesante destacar que el número de moléculas de simvastatina que interacciona con cada grupo PO en las micelas es bastante bajo (en comparación con las relaciones molares utilizadas en los estudios de las monocapas aire-agua), lo que indica que el número de puntos de interacción en las micelas es considerablemente menor, debido a la participación de la mayor parte de los grupos PO en el proceso de autoagregación. Por lo tanto, para comparar el comportamiento en la interfase aire-agua, con el comportamiento en las disoluciones micelares, hay que prestar atención a los eventos que tienen lugar

en las monocapas mixtas a bajos valores de X_{SV} . A este respecto, el Pluronic® F87 y el Tetronic® T904, que mostraron interacciones favorables en la interfase, resultaron ser los que presentaron menor capacidad para solubilizar simvastatina. Esto indica que, cuanto más intensas son las fuerzas atractivas SV-copolímero, mayor es la distorsión del ordenamiento de los unímeros cuando se forman las micelas. Las micelas más perturbadas no pueden solubilizar el fármaco en la misma medida en que lo hacen las menos perturbadas. El efecto negativo de la intercalación de las moléculas de fármaco entre los bloques PPO de los unímeros recuerda a las alteraciones provocadas en las membranas celulares por ciertos copolímeros con alta afinidad por algunos de sus componentes (Amado y col. 2008).

4.5 Estabilidad química de la simvastatina y estabilidad física de las micelas

La inclusión de un fármaco en micelas poliméricas puede favorecer su estabilización química protegiéndolo frente a las variables adversas del medio. Por otra parte, el fármaco puede alterar la estabilidad física de la micela, llegando incluso a causar su desagregación (Kataoka y col. 2001). La estabilidad de las micelas frente a la dilución constituye un aspecto clave para su utilidad como transportadores de fármacos. Una liberación prematura puede dar lugar a problemas de precipitación y degradación y a que se dificulte el acceso del fármaco al lugar de acción (Kabanov y Alakhov 2002).

En el caso de la simvastatina, tiene una gran trascendencia práctica conocer si el fármaco alojado en el medio micelar se mantiene en forma lactona (hidrofóbica) o se ha hidrolizado a la forma hidroxilada (hidrofílica). Los análisis de HPLC de las disoluciones micelares preparados con copolímero al 10% (pH 2.5), que se llevaron a cabo transcurridos 15 y 60 días desde su preparación,

indicaron que la forma lactona predomina en los sistemas micelares de los copolímeros con los bloques PPO más largos (Tabla 14). No se detectó ninguna influencia del tiempo sobre la relación lactona/forma hidroxilácida dentro del período evaluado. Los coeficientes de reparto de las formas lactona e hidroxilácida de la simvastatina a pH 5 se estimaron previamente en 53800 y 4200, respectivamente (Serajuddin y col. 1991). Los núcleos de las micelas de T1301, T1307 y T150R1, que son los más hidrofóbicos, pueden alojar las especies lactona y protegerlas eficazmente frente a la hidrólisis causada por el entorno acuoso ácido circundante. El radio relativamente mayor de los núcleos micelares de T1301 (Tabla 12) explica su mayor capacidad para cargar y proteger la forma lactona.

Comparativamente con las poloxaminas, F87, F127 y P123 mostraron mayor capacidad de protección que T304, T901, T904, T908 y T1107, pero fueron menos eficaces que T1301, T1307 y T150R1. Esto sugiere que la estabilización de la forma lactona está directamente relacionada con el número de unidades PO, mientras que no se encontró correlación con el número de unidades EO. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que los núcleos fuertemente hidrofóbicos son más adecuados para formar micelas capaces de alojar la forma lactona de la simvastatina, protegiéndola de las condiciones ambientales adversas, y sugieren que las moléculas de simvastatina se localizan preferentemente en la interfase núcleo-corona cerca del núcleo PPO sin interferir en su conformación.

Finalmente, se evaluó la estabilidad física de las micelas cargadas de fármaco frente a una dilución brusca e intensa (1:26) a 37°C, que condujo a concentraciones de copolímero próximas o inferiores a la CMC. El registro de la absorbancia frente al tiempo (Figura 44 y Figura 45) permitió seguir la evolución de la solubilidad del fármaco. Las poloxaminas que se mostraron más sensibles al

efecto de la dilución, desestructurándose sus micelas rápidamente, fueron el T901, T904, T908 y T1107. Las más estables resultaron ser las formadas por el met-T1107y T1307. Los sistemas micelares formados por T304, T1301 y T150R1 mostraron una estabilidad intermedia, reteniendo el 62%, 66% y 59% de la simvastatina disuelta, respectivamente, al cabo de 1 hora. En resumen, las poloxaminas de mayor peso molecular y mayor relación PO/EO (T1301 y T150R1) son las más adecuadas para solubilizar y proteger a la simvastatina en la forma lactona incluso aunque se vean afectados por una cierta desestabilización frente a la dilución. El T1307 combina una notable eficacia para proteger la forma lactona y una elevada resistencia de las micelas frente a la dilución, debido al efecto estabilizador de su corona de PEO. Un fenómeno similar se observó con el T1107.

