



## MESA REDONDA

# Nuevas Oportunidades y Tecnologías en el Descubrimiento de Fármacos y Medicamentos

Antonio Monge Vega  
Juan Antonio Hueso  
Willy Baeyens  
Ana M<sup>a</sup> García Campaña  
María Vallet Regi

29 de enero de 2004



REAL ACADEMIA NACIONAL de FARMACIA

Reservados todos los derechos. Ni la totalidad ni parte de este libro puede reproducirse o transmitirse por ningún procedimiento electrónico o mecánico, incluyendo fotocopia, grabación magnética o cualquier almacenamiento de información y sistema de recuperación, sin permiso escrito del editor.

© Fundación José Casares Gil  
Farmacia, 11 - 28004 Madrid  
Teléfs. 91 531 03 07 / Fax: 91 531 03 06

Depósito Legal: M- 27691 -2004

Impreso en España

Edición: Junio 2004

Diseño y Maquetación: Diseño y Publicidad

Imprime: 3d3 Asociados.

# ÍNDICE

---

## **PRESENTACIÓN:**

*Excmo. Sr. D. Antonio Monge Vega* ..... 7  
CIFA (Universidad de Navarra).  
Académico de Número de la Real Academia  
Nacional de Farmacia.

## **MESA REDONDA:**

**“Quimioinformática en el Descubrimiento de Fármacos”** ..... 13  
*Dr. D. Juan Antonio Hueso*  
Gerente del Centro de Investigación de GSK.

**“Quimioluminiscencia en monitorización  
y control de calidad de fármacos”** ..... 19  
*Prof. Dr. Willy Baeyens*  
Universidad de Gante  
Académico Correspondiente de la Real Academia  
Nacional de Farmacia.

*Dra. Dña. Ana M<sup>a</sup> García Campaña*  
Profesora Titular Universidad de Granada. Facultad de Ciencias.  
Depto. Química Analítica.

**“Imitando a la Naturaleza: Nanoapatitas”** ..... 43  
*Dra. Dña. María Vallet Regi*  
Universidad Complutense.  
Catedrática de Química Inorgánica  
de la Facultad de Farmacia de la UCM.



## PRESENTACIÓN

***Excmo. Sr. D. Antonio Monge Vega***

CIFA (Universidad de Navarra)  
Académico de Número de la Real Academia Nacional  
de Farmacia

---

Excmo. Sr. Presidente de la REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA, Excmos. Sres. Académicas y Académicos, compañeros de corporación, queridos colegas, Sras. y Sres:

La actividad que hoy nos reúne responde a una propuesta de la Sección 1ª de esta Real Academia. Es propósito de esta Sección la discusión de temas de actualidad en el descubrimiento de medicamentos. El patrocinio de la Fundación José Casares Gil de Amigos de esta RANF, es vehículo eficaz para la actividad que se propone.

El descubrimiento de nuevos fármacos es una necesidad para la sociedad de nuestros días. Enfermedades emergentes, terapias insatisfactorias, enfermedades olvidadas, son ejemplos de una realidad acuciante. Medicamentos para los países en vías de desarrollo es, además, una demanda ética.

La realidad es que el descubrimiento de nuevos fármacos está estancado, no pasando del medio centenar el de las nuevas entidades introducidas anualmente en el mercado mundial.

Aunque los avances tecnológicos parecen haber llegado al entendimiento del último porqué de las cosas, la realidad es muy otra. Lo cierto es que se han dado muy pocas explicaciones a las preguntas que más nos increpan: la vida, nuestro origen y nuestro destino. Los magníficos avances de la física, la química, la biología molecular... no han hecho otra cosa que demostrar lo perdido que está el hombre en la racionalización del Universo. ¿Qué tiene que ver, por ejemplo, el deslumbrante trabajo en genómica con el descubrimiento de medicamentos? Realmente, en la actualidad, muy poco, pese a que la sociedad lo percibe de otra manera y será también una esperanza para el futuro. ¿Va a resolver la biología el descubrimiento de nuevos medicamentos? El titular informativo diría que sí; la realidad aplaza los resultados.

En el descubrimiento de nuevos medicamentos, la última década del siglo pasado fue, para los que nos dedicamos a este tema, permítase la expresión, “francamente agobiante”. Se hablaba del descubrimiento “racional” de fármacos, cuando en realidad se quería hablar de aplica-

ciones físico-químicas a tan importante actividad. Diseño en base de aproximaciones descritas por la biología, sin más, como si con decir tal cosa se hubiese resuelto el problema.

Toda aproximación suma, todo intento de describir la realidad tiene un interés. Pero no es menos cierto que cada opinión tiene su valor y en ella hay que interesarse por quién lo dice y por qué lo dice.

El medicamento es sobre todo un bien que debe ser administrado al hombre que sufre. Es decir, una realidad medible y evaluable. No se está hablando de ideas, aunque éstas tengan su valor en el descubrimiento. Es interesante constatar cómo todas las políticas investigadoras del momento subrayan la importancia de la segunda I, la Innovación, en el I+D+I.

Poco a poco, se va reconociendo que en este tema, más que soluciones, hay aproximaciones. Reconocer el papel que juega en las mismas la inteligencia y la dedicación de los investigadores es muy importante.

En esta ocasión, se discuten dos aproximaciones de suma actualidad. La aplicación de la informática y la miniaturización, en el descubrimiento de nuevos medicamentos.

Son realidades a explorar, a dedicar ingenio y esfuerzo, para su racionalización y mejor aprovechamiento. Muchas son consecuencia de la gran cantidad de datos que genera la ciencia -base sobre la que pueden sacarse aproximaciones- y la miniaturización de las tecnologías.

Las dos aproximaciones tienen interés por separado, a la vez que son interdependientes. Así, la miniaturización en los ensayos permite la realización de un mayor número de estos con una mínima cantidad de muestra. En definitiva, la obtención de un mayor número de datos, que deben ser tratados con técnicas informáticas.

Recientemente, *Modern Drug Discovery* (Noviembre 2003) ha dedicado un editorial al tema con el título de *Minirevolutions*, anunciando la

Presentación

dedicación de dos números de la revista a tan importante aproximación para el descubrimiento de fármacos.

La minirrevolución en las técnicas farmacéuticas es una realidad fácilmente observable en los laboratorios (biosensores, chips...). Incluso en la visita a los hospitales, como la ha descrito recientemente The Wall Street Journal, comentando la, impensable, hace años, miniaturización en la cirugía cardíaca.

Es deseo de la Sección 1<sup>a</sup> que esta Real Academia Nacional de Farmacia sea espejo que refleje y fermento que multiplique, en el importante tema del descubrimiento de fármacos.

En esta ocasión, contamos con la experiencia de tres expositores que reúnen en una consolidada trayectoria científica, la circunstancia adicional de presentar una visión lúcida, desde la Universidad y la Empresa, en los ámbitos nacionales e internacionales.