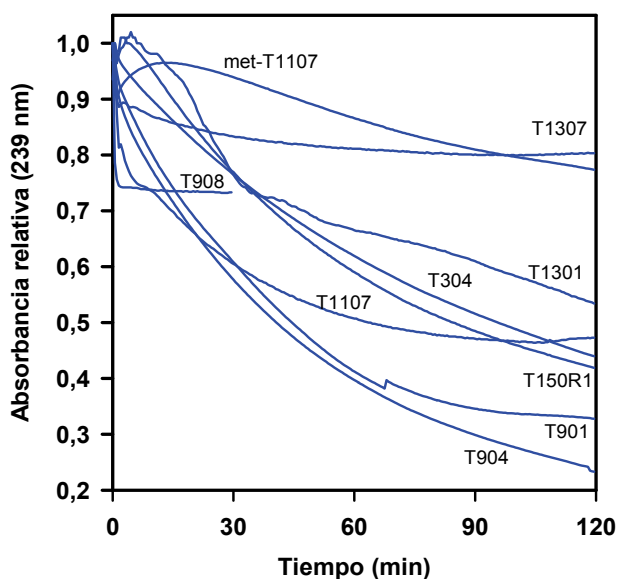


Figura 44. Efecto de la dilución sobre la solubilidad de SV en sistemas micelares de poloxaminas.

En lo que se refiere a los poloxámeros, las micelas de F127 y P123 apenas se ven afectadas por los fenómenos asociados a la dilución rápida, manteniendo la misma cantidad de simvastatina solubilizada durante 120 min. En cambio, la dilución condujo a una progresiva rotura de las micelas de F87 y consecuentemente, a una apreciable insolubilización de la simvastatina que contienen.

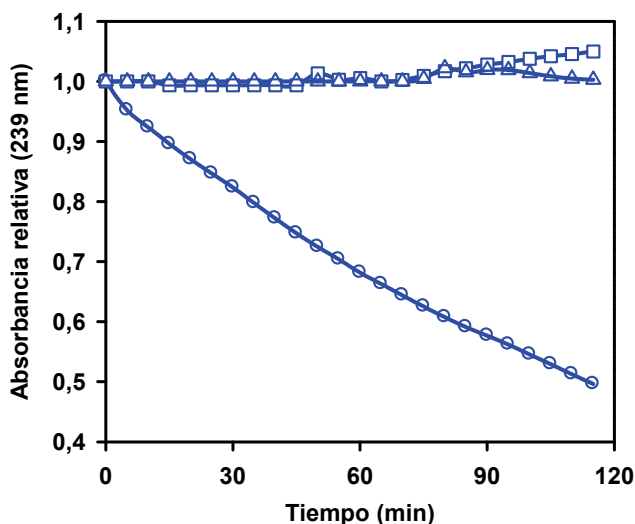


Figura 45. Efecto de la dilución sobre la solubilidad de la SV en sistemas micelares de poloxámeros.

En su conjunto estos resultados revelan que, desde un punto de vista cinético, los polímeros con bloques PPO y PEO largos dan lugar a las micelas con mayor capacidad para prevenir la descarga prematura del fármaco una vez que se produzca la dilución en los fluidos corporales. Este hecho está relacionado con la localización preferente del fármaco en la interfase núcleo-corona de las micelas. Las interacciones hidrofóbicas PO-PO permiten que la micela resistan la dilución. Además, es necesario que se alcance un balance adecuado entre las interacciones PPO-SV y la longitud de los segmentos PEO, para que el fármaco se

pueda cargar en las micelas y que éstas regulen su cesión. Las interacciones PPO-SV deben promover el alojamiento del fármaco sin dificultar significativamente la autoagregación del copolímero. Los segmentos PEO próximos al núcleo, que presentan una movilidad reducida (Amado y col. 2008), deben contribuir a dificultar la difusión del fármaco situado entre el núcleo (PPO) y la corona (PEO).

5 Conclusiones

Los resultados de los estudios dirigidos a profundizar en el conocimiento de los fenómenos de agregación de las poloxaminas en la interfase aire-agua y en medio acuoso para poder establecer similitudes y diferencias con los poloxámeros, y evaluar comparativamente su potencial como agentes hidrosolubilizantes de fármacos hidrofóbicos, han permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. Las propiedades de agregación (micelización y gelificación) de las poloxaminas dependen fuertemente del pH y la fuerza iónica del medio, dentro del intervalo de valores fisiológicos de estas variables. La influencia sobre el comportamiento de los poloxámeros es mucho menos relevante. Cuando el pH del medio es menor que el pK_{a1} , el grupo etilendiamino central de las poloxaminas se encuentra diprotonado, provocando la repulsión entre unímeros y dificultando la micelización y la transición de sol a gel.
2. El peso molecular y el HLB de las poloxaminas son determinantes para su comportamiento en la interfase aire-HCl 10 mM y en dispersión acuosa. A bajas presiones, cuanto mayor es el tamaño del bloque PEO, mayor es el área por molécula en la interfase. Por el contrario, la longitud del bloque PPO determina el área ocupada en el estado condensado. Las poloxaminas que presentan una relación PO/EO alta y un peso molecular elevado (T1301 y T150R1) dan lugar a micelas con núcleos de mayor tamaño y altamente hidrofóbicos. Las características del núcleo son determinantes de la capacidad de la micela para albergar moléculas hidrofóbicas y proteger grupos funcionales lábiles, tales como el anillo lactónico de la simvastatina.

3. Las micelas más estables frente a la dilución son las constituidas por poloxaminas de elevado peso molecular, con largos bloques PPO (entre 23-29 unidades) como los Tetronic[®] T1301, T1307 y T150R1.
4. El análisis conjunto de las isothermas π -A de las monocapas mixtas y los datos de solubilidad y estabilidad de simvastatina en disolución micelar reveló el establecimiento de interacciones atractivas en la interfase aire-agua con los unímeros que cuentan con bloques PPO relativamente cortos, tanto de Pluronic[®] como de Tetronic[®]. Estas interacciones hacen que las micelas presenten una baja capacidad de solubilización de simvastatina, resulten menos eficaces en la protección del fármaco frente a la degradación y menos resistentes frente a la dilución extrema. Una elevada afinidad del fármaco por los unímeros hace que éste se intercale entre los segmentos PPO a nivel del núcleo micelar, provocando la desestabilización de la micela. Por el contrario, la expulsión de las moléculas de fármaco del núcleo que forman los segmentos largos de PPO permite que se formen micelas más estables, que albergan el fármaco predominantemente en la interfase núcleo-corona y lo protegen eficazmente frente a la degradación. Por lo tanto, el análisis de las isothermas π -A podría utilizarse como herramienta predictiva de la capacidad de las micelas para albergar fármacos y evitar su liberación prematura cuando experimenten una dilución intensa en medio acuoso.

6 Bibliografía

- Alakhov V.Y. y Kabanov A.V.** "Block copolymeric biotransport carriers as versatile vehicles for drug delivery" *Expert Opin. Inv. Drug.* 7: 1453-1473 (1998).
- Alakhov V.Y., Klinski E., Li S., Pietrzynski G., Venne A., Batrakova E.V., Bronitch T. y Kabanov A.V.** "Block copolymer-based formulation of doxorubicin. From cell screen to clinical trials" *Colloids Surf. B.* 16: 113-134 (1999).
- Alakhov V.Y., Moskaleva E.Y., Batrakova E.V. y Kabanov A.V.** "Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by Pluronic P85 block copolymer" *Bioconjugate Chem.* 7: 209-216 (1996).
- Alexandridis P., Athanassiou V., Fukuda S. y Hatton T.A.** "Surface activity of poly(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)-block-poly(ethylene oxide) copolymers" *Langmuir* 10: 2604-2612 (1994).
- Alexandridis P., Holzwarth J.F. y Hatton T.A.** "Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of topolymer association" *Macromolecules* 27: 2414-2425 (1994).
- Aliabadi H.M., Mostafa S., Dion B. y Afsaneh L.** "Disposition of drugs in block copolymer micelle delivery systems: from discovery to recovery" *Clin. Pharmacokinet.* 47: 619-634 (2008).
- Almgren M., Brown W. y Hvidt S.** "Self-aggregation and phase behavior of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymers in aqueous solution" *Colloid Polym. Sci.* 273: 2-15 (1995).
- Alvarez-Lorenzo C. y Concheiro A.** "Intelligent drug delivery systems: polymeric micelles and hydrogels" *Mini. Rev. Med. Chem.* 8: 1065-1074 (2008).
- Alvarez-Lueje A., Valenzuela C., Squella J.A. y Nuñez L.J.** "Stability study of simvastatin under hydrolytic conditions assessed by liquid chromatography" *AOAC Int.* 88: 1631-1636 (2005).
- Allen C., Maysinger D. y Eisenberg A.** "Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery" *Colloids Surf. B.* 16: 3-27 (1999).
- Amado E., Kerth A., Blume A. y Kressler J.** "Infrared reflection absorption spectroscopy coupled with Brewster angle microscopy for studying interactions of amphiphilic triblock copolymers with phospholipid monolayers" *Langmuir* 24: 10041-10053 (2008).
- Anderson B.C., Cox S.M., Bloom P.D., Sheares V.V. y Mallapragada S.K.** "Synthesis and characterization of diblock and gel-forming pentablock copolymers of tertiary amine methacrylates, poly(ethylene glycol), and poly(propylene glycol)" *Macromolecules* 36: 1670-1676 (2003).
- Ariga K., Lee M., Labuta J., Okamoto K. y Hill J.P.** "Studies on Langmuir monolayers of polyprenyl phosphates towards a possible scenario for origin of life " *Colloids Surf. B.* 74: 426-435 (2009).
- Armstrong J.K., Chowdhry B.Z., Snowden M.J., Dong J. y Leharne S.A.** "The effect of pH and concentration upon aggregation transitions in aqueous solutions of poloxamine T701" *Int. J. Pharm.* 229: 57-66 (2001).
- Bahadur P. y Pandya K.** "Aggregation behavior of Pluronic P-94 in water" *Langmuir* 8: 2666-2670 (1992).