El descubrimiento de nuevos medicamentos va a precisar diferentes aproximaciones, sin entender de fronteras. El entendimiento sincero y decidido de Universidad y Empresa, en esta cuestión, será asunto decisivo, mirando al futuro.



QUIMIOINFORMÁTICA  
EN EL DESCUBRIMIENTO  
DE FÁRMACOS

*Dr. D. Juan Antonio Hueso*

Gerente del Centro de Investigación de GSK

---

La complejidad del proceso de Descubrimiento de Fármacos ha aumentado de forma considerable en los últimos años, no sólo por la mayor sofisticación de las técnicas utilizadas sino por el espectacular incremento de las dianas y compuestos a los que se tiene acceso como resultado de los avances en Genómica, Proteómica, Biología Molecular, *High Throughput Screening* (HTS) y Síntesis Química Automatizada en Paralelo. Para poder gestionar la inmensa masa de información así generada y poder traducirla en decisiones informadas y racionales, es necesario un armamento de herramientas informáticas especializadas, lo que dio origen a una nueva área de conocimiento llamada Quimioinformática. Son objeto de esta especialidad la gestión y análisis de datos para toma de decisiones, el diseño de quimiotecas, la predicción de propiedades de los compuestos químicos (especialmente relacionadas con absorción, distribución, metabolismo y toxicología, conocidas como ADMET) y, más recientemente, la simulación virtual de gran parte del proceso de Descubrimiento. El papel de la Quimioinformática es, pues, doble. Por un lado actúa como lubricante para asegurar que el complejo proceso de Descubrimiento funcione de forma eficiente y eficaz y por otro, cobrando cada vez más relevancia, es una herramienta de predicción que permite pronosticar resultados sin necesidad de realizar experimentos reales, con el consiguiente ahorro de tiempo y dinero.

La Quimioinformática tiene un primer papel al permitir aumentar la capacidad general del sistema, facilitando la gestión del proceso y haciéndolo más efectivo, de manera que podamos convertir todas las dianas potenciales en proyectos de investigación reales mediante el aumento de la capacidad del sistema, sin merma de calidad. Al mismo tiempo, debemos ser capaces de llevar a cabo la extracción y el análisis de toda la información contenida en los experimentos masivos que se llevan a cabo, tanto para cada experimento de forma independiente como para varios experimentos de forma colectiva. Para esto se han desarrollado sistemas de visualización que permiten la evaluación simultánea de gran cantidad de parámetros de forma conjunta de una manera entendible por el cerebro humano, que es la mejor herramienta hasta el momento para la realización de decisiones en sistemas poco estructurados como la investigación farmacéutica. Sin embargo

los avances en inteligencia artificial acercan el momento en que la toma de decisiones sea realizada por un sistema informático con apropiada supervisión humana.

En segundo lugar, la Quimioinformática está contribuyendo a optimizar el proceso y aumentar las garantías de éxito del mismo mediante su cada vez mayor capacidad de predicción, sustituyendo tediosos procesos iterativos de prueba y error por una capacidad para discernir *a priori* cuáles son las rutas o productos que tienen más posibilidades de éxito. Esta contribución será cada vez mayor en el futuro, haciendo cada vez más factible la simulación de gran parte del proceso de forma virtual.

Para conseguir estos objetivos, la Quimioinformática provee de herramientas que permiten el diseño y la optimización de quimiotecas, con lo que podemos ajustar la síntesis de compuestos de manera que podamos cubrir la mayor diversidad molecular posible con el mínimo número de compuestos, reduciendo el número de ellos a sintetizar para encontrar un activo. Las herramientas provistas comienzan con algo tan sencillo como sistemas que permitan describir los compuestos en términos manipulables por un sistema informático de manera que posteriormente los podamos clasificar. Una de las clasificaciones más habituales pero quizá más compleja, es la de la similitud o diferencia entre compuestos, especialmente cuando queremos cuantificar de algún modo esa diferencia de manera que podamos clasificar los compuestos por similitud con uno dado o entre ellos. Este proceso que se denomina *clustering* se basa en la definición de un espacio multidimensional donde representamos las moléculas en función de una serie de propiedades, consistiendo cada una de ellas en una dimensión independiente. En este espacio cada molécula es un punto y podemos cuantificar la similitud entre dos moléculas como la distancia entre ellas. La aplicación de estos sistemas permite trabajar con millones de moléculas de forma simultánea y realizar una clasificación de las mismas, tarea que evidentemente es imposible de realizar sin estas herramientas. Un segundo paso es el diseño de quimiotecas y su optimización. Clásicamente este proceso se realizaba de manera iterativa, opti-

mizando cada propiedad de manera independiente, que resultaba muchas veces en que la mejora de una propiedad conlleva la pérdida en otras. Este es un problema matemático ya trabajado por el siglo XIX por Pareto que estipuló que cuando se intentan optimizar diferentes variables en el mismo objeto no hay una solución única, sino un continuo de soluciones de compromiso en las que se alcanza la máxima optimización de una propiedad sin detrimento de las otras. Estas soluciones se denominan no dominadas o Pareto, y recientemente se han desarrollado algoritmos para el diseño de quimiotecas que aplican este concepto de manera que podemos optimizar diferentes propiedades de forma simultánea, escogiendo entonces de las múltiples soluciones Pareto aquélla que mejor convenga al problema concreto.

Entre los parámetros que se incluyen recientemente, están los que permiten descartar aquellos compuestos que pueden presentar problemas en fases posteriores de desarrollo, mediante el uso de predictores ADMET, disminuyendo así el riesgo de caída de los compuestos en fases preclínicas y clínicas por factores como toxicidad o falta de absorción. Estos predictores permiten calcular toda una serie de factores que se utilizan como indicadores de la desarrollabilidad definida, como la susceptibilidad de un compuesto a ser desarrollado sin problemas. Los más habituales son solubilidad, lipofilicidad, volumen molecular, unión a albúmina, permeabilidad en Caco-2, unión a isoformas de citocromo P450 y predictores basados en la estructura del compuesto de sus posibles rutas metabólicas. La conjunción de todas estas herramientas hace el proceso más efectivo, con la consecuente disminución de tiempos y costes.

Pero el avance de la Quimioinformática no se detiene, y recientemente se está empezando a cubrir una nueva fase. En ella estamos empezando a utilizar todo el conocimiento adquirido para predecir las actividades farmacológicas de los compuestos frente a la diana de interés de manera precisa. De esta manera se abre la posibilidad de simular el proceso de descubrimiento mediante el diseño de compuestos con las propiedades deseadas, y en un proceso iterativo, reducir el número de compuestos a sintetizar y ensayar con posibilidades de éxito. Hay recientes ejemplos en la literatura científica en los que la combinación

de herramientas informáticas con datos conocidos de una diana terapéutica (¡o incluso sólo de una diana relacionada!) permite delimitar enormemente el número de experimentos a realizar para tener éxito. Sin embargo siendo realistas, este proceso de descubrimiento virtual está todavía en sus primeras fases, aunque ciertamente constituye una línea de gran futuro que se está beneficiando del creciente caudal de conocimientos sobre las dianas farmacológicas, su potencial terapéutico y los mecanismos mediante los cuales los medicamentos son absorbidos, transportados y eliminados por los seres vivos, mejorando nuestra capacidad de predicción. Seguramente la veremos fructificar en los próximos años, revolucionando nuestra manera de hacer investigación farmacéutica.