- Balakrishnan A., Rege B.D., Amidon G.L. y Polli J.E.** "Surfactant-mediated dissolution: contributions of solubility enhancement and relatively low micelle diffusivity" *J. Pharm. Sci* 93: 2064-2075 (2004).
- Barreiro-Iglesias R., Alvarez-Lorenzo C. y Concheiro A.** "Microcalorimetric evidence and rheological consequences of the salt effect on carbopol-surfactant interactions" *Prog. Coll. Polym. Sci.* 122: 95-102 (2003).
- Barreiro-Iglesias R., Bromberg L., Temchenko M., Hatton T.A., Alvarez-Lorenzo C. y Concheiro A.** "Solubilization and stabilization of camptothecin in micellar solutions of pluronic-g-poly(acrylic acid) copolymers" *J. Control. Release* 97: 537-549 (2004).
- Barreiro-Iglesias R., Bromberg L., Temchenko M., Hatton T.A., Alvarez-Lorenzo C. y Concheiro A.** "Pluronic-g-poly(acrylic acid) copolymers as novel excipients for site specific, sustained release tablets " *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 26: 374-385 (2005).
- BASF C.** "Pluronic® F127 surfactant viscosity as a function of temperature and concentration" Technical Bulletins, consultada en abril de 2009, <http://www.basf.com>.
- BASF C.** "Pluronic" Technical Bulletins, consultada en diciembre de 2009, <http://www.basf.com>.
- BASF C.** "Tetronic" Technical Bulletins, consultada en diciembre de 2009, <http://www.basf.com>.
- BASF C.** "Pluronic basic grid", consultada en enero de 2010, <http://www.basf.com>.
- Batrakova E.V., Han H.Y., Miller D.W. y Kabanov A.V.** "Effects of Pluronic P85 unimers and micelles on drug permeability in polarized BBMEC and Caco-2 cells " *Pharm. Res.* 15: 1525-1532 (1998).
- Batrakova E.V. y Kabanov A.V.** "Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers" *J. Control. Release* 130: 98-106 (2009).
- Batrakova E.V., Lee S., Li S., Venne A., Alakhov V. y Kabanov A.** "Fundamental relationships between the composition of Pluronic block copolymers and their hypersensitization effect in MDR cancer cells " *Pharm. Res.* 16: 1373-1379 (1999).
- Batrakova E.V., Li S., Li Y., Alakhov V.Y., Elmquist W.F. y Kabanov A.V.** "Distribution kinetics of a micelle-forming block copolymer Pluronic P85" *J. Control. Release* 100: 389-397 (2004).
- Batrakova E.V., Miller D.W., Li S., Alakhov V.Y., Kabanov A.V. y Elmquist W.F.** "Pluronic P85 enhances the delivery of digoxin to the brain: in vitro and in vivo studies" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296: 551-557 (2001).
- Beom-Jin L., Tae-Sup L., Bong-Jin C., Soon-Hoe K. y Won-Bae K.** "Percutaneous absorption and histopathology of a poloxamer-based formulation of capsaicin " *Int. J. Pharm.* 159: 105-114 (1997).
- Bijsterbosch H.D., Haan V.O.d., Graaf A.W.d., Mellema M., Leermakers F.A.M., Stuart M.A.C. y Well A.A.V.** "Tethered adsorbing chains: neutron reflectivity and

- surface pressure of spread diblock copolymer monolayers" *Langmuir* 11: 4467-4473 (2002).
- Black D.M., Bakker-Arkema R.G. y Nawrocki J.W.** "An overview of the clinical safety profile of atorvastatin (Lipitor), a new HMG-CoA reductase inhibitor" *Arch. Intern. Med.* 158: 577-584 (1998).
- Booth C. y Attwood D.** "Effects of block architecture and composition on the association properties of poly(oxyalkylene) copolymers in aqueous solution" *Macromol. Rapid Com.* 21: 501-527 (2000).
- Bottford M.** "Safety and statins: pharmacologic and clinical perspectives" *Prev. Med. Manag. Care* 4: 30-37 (2004).
- Brown M.S. y Goldstein J.L.** "Multivalent feedback of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth" *J. Lip. Res.* 21: 505-517 (1980).
- Byeongmoon J., Han B.Y., Sung L.D. y Wan K.S.** "Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems" *Nature* 388: 860-862 (1997).
- Capel M.J. y Kreuter J.** "Effect of nonionic surfactants on transdermal drug delivery II. Poloxamer and poloxamine surfactants" *Int. J. Pharm.* 69: 155-167 (1991).
- Celso F.L., Triolo A., Triolo F., McClain J., Desimone J.M., Heenan R.K., Amenitsch H. y Triolo R.** "Industrial applications of the aggregation of block copolymers in supercritical CO₂: a SANS study" *Appl. Phys. A. Mater.* 74: 1427-1429 (2002).
- Cellesi F. y Tirelli N.** "A new process for cell microencapsulation and other biomaterial applications: thermal gelation and chemical cross-linking in "tandem"" *J. Mater. Sci-Mater. M.* 16: 559-565 (2005).
- Comai R. y Sullivan A.C.** "Antiobesity activity of pluronic L-101" *Int. J. Obesity* 4: 33-42 (1980).
- Chang L.C., Chang Y. y Gau C.S.** "Interfacial properties of Pluronic and the interactions between Pluronic and cholesterol/DPPC mixed monolayers " *J. Colloid Interface Sci.* 322: 263-273 (2008).
- Chang Y., Prange R., Allcock H.R., Lee S.C. y Kim C.** "Amphiphilic poly[bis(trifluoroethoxy)phosphazene]-poly(ethylene oxide) block copolymers: synthesis and micellar characteristics" *Macromolecules* 35: 8556-8559 (2002).
- Chen C., Even M.A. y Zhan Z.C.** "Detecting molecular-level chemical structure and group orientation of amphiphilic PEO-PPO-PEO copolymers at solution/air and solid/solution interfaces by SFG vibrational spectroscopy" *Macromolecules* 36: 4478-4484 (2003).
- Chiappetta D.A. y Sosnik A.** "Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs" *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66: 303-317 (2007).
- Davies J.T. y Rideal E.K.** *Interfacial phenomena*. 2^a Ed. Davies J. T. (Ed). Academic Press. New York (1963) p. 25.
- Dong J., Armstrong J., Chowdhry B.Z. y Leharne S.A.** "Thermodynamic modelling of the effect of pH upon aggregation transitions in aqueous solutions of the poloxamine T701 " *Thermochimica Acta* 417: 201-206 (2004).

- Dong J., Chowdhry B.Z. y Leharne S.A.** "Solubilisation of polyaromatic hydrocarbons in aqueous solutions of poloxamine T803" *Colloids Surf. A.* 246: 91-98 (2004).
- Dumitriu S., Popa M. y Dumitriu M.** "Review : polymeric biomaterials as enzyme and drug carriers Part V: polymeric matrices as drug delivery systems" *Bioact. Compat. Pol.* 5: 89-127 (1990).
- Ellison D.K., Moore W.D. y Petts C.R.** *Simvastatin*. En: Analytical profiles of drug substances and excipients. Brittain H. G. (Ed). Academic Press. San Diego (1993) p. 377.
- Faure M.C., Bassereau P., Lee L.T., Menelle A. y Lheveder C.** "Phase transitions in monolayers of PS-PEO copolymer at the air-water interface" *Macromolecules* 32: 8538-8550 (1999).
- Frohlich E.D.** "Promise of prevention and reversal of target organ involvement in hypertension" *J. Renin-Angio-Aldo. S.* 1: 2-7 (2001).
- Fukada H. y Takahashi K.** "Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride" *Proteins* 33: 159-166 (1998).
- Fusco S., Borzacchiello A. y Netti P.A.** "Perspectives on: PEO-PPO-PEO triblock copolymers and their biomedical applications" *Bioact. Compat. Pol.* 21: 149-164 (2006).
- Gadelle F., Koros W.J. y Schechter R.S.** "Solubilization of aromatic solutes in block copolymers" *Macromolecules* 28: 4883-4892 (1995).
- Gaines G.L.** *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*. Wiley InterScience (Ed). New York (1966) Pp. 144-151.
- Gaucher G., Dufresne M.H., Sant V.P., Kang N., Maysinger D. y Leroux J.C.** "Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery" *J. Control. Release* 109: 169-188 (2005).
- Grainger D.W., Sunamoto J., Akiyoshi K., Goto M. y Knutson K.** "Mixed monolayers and cast films of acyl ester and acylamino phospholipids" *Langmuir* 8: 2479-2485 (2002).
- Grant C.D., DeRitter M.R., Steege K.E., Fadeeva T.A. y Castner E.W.** "Fluorescence probing of interior, interfacial, and exterior regions in solution aggregates of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers" *Langmuir* 21: 1745-1752 (2005).
- Hadjichristidis N., Pispas S. y Floudas G.** *Block copolymers: synthetic strategies, physical properties and applications*. Wiley-Interscience (Ed). John Wiley & Sons, Inc. New Jersey (2003) Pp. 3-28.
- Haider D.G. y Bahestanian M.** "HMG-CoA reductase inhibitors/statins: an improval for patients suffering from peripheral vascular disease" *Z. Kardiol.* 11: 84-89 (2004).
- Hann R.A.** *Molecular structure and monolayers properties*. En: Langmuir-Blodgett Films. Roberts G. (Ed). Plenum Press. New York (1990) Pp. 18-23.
- Hannig J., Yu J., Beckett M., Weichselbaum T. y Lee R.C.** "Poloxamine 1107 sealing of radiopermeabilized erythrocyte membranes" *Int. J. Radiat. Biol.* 75: 379-385 (1999).

- Helfand E. y Wasserman Z.** "Block copolymer theory. 6. Cylindrical domains" *Macromolecules* 13: 994-998 (1980).
- Hong-Quan X. y Dong X.** "Molecular design, synthesis and properties of block and graft copolymers containing polyoxyethylene segments" *Prog. Polym. Sci.* 24: 275-313 (1999).
- Hunter R., Strickland F. y Kezdy F.** "The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants. I. The role of hydrophile-lipophile balance" *J. Immunol.* 127: 1244-1250 (1981).
- Iddon P.D. y Armes S.P.** "Synthesis of stimulus-responsive block copolymer gelators by atom transfer radical polymerisation" *Eur. Polym. J.* 43: 1234-1244 (2006).
- Irwin J.J., Beezer A.E., Mitchell J.C., Buckton G., Chowdhry B.Z., Eagland D. y Crowther N.J.** "Isothermal stability of dilute aqueous solutions of block copolymers of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene): a microcalorimetric study of Pluronic F87 and Pluronic F88" *J. Phys. Chem.* 97: 2034-2036 (2002).
- IUPAC.** IUPAC Compendium of Chemical Terminology (1997).
- Jackson A.J., Li P.X., Dong C.C., Thomas R.K. y Penfold J.** "Structure of partially fluorinated surfactant monolayers at the air-water interface" *Langmuir* 25: 3957-3965 (2009).
- Johnston T.P. y Miller S.C.** "Toxicological evaluation of poloxamer vehicles for intramuscular use" *J. Parenter. Sci. Technol.* 39: 83-89 (1985).
- Jones P., Kofonek S. y Laurora I.** "Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES Study)" *Am. J. Cardiol.* 81: 582-87 (1998).
- Kabanov A.V. y Alakhov V.Y.** "Pluronic® block copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers" *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 19: 1-72 (2002).
- Kabanov A.V., Batrakova E.V. y Alakhov V.Y.** "Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery" *J. Control. Release* 82: 189-212 (2002).
- Kabanov A.V., Batrakova E.V. y Miller D.W.** "Pluronic® block copolymers as modulators of drug efflux transporter activity in the blood-brain barrier" *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 151-164 (2003).
- Kabanov A.V., Nazarova I.R., Astafieva I.V., Batrakova E.V., Alakhov V.Y., Yaroslavov A.A. y Kabanov V.A.** "Micelle formation and solubilization of fluorescent probes in poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) solutions" *Macromolecules* 28: 2303-2314 (1995).
- Kallen J.** "Structural basis for LFA-1 inhibition upon lovastatin binding to the CD11a I-domain" *J. Mol. Biol.* 292: 1-9 (1999).
- Kataoka K., Harada A. y Nagasaki Y.** "Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance" *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47: 113-131 (2001).
- Katime I.** "Micelas" *Revista Iberoamericana de Polímeros* 4: 123-151 (2003).