# QUIMIOLUMINISCENCIA EN MONITORIZACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE FÁRMACOS

***Prof. Dr. Willy Baeyens***

Universidad de Gante.  
Académico Correspondiente  
de la Real Academia Nacional de Farmacia

***Dra. Dña. Ana M<sup>a</sup> García Campaña***

Universidad de Granada. Facultad de Ciencias.  
Profesora Titular del Dept. Química Analítica.

---

## 1. Introducción

El uso analítico de la quimioluminiscencia (QL) está experimentando un creciente interés, ya que representa una alternativa simple, barata y sensible para cuantificar una gran variedad de compuestos. Desde hace unos treinta años, el fenómeno de la luminiscencia -originalmente una curiosidad del laboratorio físico-, se ha convertido en una rama de la espectrometría aplicada, dentro de la química analítica. Debido a la nueva instrumentación y, especialmente a la incorporación de técnicas modernas, algunas nuevas y otras tomadas de otras disciplinas, la QL y la bioluminiscencia (BL) se aplican de forma rutinaria en el análisis tanto cuali- como cuantitativo [1].

Aunque el fenómeno de la QL se conoce desde 300 años a.C., el desarrollo de aplicaciones analíticas es relativamente reciente. Debido a su alta sensibilidad y selectividad, los métodos basados en detecciones QL suponen una herramienta analítica de gran utilidad. La primera aplicación de la QL como técnica analítica la llevó a cabo Erdey en 1957, que estudió el uso de varias sustancias, como luminol, lofina y lucigenina, como indicadores volumétricos. Las investigaciones sobre el potencial analítico de la QL para análisis de rutina datan de los años 70, en el caso de reacciones en fase gaseosa, y de la década de los 80 para reacciones en fase líquida. Desde entonces, los métodos quimioluminiscentes han sido más ampliamente utilizados, fundamentalmente en análisis bioquímico y ambiental, y el número de publicaciones y comunicaciones sobre el tema ha ido incrementando de forma exponencial desde la celebración del primer Simposium Internacional sobre Bioluminiscencia y Quimioluminiscencia, celebrado en Bruselas en 1978. De hecho, en el desarrollo de métodos QL pueden diferenciarse dos periodos: una primera etapa (1928-1940) caracterizada por la búsqueda de nuevos compuestos o sistemas quimioluminiscentes, por medio de modificaciones químicas de estructuras bien conocidas, y, desde la 2ª Guerra Mundial hasta el presente, un avance en la instrumentación, junto con el desarrollo de conceptos teóricos de los, a veces, complejos principios de la QL.

Las grandes aplicaciones analíticas de la QL como método de detección en inyección en flujo y cromatografía líquida (CL), junto con el

gran potencial del inmunoensayo [2], hacen de esta técnica un campo de investigación muy interesante en una amplia variedad de disciplinas, que incluyen técnicas de separación en análisis químico, biológico, farmacéutico, biomédico y alimentario, control de calidad, etc. [3]. Las tendencias más actuales en química analítica implican la aplicación de la QL como sistema de detección, combinada con técnicas de análisis por inyección en flujo y técnicas separativas, proporcionando una selectividad y sensibilidad analíticas excelentes y permitiendo la resolución y cuantificación de varios analitos en mezclas relativamente complejas. Hasta la década de los noventa, la detección por QL no había sido acoplada a electroforesis capilar (EC), pero en estos últimos años, se han publicado importantes desarrollos por parte de algunas compañías y grupos de investigación, por lo que se esperan futuras contribuciones sobre el tema [4].

Combinadas con separaciones por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), se han empleado varias reacciones quimioluminiscentes, entre otras con peroxioxalato, luciferasa, lucigenina y luminol, siendo la más común la reacción con peroxioxalato en detección post-columna acoplada a cromatografía líquida, tanto convencional como empleando microcolumnas. Asimismo, se han empleado sistemas de flujo continuo con detección basada en QL, para la determinación de varios fármacos y analitos de interés biológico.

## **2. Fundamentos de la QL**

La QL se define como la emisión de radiación electromagnética (normalmente en la región del visible o del infrarrojo cercano) producida por una reacción química. Cuando esta emisión proviene de organismos vivos o sistemas derivados de ellos, se denomina bioluminiscencia. Ambos fenómenos son procesos luminiscentes que se han identificado tradicionalmente mediante un prefijo que identifica la fuente de energía responsable del inicio de la emisión de radiación electromagnética (ver Tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación de los fenómenos luminiscentes**

<p><b>Producidos por irradiación</b></p> <p>A) Fotoluminiscencia: El estado excitado se produce por la absorción de radiación ultravioleta, visible o de infrarrojo próximo</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fluorescencia: Emisión de vida corta a partir de un estado singlete electrónicamente excitado</li> <li>• Fosforescencia: Emisión de vida larga a partir de un estado triplete electrónicamente excitado</li> </ul> <p>B) Catodoluminiscencia: Emisión producida por irradiación de partículas <math>\beta</math></p> <p>C) Anodoluminiscencia: Emisión producida por irradiación de partículas <math>\alpha</math></p> <p>D) Radioluminiscencia: Emisión producida por irradiación de partículas <math>\gamma</math> o rayos X</p>
<p><b>Producidos por calentamiento</b></p> <p>A) Candoluminiscencia: Emisión por sólidos incandescentes</p> <p>B) Termoluminiscencia: Emisión por sólidos y cristales en caliente</p> <p>C) Piroluminiscencia: Emisión por átomos metálicos en llama</p>
<p><b>Producidos por reordenamientos estructurales en sólidos</b></p> <p>A) Triboluminiscencia: Emisión por cristales friccionados o triturados</p> <p>B) Cristaloluminiscencia: Emisión por cristalización</p> <p>C) Lioluminiscencia: Emisión por cristales disueltos</p>
<p><b>Producidos por fenómenos eléctricos</b></p> <p>A) Electroluminiscencia: Emisión por descargas eléctricas</p> <p>B) Galvanoluminiscencia: Emisión durante la electrolisis</p> <p>C) Sonoluminiscencia: Emisión por exposición a ondas ultrasónicas en solución</p> <p>D) Piezoluminiscencia: Emisión por separación de cargas por fricción en la superficie de cristales</p>
<p><b>Producidos por reacciones químicas</b></p> <p>A) Bioluminiscencia: Emisión por organismos vivos o sistemas biológicos</p> <p>B) Quimioluminiscencia: Emisión por una reacción química</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Electroquimioluminiscencia: Emisión que se produce en solución, a partir de un estado electrónicamente excitado producido en una reacción de transferencia de alta energía de un electrón</li> <li>• Quimioluminiscencia Electrogenada: Emisión producida en la superficie de un electrodo</li> </ul>

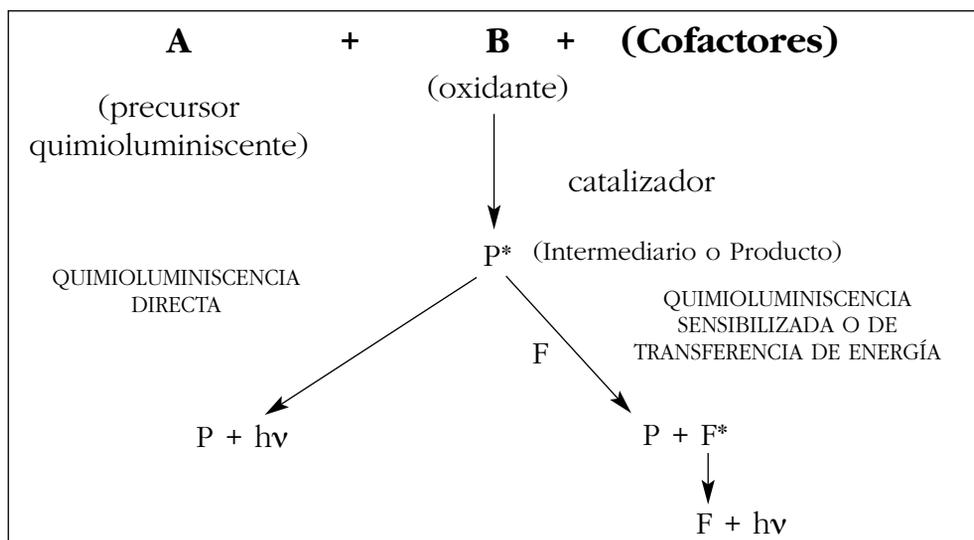
Como la intensidad de emisión es función de la concentración de las especies químicas implicadas en la reacción QL, las medidas de la intensidad de emisión pueden emplearse con fines analíticos. Una ventaja de las técnicas QL es que permiten emplear una instrumentación básica bastante sencilla, ya que el sistema óptico no requiere fuente externa de excitación. La QL se describe a menudo como una técnica de “campo oscuro”: la ausencia de niveles altos de luz de fondo, que sí ocurren en espectrofotometría y fluorimetría, reduce el ruido y permite mejorar los límites de detección. La instrumentación para medidas de QL varía desde sistemas muy simples hasta instrumentación más compleja, pudiéndose usar un fluorímetro simplemente con la fuente de excitación apagada.

No obstante deben considerarse algunas limitaciones en el análisis por QL, como la dependencia de la emisión quimioluminiscente de varios factores ambientales que deben ser controlados, la falta de selectividad, ya que un reactivo quimioluminiscente no se limita a un único analito, y finalmente, como ocurre en otros sistemas de detección en flujo, la emisión quimioluminiscente no es constante sino que varía con el tiempo (el flash de luz está compuesto de una señal que se produce tras la mezcla de los reactivos, alcanza un máximo y después cae hasta la línea de base), y este perfil de emisión frente al tiempo puede variar ampliamente en diferentes sistemas quimioluminiscentes, por lo que hay que extremar el cuidado para detectar la señal en sistemas en flujo, midiendo en periodos de tiempo bien definidos.

### ***2.1. Mecanismos de las reacciones QL***

En general, una reacción QL puede generarse mediante dos mecanismos básicos (**Figura 1**). En una reacción directa, dos reactivos, normalmente un sustrato y un oxidante en presencia de algunos cofactores, reaccionan para formar un producto o intermedio de la reacción, algunas veces en presencia de un catalizador. Después, parte del producto o intermedio pasa a un estado electrónicamente excitado, que puede a continuación relajarse hasta el estado fundamental con emisión de un fotón. El sustrato es el precursor QL, que se convierte en la molécula excitada electrónicamente, responsable de la emisión de luz, o bien actúa para transferir la energía en la QL indirecta. El cata-

lizador, enzima o ion metálico, reduce la energía de activación y proporciona el ambiente adecuado para la producción de una alta eficiencia QL durante el proceso. Los cofactores son necesarios en ocasiones para convertir uno o más de los substratos en una forma capaz de reaccionar e interactuar con el catalizador, o para proporcionar un grupo “saliente” eficaz cuando se requiere un marcado para producir el emisor excitado. Por el contrario, la QL indirecta o sensibilizada se basa en un proceso de transferencia de energía de la especie excitada a un fluoróforo. En el caso de moléculas que no pueden emitir directamente QL, este proceso permite transferir su exceso de energía a un fluoróforo que a su vez es excitado, volviendo a su estado fundamental con la emisión de un fotón. Todas estas etapas dan lugar a una gran variedad de aplicaciones prácticas de la QL en la fase sólida, líquida y gaseosa.



**Figura 1**  
**Mecanismos de la emisión quimioluminiscente.**

## 2.2. Requisitos de la emisión QL

Para que una reacción química emita luz, debe reunir algunos requisitos básicos:

a) La reacción debe ser exotérmica y producir la suficiente energía para

formar el estado electrónicamente excitado. En este sentido, para que ocurra una reacción quimioluminiscente, los requisitos energéticos pueden establecerse en términos de  $\Delta G$  (Kcal.mol<sup>-1</sup>):

$$-\Delta G \geq \frac{hc}{\lambda_{\text{ex}}} = \frac{2.86 \cdot 10^4}{\lambda_{\text{ex}}}$$

donde  $\lambda_{\text{ex}}$  es la longitud de onda límite (nanómetros) para la excitación de las especies luminiscentes. Como la mayoría de las reacciones quimioluminiscentes producen fotones en el rango comprendido entre 400 (violeta) - 750 (rojo) nm, la formación del estado electrónicamente excitado y la generación de QL en la región del visible requiere alrededor de 40-70 Kcal.mol<sup>-1</sup>. Esta condición exotérmica se asocia a las reacciones redox que emplean oxígeno, peróxido de hidrógeno u oxidantes de potenciales similares.

b) El camino de reacción debe ser favorable a canalizar la energía hacia la formación de un estado electrónicamente excitado. En el caso de que la energía química se disipe en forma de calor, mediante vibraciones o rotaciones moleculares, la reacción no será quimioluminiscente.

c) La emisión de un fotón debe ser un proceso de desactivación del producto excitado favorable en relación a otros procesos no radiantes que pueden aparecer en pequeña proporción, como disociación molecular, reacciones químicas con otras especies, transferencia de energía intra- o intermolecular, isomerización o atenuación física. En el caso de QL sensibilizada, tanto la eficacia y energía de transferencia de las especies excitadas al fluoróforo como la eficacia de la fluorescencia de este último deben ser considerables.