- Kearney A.S., Crawford L.F., Mehta S.C. y Radebaugh G.W.** "The interconversion kinetics, equilibrium, and solubilities of the lactone and hydroxyacid forms of the HMG-CoA reductase inhibitor, CI-981" *Pharm. Res.* 10: 1461-1465 (1993).
- Kiss E., Keszthelyi T., Kormany G. y Hakkel O.** "Adsorbed and spread layers of poly (ethylene oxide)- poly (propylene oxide)- poly (ethylene oxide) block copolymers at the air-water interface studied by sum-frequency vibrational spectroscopy and tensiometry" *Macromolecules* 39: 9375-9384 (2006).
- Kozlov M.Y., Melik-Nubarov N.S., Batrakova E.V. y Kabanov A.V.** "Relationship between Pluronic Block Copolymer Structure, Critical Micellization Concentration and Partitioning Coefficients of Low Molecular Mass Solutes" *Macromolecules* 33: 3305-3313 (2000).
- Kwon G. y Kataoka K.** "Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles " *Adv. Drug Deliv. Rev.* 16: 295-309 (1999).
- Kwon G.S. y Okano T.** "Soluble self-assembled block copolymers for drug delivery" *Pharm. Res.* 16: 597-600 (1999).
- Leaf C.W.** "Toxicology of some non-ionic surfactants" *Soap Chem. Spec.* 43: 48 (1967).
- Lee Y.L., Dudek A., Ke T.N., Hsiao F.W. y Chang C.H.** "Mixed polyelectrolyte-surfactant Langmuir monolayers at the air/water interface" *Macromolecules* 41: 5845-5853 (2008).
- Li J.T., Caldwell K.D. y Rapoport N.** "Surface properties of Pluronic-coated polymeric colloids" *Langmuir* 10: 4475-4482 (1994).
- Li L., Lim L.H., Wang Q. y Jiang S.P.** "Thermoreversible micellization and gelation of a blend of pluronic polymers " *Polymer* 49 (2008).
- Lipinsky C.** "Poor aqueous solubility – an industry wide problem in drug discovery" *Am. Pharm. Rev.* 5: 82-85 (2002).
- Liu R.** *Water-insoluble drug formulation.* 2ª Ed. Liu R. (Ed). CRC Press. Boca Raton (2008).
- Lofberg M., Jankala H., Paetau A., Harkonen M. y Somer H.** "Metabolic causes of recurrent rhabdomyolysis" *Acta Neurol. Scand.* 98: 268-75 (1998).
- Loh W.** *Block and copolymer micelles.* En: Encyclopedia of Surface and Colloid Science. Somasundaran P. (Ed). Taylor and Francis. New York (2006) Pp. 1014-1025.
- Luo L. y Eisenberg A.** "Thermodynamic stabilization mechanism of block copolymer vesicles" *J. Am. Chem. Soc.* 123: 1012-1013 (2001).
- Mallick S., Pattnaik S. y Swain K.** "Current perspectives of solubilization: potential for improved bioavailability" *Drug Dev. Ind. Pharm.* 33: 865-873 (2007).
- Marino D.J.** "Evaluation of Pluronic polyol F127 as a vehicle for petroleum hydrocarbons in the salmonella/microsomal assay" *Environ. Mutagen.* 9: 307-316 (1987).
- Maron D.J., Fazio S. y Linton M.F.** "Current perspectives on statins" *Circulation* 101: 207-213 (2000).
- McGuinness B., Craig D., Bullock R. y Passmore P.** "Statins for the prevention of dementia " *Cochrane DB Syst. Rev.* Issue 2: Art.CD003160 (2009).
- Merret F.M.** "Interaction of polymerizing systems with rubber and its homologs. Polymerization of MMA and styrene" *Trans. Faraday Soc.* 50: 759-767 (1954).
- Moghim S.M. y Hunter A.C.** "Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine" *TIBTECH* 18: 412-420 (2000).