En todos los procesos luminiscentes, la intensidad de la emisión producida depende de la eficacia al generar moléculas en el estado excitado, lo cual viene representado por la eficiencia cuántica (rendimiento cuántico) y la velocidad de la reacción. En el caso de reacciones quimioluminiscentes, la intensidad puede expresarse como:

$$I_{QL} = \phi_{QL} \frac{-dA}{dt}$$

donde  $I_{QL}$  es la intensidad de emisión quimioluminiscente (fotones/segundo),  $\phi_{QL}$  es el rendimiento cuántico y  $(-dA/dt)$  la proporción en la que el precursor quimioluminiscente, A, es consumido. Los valores altos de rendimiento cuántico se asocian normalmente con reacciones de BL, mientras que en la mayoría de las reacciones quimioluminiscentes empleadas para fines analíticos,  $\phi_{QL}$  varía entre 0.001-0.1, e incluso sistemas bastante ineficaces, con rendimientos cuánticos inferiores, pueden emplearse en análisis basados en la ausencia casi absoluta de emisión de fondo. Tal es el caso de reacciones quimioluminiscentes ultradébiles, en las que  $\phi_{QL}$  puede ser inferior a 0.001 (a menudo  $10^{-3}$ - $10^{-8}$  y algunas veces  $10^{-9}$ - $10^{-15}$ ). La QL ultradébil se produce a partir de reacciones de oxidación en células vivas y las señales emitidas son a menudo  $10^3$ - $10^6$  veces menos intensas que las de organismos luminosos, siendo invisibles a simple vista. Este tipo de QL incluye un grupo de reacciones quimioluminiscentes que, al menos en células vivas, implica cierto número de intermediarios oxigenados y que juega un papel importante en ciertos tipos de activación celular, en los sistemas de defensa del cuerpo y en enfermedades coronarias. Se han detectado en gran variedad de órganos intactos, células aisladas y tejidos homogéneos de vertebrados, invertebrados y plantas, y en varias reacciones *in vitro*. La QL ultradébil se asocia a algunas importantes funciones celulares, como la respiración mitocondrial, fotosíntesis, división celular o fagocitosis, entre otras [5].

### **2.3. Factores que influyen en la emisión QL**

Las medidas de QL están fuertemente influenciadas por aquellos factores experimentales que afectan al rendimiento cuántico y a la velocidad de reacción, como son:

- La estructura química del precursor quimioluminiscente, no solamente la parte que contiene al grupo excitado electrónicamente, sino también las cadenas laterales.
- La naturaleza y concentración de otras sustancias que afectan el proceso de QL y que favorecen otros procesos competitivos no radiantes.
- El catalizador seleccionado.
- La presencia de iones metálicos, especialmente metales de transición implicados en el proceso de oxidación.

- La temperatura
- pH y fuerza iónica
- La hidrofobicidad del disolvente y la composición de la disolución (por ejemplo, la  $\phi_{QL}$  del luminol oxidado en dimetilsulfóxido (DMSO) es 0.05 comparado con 0.01 en agua, siendo los colores azul-violeta (425 nm) y verde-azulado (480-502 nm), respectivamente)
- La presencia de aceptores de la energía transferida

#### ***2.4. Características de la QL como técnica analítica***

Como la velocidad de la reacción es función de las concentraciones de reactivos, la QL es una técnica adecuada para el análisis cuantitativo. La utilidad de los sistemas quimioluminiscentes en química analítica se basa en algunas características especiales, que se comentan a continuación.

- a) La técnica comprende simultáneamente características cinéticas y luminiscentes, por lo que proporciona una alta sensibilidad y un amplio rango dinámico. Si  $\phi_{QL}$  es lo suficientemente alta, se pueden alcanzar límites de detección excelentes, en el rango de los femtomoles. Como ejemplo, en la fase gaseosa, los límites de detección habituales son de 10 pmol de NO empleando ozono, y 0.1 pmol para compuestos sulfurados empleando una llama de hidrógeno seguida de ozono; en la fase líquida, puede detectarse hasta 1 fmol de fluoróforo empleando el sistema quimioluminiscente con perioxalato, y 0.1 fmol de peroxidasa usando luminol. En comparación con otras técnicas espectrométricas, la QL es aproximadamente  $10^5$  veces más sensible que la espectrometría de absorción y al menos  $10^3$  veces más sensible que la fluorimetría.
- b) Comparada con los procesos de fotoluminiscencia, no se requiere fuente de excitación externa, lo que ofrece algunas ventajas, como la ausencia de dispersión y señales fotoluminiscentes de fondo, la desaparición de problemas relacionados con la inestabilidad de la fuente externa, reducción de interferencias debidas a procesos de excitación no selectivos, y una instrumentación más simple.
- c) La selectividad y la linealidad son más dependientes de la reacción y de las condiciones de reacción escogidas. Como ocurre con los

procesos fotoluminiscentes, la absorción o emisión de radiación por el analito, producto o cofactores, pueden causar pérdida de linealidad o interferencias espectrales.

- d) La técnica es versátil para la determinación de una amplia variedad de especies que pueden participar en el proceso quimioluminiscente, como: substratos o precursores quimioluminiscentes responsables del estado excitado; el reactivo necesario para la reacción (normalmente un oxidante); algunas especies que afectan la velocidad o la eficacia de la reacción: activadores, como catalizadores (enzimas o iones metálicos), o inhibidores, como reductores que disminuyen la emisión quimioluminiscente; fluoróforos en el caso de QL sensibilizada; algunas especies que no están directamente implicadas en la reacción QL pero que pueden reaccionar con otros reactivos en reacciones acopladas para generar un producto que es un reactivo en la reacción QL; especies que pueden formar derivados con algún precursor quimioluminiscente o fluoróforo, determinándose mediante QL directa o sensibilizada.
- e) Dependiendo de la naturaleza del analito y de la reacción QL, el incremento o disminución de la intensidad de QL estará directamente relacionada con la concentración de analito.
- f) Las reacciones quimioluminiscentes pueden acoplarse fácilmente como método de detección en cromatografía, EC o inmunoensayo, proporcionando información cualitativa o cuantitativa sobre una gran variedad de especies en las fases gaseosa y líquida.

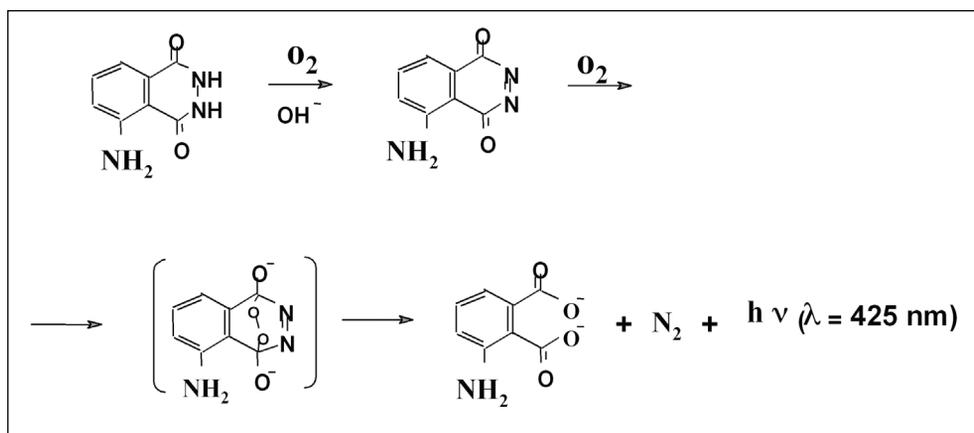
Como regla empírica, es probable que un compuesto exhiba QL cuando él o su producto derivado muestren propiedades fluorescentes. Es posible que la oxidación de tal especie produzca QL, aunque hay muchas excepciones a esta regla general.

### **3. Principales reacciones CL en fase líquida**

#### ***3.1. Acilhidracidas***

El ejemplo más conocido en reacciones directas es la oxidación del luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) en medio alcalino,

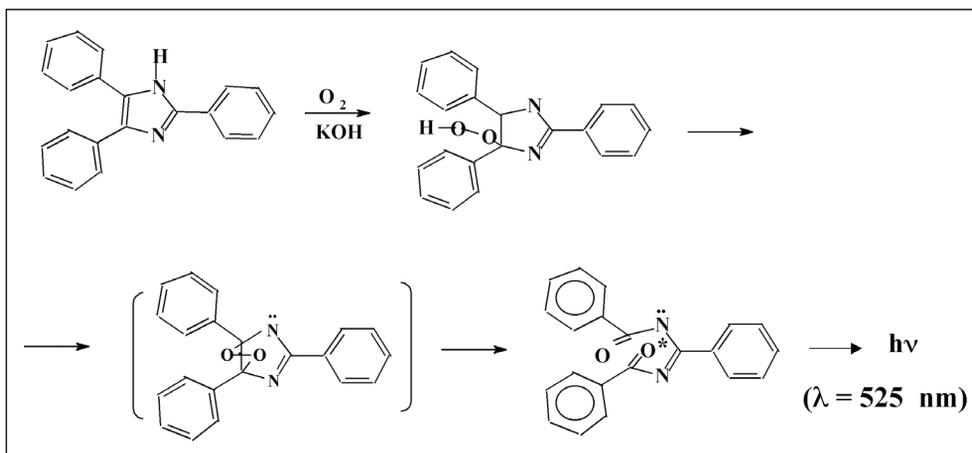
para producir el ión 3-aminoftalato excitado (**Figura 2**). Pueden utilizarse varios oxidantes, tales como el permanganato, hipoclorito o yodo, aunque el más usado es el peróxido de hidrógeno. La reacción es catalizada por iones metálicos (Fe(II), Cu(II), Co(II), entre otros), ferricianuro o algunos metalocomplejos (hemina, hemoglobina y peroxidasas). Esta reacción ha sido aplicada en la determinación de iones metálicos que actúan como catalizador, enzimas (peroxidasas, compuestos hemáticos, etc.), ciertos oxidantes, inhibidores o sustancias que son fácilmente oxidables y que son determinadas indirectamente por la disminución de emisión quimioluminiscente. También el luminol se ha usado ampliamente en investigaciones criminales para detectar cantidades trazas de sangre, que no son visibles a simple vista, tales como restos de sangre seca incluso con varios años de antigüedad, en ropas lavadas, superficies intencionadamente limpiadas, superficies oscuras, etc. [6]. De hecho, la aplicación de un spray con luminol sobre la superficie a investigar puede producir una luminiscencia capaz de detectar hematina a dilución de 1:10<sup>8</sup>. Igualmente fármacos cuya presencia inhibe o exalta la emisión del luminol han sido cuantificados mediante esta metodología. En el primer caso destaca la determinación de paracetamol [7] y oximetazolina [8] en preparados farmacéuticos y en el segundo caso, la determinación de ácido clavulánico y sulbactam [9] o de tiopronina [10].



**Figura 2**  
Reacción quimioluminiscente del luminol

### 3.2. Imidazoles

La lofina (2,4,5-trifenilimidazol) es el precursor quimioluminiscente más representativo de estos compuestos. Cuando la lofina es oxidada, en medio básico, por peróxido-hipoclorito o peróxido-hexacianoferrato (III) y  $O_2$  a hidroperóxido, a partir del cual se forman diaroilariamidinas en estado excitado a través de una estructura de dioxetano, que es la responsable de la emisión de la luz (**Figura 3**) [11]. Utilizando este sistema se han llevado a cabo determinaciones de Co(II), Cr(III), Cu(II),  $Fe(CN)_6^{3-}$ ,  $MnO_4^-$ ,  $ClO^-$ , entre otros. Recientemente, se ha encontrado que el cloruro de hidroxilamonio aumenta la emisión quimioluminiscente del sistema lofina-Co(II)- $H_2O_2$ , permitiendo una determinación muy sensible de Co(II) [12].

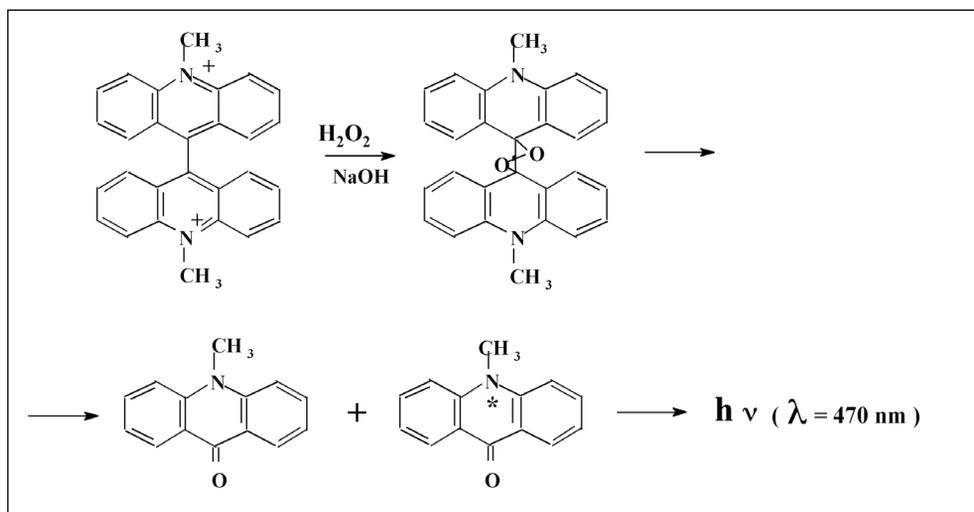


**Figura 3**  
Reacción quimioluminiscente de la lofina

### 3.3. Ésteres de acridinio

La lucigenina (nitrato de 10,10'-dimetil-9.9'-biacridinio) es uno de los compuestos quimioluminiscentes más eficientes, que emite una intensa luz verde cuando se oxida en medio básico [13]. Otros derivados del acridinio producen emisión quimioluminiscente al ser oxidados por peróxido de hidrógeno en disolución acuosa alcalina. El producto final de la reacción es la N-metilacridona, que actúa como intermediario activo en el mecanismo propuesto por Rauhut y col.[14,15] (**Figura 4**). Debido a que este producto es insoluble en agua, la adición de peque-

ñas cantidades de un surfactante, tal como dodecilsulfato sódico puede utilizar para evitar la precipitación [16]. La aplicación de esta reacción ha permitido la determinación de varios iones, oxidantes o reductores como el ácido ascórbico [17].