- Moghimi S.M., Muir I.S., Illum L., Davis S.S. y Kolb-Bachofen V.** "Coating particles with a block co-polymer (poloxamine-908) suppresses opsonization but permits the activity of dysopsonins in the serum" *Biochim. Biophys. Acta* 1179: 157-165 (1993).
- Moghimi S.M., Porter C.J., Muir I.S., Illum L. y Davis S.S.** "Non-phagocytic uptake of intravenously injected microspheres in rat spleen: influence of particle size and hydrophilic coating" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177: 861-866 (1991).
- Molau G.E.** *Colloidal and morphological behavior of block and graft copolymers*. En: Proceedings of an American Chemical Society Symposium Chicago 1970. Molau G. E. (Ed). Plenum Press. New York (1971) Pp. 79-106.
- Mondon K., Gurny R. y Moller M.** "Colloidal drug delivery systems - Recent advances with polymeric micelles" *CHIMIA* 62: 832-840 (2008).
- Munch M.R. y Gast A.P.** "Block copolymer adsorption: heads or tails?" *Polym. Commun.* 30: 324-326 (1989).
- Muñoz M.G., Monroy F., Ortega F., Rubio R.G. y Langevin D.** "Monolayers of symmetric triblock copolymers at the air-water interface. 1. Equilibrium properties" *Langmuir* 16: 1083-1093 (1999).
- Nadja G. y Goymann C.M.** "Physicochemical characterisation of a novel thermogelling formulation for percutaneous penetration of 5-aminolevulinic acid" *J. Pharm. Sci* 97: 2311-2323 (2008).
- Nagarajan R.** *Solubilization of hydrophobic substances by block copolymer micelles in aqueous solution*. En: Solvents and self-organization of polymer. Webber S. E., Munk P. and Tuzar Z. (Ed). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht (1996) Pp. 121-165.
- Nagarajan R. y Ganesh K.** "Block copolymer self-assembly in selective solvents: theory of solubilization in spherical micelles" *Macromolecules* 22: 4312-4325 (1989).
- Nalbandian R.M., Henry R.L., Balko K.W., Adams D.V. y Neuman N.R.** "Pluronic F-127 gel preparation as an artificial skin in the treatment of third-degree burns in pigs" *J. Biomed. Mater. Res.* 21: 1135-1148 (1987).
- Newman M.J., Balusubramanian M. y Todd C.W.** "Development of adjuvant-active nonionic block copolymers" *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32: 199-223 (1998).
- Nie T., Zhao Y., Xie Z. y Wu C.** "Micellar formation of poly(caprolactone-block-ethylene oxide-block- caprolactone) and its enzymatic biodegradation in aqueous dispersion" *Macromolecules* 36: 8825-8829 (2003).
- Nissen S, Tuzcu M, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA y al. e.** "Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis." *JAMA* 291: 1071-80 (2004).
- Nivaggioli T., Tsao B., Alexandridis P. y Hatton T.A.** "Microviscosity in Pluronic and Tetronic poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles" *Langmuir* 11: 119-126 (2002).
- O'Connor S.M., Gehrke S.H. y Retzinger G.S.** "Ordering of poly(ethylene oxide)/poly(propylene oxide) triblock copolymers in condensed films" *Langmuir* 15: 2580-2585 (1999).

- Oishi M. y Nagasaki Y.** "Block copolymer synthesis for nanoscale drug and gene delivery" *Nanotechnol. Drug Del.* 10: 35-67 (2009).
- Pandit N., Trygstad T., Croy S., Bohorquez M. y Koch C.** "Effect of salts on the micellization, clouding, and solubilization behavior of Pluronic F127 solutions " *J. Colloid Interface Sci.* 222: 213-220 (2000).
- Park S.Y., Lee Y., Bae K.H., Ahn C. y Park T.G.** "Temperature/pH-sensitive hydrogels prepared from Pluronic copolymers end-capped with carboxylic acid groups via an oligolactide spacer" *Macromol. Rapid Com.* 28: 1172-1176 (2007).
- Pasquali R., Chiappetta D.A. y Bregni C.** "Los copolímeros en bloques anfifílicos y sus aplicaciones farmacéuticas" *Acta Farm. Bonaerense* 24: 610-618 (2005).
- Port C.D., Garvin P.J. y Ganote C.E.** "The Effect of Pluronic F38 (Poloxamer 108) administered intravenously to rats" *Toxicol. App. Pharm.* 44: 401-411 (1978).
- Rangel-Yagui C.O., Pessoa-Jr A. y Costa-Tavares L.** "Micellar solubilization of drugs" *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 8: 147-163 (2005).
- Riess G.** "Micellization of block copolymers" *Prog. Polym. Sci.* 28: 1107-1170 (2003).
- Rodriguez-Perez A.I., Rodriguez-Tenreiro C., Alvarez-Lorenzo C., Concheiro A. y Torres-Labandeira J.J.** "Drug solubilization and delivery from cyclodextrin-Pluronic aggregates" *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6: 3179-3186 (2006).
- Sandez-Macho M.I., Gonzalez-Lopez J., Suarez-Varela A. y Mobius D.** "Influence of the environment on photoinduced electron transfer: comparison between organized monolayers at the air-water interface and monolayer assemblies on glass" *J. Phys. Chem. B* 109: 22386-22391 (2005).
- Seelig A. y Gerebtzoff G.** "Enhancement of drug absorption by noncharged detergents through membrane and P-glycoprotein binding" *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2: 733-752 (2006).
- Serajuddin A.T.M., Ranadive S.A. y Mahoney E.M.** "Relative lipophilicities, solubilities, and structure-pharmacological considerations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors Pravastatin, Lovastatin, Mevastatin, and Simvastatin" *J. Pharm. Sci.* 80: 830-834 (1991).
- Sharma P.K. y Bhatia S.R.** "Effect of anti-inflammatories on Pluronic F127: micellar assembly. gelation and partitioning" *Int. J. Pharm.* 278: 361-377 (2004).
- Singh-Joy S.D. y McLain V.C.** "Safety assessment of poloxamers 101, 105, 108, 122, 123, 124, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 212, 215, 217, 231, 234, 235, 237, 238, 282, 284, 288, 331, 333, 334, 335, 338, 401, 402, 403, and 407, poloxamer 105 benzoate, and poloxamer 182 dibenzoate as used in cosmetics" *Int. J. Toxicol.* 27: 93 - 128 (2008).
- Sosnik A., Leung B., McGuigan A.P. y Sefton M.V.** "Cytocompatibility of embedded HepG2 cells and surface attached endothelial cells" *Tissue Eng.* 11: 1807-1816 (2005).
- Sosnik A. y Sefton M.V.** "Poloxamine hydrogels with a quaternary ammonium modification to improve cell attachment" *J. Biomed. Mat. Res. Part. A* 75A: 295-307 (2005).
- Sosnik A. y Sefton M.V.** "Semi-synthetic collagen/poloxamine matrices for tissue engineering" *Biomaterials* 26: 7425-7435 (2005).