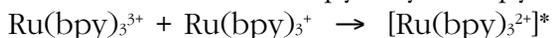


**Figura 4**  
**Reacción quimioluminiscente de la lucigenina**

### 3.4. *Tris(2,2'-bipiridina) rutenio (III)*

Otro sistema quimioluminiscente frecuentemente usado es el complejo  $Ru(bpy)_3^{2+}$ , cuyo estado excitado  $[Ru(bpy)_3^{2+}]^*$  produce una emisión naranja a 610 nm. El estado excitado puede conseguirse por diversas reacciones que implican la transferencia de un electrón y regeneración de la especie  $Ru(bpy)_3^{2+}$ :

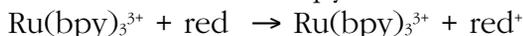
\* Por reacción de  $Ru(bpy)_3^{3+}$  y  $Ru(bpy)_3^+$



\*Por reacción de  $Ru(bpy)_3^+$  con ciertos oxidantes



\*Por reacción de  $Ru(bpy)_3^{3+}$  con ciertos reductores

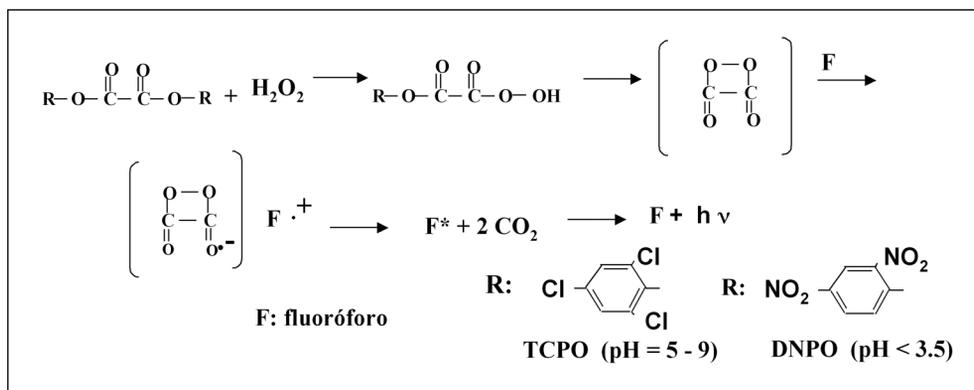


Para estas reacciones la intensidad de QL es linealmente proporcional a la concentración de cualquiera de los reactivos, lo que permite su determinación ajustando adecuadamente la concentración de los restantes

reactivos que intervienen en ella. Los disolventes que se utilizan en las determinaciones quimioluminiscentes basadas en estas reacciones suelen ser acetonitrilo-agua, metanol-agua y acetona-agua [18]. Recientemente, se ha investigado un complejo similar,  $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$  (phen= 1,10 fenantrolina), que genera una mayor emisión durante la oxidación de  $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$  por Ce(IV) en medio ácido sulfúrico, permitiendo el establecimiento de un método quimioluminiscente para el análisis de ácidos nucleicos, con un gran aumento de la emisión de QL [19].

### 3.5. Peroxioxalatos

En QL indirecta, uno de los sistemas no biológicos más frecuentemente utilizados se basa en la reacción quimioluminiscente de los peroxioxalatos (PO-CL), que supone la oxidación por peróxido de hidrógeno de un éster aril oxalato en presencia de un fluoróforo. La reacción parece que sigue un mecanismo denominado “luminiscencia de intercambio electrónico iniciada químicamente” (CIEEL, chemically initiated electron exchange luminescence mechanism) a través de un intermediario de alta energía, la 1,2-dioxietanodiona, que forma un complejo de carga con el fluoróforo, donando un electrón al intermediario [20]. Este electrón es transferido al fluoróforo, que alcanza un estado excitado y al regresar al estado fundamental, produce una emisión característica propia de la naturaleza del fluoróforo (**Figura 5**). El bis-(2,4,6-triclorofenil) oxalato y el bis-(2,4-dinitrofenil) oxalato son los más corrientemente usados. La principal desventaja de este sistema reside en la insolubilidad de estos compuestos en agua y su inestabilidad por hidrólisis, por lo que se requiere el uso de disolventes orgánicos, tales como, acetonitrilo, dioxano, terbutanol y acetato de etilo. Recientemente este problema se ha solventado mediante el uso de medios micelares, siendo posible su aplicación en sistemas en flujo para el análisis de proteínas [21,22]. Esta reacción se aplica a la determinación de un gran número de compuestos como peróxido de hidrógeno, sustancias altamente fluorescentes (ej. hidrocarburos aromáticos policíclicos) o compuestos que no siendo fluorescente pueden convertirse en fluorescentes, por reacción química con cloruro de dansilo (aminoácidos, esteroides, aminas alifáticas, ácidos carboxílicos, etc.) o con fluorescamina (catecolaminas) [23].