- Stancu C. y Sima A.** "Statins: mechanism of action and effects" *J. Cell. Mol. Med.* 5: 378-387 (2001).
- Stolnik S., Illum L. y Davis S.S.** "Long circulating microparticulate drug carriers " *Adv. Drug Deliv. Rev.* 16: 195-214 (1995).
- Subbaraman L.N., Bayer S., Gepr S., Glasier M.A., Lorentz H., Senchyna M. y Jones L.** "Rewetting drops containing surface active agents improve the clinical performance of silicone hydrogel contact lenses" *Opt. Vis. Sci.* 83: 143-151 (2006).
- Suzuki I., Ui M. y Yamauchi A.** "Pyrene-appended α -cyclodextrin as a fluorescent pH probe responding to a wide range" *Anal. Sci.* 22: 655-657 (2006).
- Szleifer I.** "Pancake-to-brush transition in block copolymers" *Europhys. Lett.* 44: 721-727 (1998).
- Szwarc M., Levy M. y Milkovich R.** "Polymerization initiated by electron transfer to monomer. A new method of formation of Block Polymers" *J. Am. Chem. Soc.* 78: 2656-2657 (1956).
- Takagi T., Ramachandran C., Bermejo M., Yamashita S., Yu L.X. y Amidon G.L.** "A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain and Japan" *Mol. Pharm.* 3: 631-643 (2006).
- Tandon V.R., Mahajan A. y Verma S.** "Statins and rheumatoid arthritis" *J. Ind. Rheumatol. Assoc.* 13: 54-59 (2005).
- Tonge S., Jones L., Goodall S. y Tighe B.** "The ex vivo wettability of soft contact lenses" *Curr. Eye Res.* 23: 51-59 (2001).
- Tummino P.J. y Gafni A.** "Determination of the aggregation number of detergent micelles using steady-state fluorescence quenching" *Biophys. J.* 64: 1580-1587 (1993).
- Tuzar Z.** "Polymer Colloids" *Iran. J. Polym. Sci. Technol.* 4: 34-40 (1995).
- Tuzar Z., Stehlíček J., Konák C. y Lednický F.** "Association of three-block copolymers polycaprolactam-block-polystyrene-block-polycaprolactam" *Makromol. Chem.* 189: 221-226 (1988).
- Ulbrich K. y Ubr V.** "Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation" *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56: 1025-1050 (2004).
- Ulrich C.E., Geil R.G., Tyler T.R., Kennedy G.L. y Birnbaum H.A.** "Two-week aerosol inhalation study in rats of ethylene oxide/propylene oxide copolymers" *Drug Chem. Toxicol.* 15: 269-270 (1992).
- Wenzel J., Balaji K., Koushik K., Navarre C., Duran S., Rahe C. y Kompella U.** "Pluronic® F127 gel formulations of Deslorelin and GnRH reduce drug degradation and sustain drug release and effect in cattle " *J. Control. Release* 85: 51-59 (2002).
- Wesemann A., Ahrens H., Teitz R., Forster S. y Helm C.A.** "Internal interface of a compressed PEE-PEO diblock copolymer monolayer" *Langmuir* 19: 709-716 (2003).
- Winterhalter M., Bürner H., Marzinka S., Benz R. y Kasianowicz J.J.** "Interaction of poly(ethylene-glycols) with air-water interfaces and lipid monolayers:

investigations on surface pressure and surface potential" *Biophys. J.* 69: 1372-1381 (1995).

Wu C., Liu T., Chu B., Schneider D.K. y Graziano V. "Characterization of the PEO-PPO-PEO triblock copolymer and its application as a separation medium in capillary electrophoresis" *Macromolecules* 30: 4574-4583 (1997).

Wu J., Xu J., Dabros T. y Hamza H. "Effect of EO and PO positions in nonionic surfactants on surfactant properties and demulsification performance" *Colloids Surf. A.* 252: 79-85 (2005).

Yan-Lei S. y Hui-Zhou L. "Temperature-dependent solubilization of PEO-PPO-PEO block copolymers and their application for extraction trace organics from aqueous solutions" *Korean J. Chem. Eng.* 20: 343-346 (2003).

Yang L. y Alexandridis P. "Small-angle neutron scattering investigation of the temperature-dependent aggregation behavior of the block copolymer Pluronic L64 in aqueous solution" *Langmuir* 16: 8555-8561 (2000).

Yokohama M. "Block copolymers as drug carriers" *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 9: 213-248 (1992).