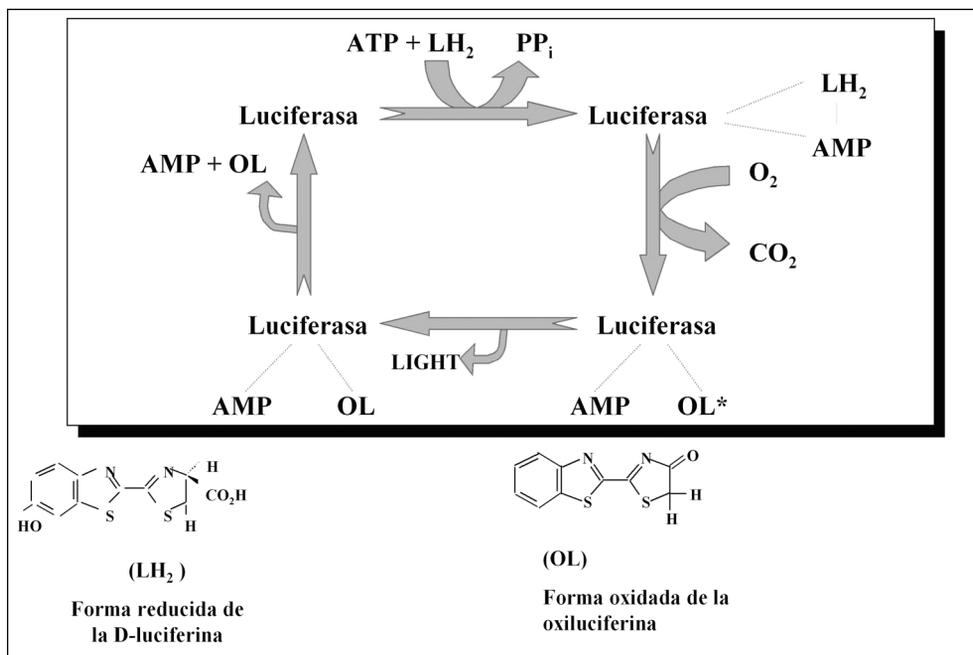


**Figura 5**  
**Reacción quimioluminiscente de los peroxioxalatos**

### 3.6. Reacciones bioluminiscentes

Los sistemas bioluminiscentes más utilizados, desde el punto de vista analítico, son los basados en la reacción luciferina-luciferasa y los sistemas derivados de la luciérnaga *Photinus pyralis* y ciertas bacterias marinas (*Vibrio harvey* y *Photobacterium fischeri*). Las luciferasas se estabilizan por proteínas como la albúmina. En el primer sistema, la enzima hidrofóbica luciferasa cataliza la oxidación por el aire de la luciferina en presencia de ATP, que se consume como sustrato para emitir luz a 562 nm [24]. Es necesaria la presencia de Mg(II) para que la luciferasa muestre su actividad. Un detallado esquema se muestra en la (Figura 6). Considerando la estequiometría de la reacción, por cada molécula de ATP consumida se emite aproximadamente un fotón. Esta propiedad, junto con la alta especificidad de la enzima por el nucleótido, hacen que esta reacción sea un sistema analítico ideal para detectar la presencia de ATP, su producción o consumo, que depende de la actividad enzimática y para cuantificar sustratos relacionados con el metabolismo del ATP. La detección de ATP es una alternativa para detectar la contaminación por microorganismos, residuos en alimentos o restos de contacto humano en superficies. Este sistema se emplea en el ámbito de la gestión y garantía de la calidad para aumentar la higiene de los alimentos [25] y en otros campos, tales como en control de calidad ambiental [26], en el seguimiento de plantas de lodos y aguas residuales [27], en la industria farmacéutica y de cosméticos [28,29], en la

calidad y vitalidad de la biomasa implicada en procesos de fermentación [30], en la contaminación bacteriana de áreas estériles o en el deterioro de obras artísticas por microorganismos [31]. Se han comercializados varios kits de reactivos, para usarlos directamente en el sistema adecuado mediante instrumentos portátiles con este fin [32].



**Figura 6**  
**Sistema bioluminiscente de la luciferina-luciferasa**

### 3.7. Oxidaciones directas

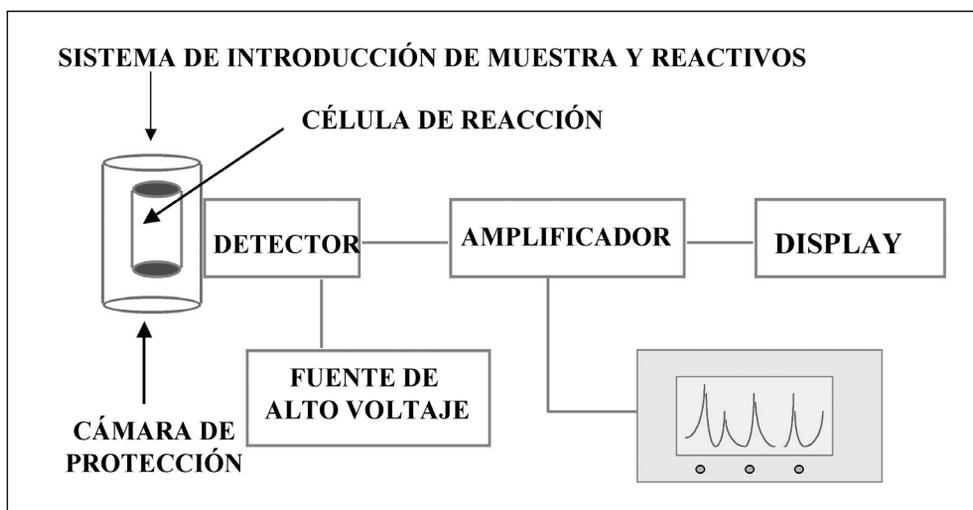
En los últimos años, se han desarrollado nuevas reacciones quimioluminiscentes por reacción del analito en cuestión con oxidantes fuertes, tales como MnO<sub>4</sub><sup>-</sup> (en medio ácido y alcalino), ClO<sub>2</sub><sup>-</sup>, Ce(IV), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IO<sub>4</sub><sup>-</sup>, Br<sub>2</sub>, N-bromosuccinimida, y con reductores, en diferentes condiciones químicas [33]. Normalmente, si se conoce que la oxidación de la molécula da un producto fluorescente, o si el analito en sí mismo, tiene una estructura que permita la emisión fluorescente, hay posibilidad de que la oxidación del mismo produzca emisión de QL. Algunas de las aplicaciones de estos últimos sistemas han sido la determinación quimio-

luminiscente de morfina [34], hidrocloreuro de buprenorfina [35] y la benzodiazepina loprazolam [36], sulfonamidas [37], mediante análisis por inyección en flujo (FIA). En estos casos, la muestra conteniendo el fármaco se inyectaba en el canal por donde circula una disolución de ácido fosfórico que posteriormente se mezclaba con el oxidante, proporcionando un procedimiento sumamente simple, económico y efectivo. Desde entonces, un gran número de este tipo de reacciones ha sido publicado, principalmente en el análisis de fármacos [38]. Para aumentar la emisión de QL se han añadido a estos sistemas sensibilizadores, medios micelares o catalizadores. Como ejemplos podemos citar la determinación de penicilamina [39], tiopronina [40], cefadroxil [41] en presencia de sulfato de quinina; ácido fólico [42], captopril [43], hidrocloreotiazida [44], fenotiazinas [45] o furosemida [46] usando rodaminas 6G o B e hidracina en presencia de diclorofluoresceína [47]. El sulfato de quinina y la rodamina 6G se han utilizado conjuntamente para la determinación de tiopronina [48]. También, en presencia de un surfactante catiónico, bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) se ha determinado tetraciclina con una alta sensibilidad [49]. Todas estas reacciones han sido aplicadas principalmente a métodos por inyección en flujo con detección quimioluminiscente.

#### 4. Instrumentación básica

La medida de la luz emitida por una reacción química o bioquímica está relacionada con la concentración de las especies participantes: la producción total de luz está directamente relacionada con la cantidad de luz emitida y, consecuentemente, es proporcional a la concentración de la especie concreta. Por esta razón, la medida de luz emitida es un indicador de la cantidad de analito presente y al instrumento básico que es capaz de realizar estas medidas se le llama luminómetro. Una de las ventajas más importantes de la QL como técnica analítica es la simplicidad de la instrumentación, que incluye como componentes principales: una célula de reacción, un compartimento cerrado a la luz, un dispositivo de inyección y mezcla de reactivos y/o de muestra, un detector de luz y un sistema de adquisición y procesador de señal (**Figura 7**). En el compartimento cerrado se coloca la célula de reacción (un tubo de ensayo, un microplato, una célula de flujo, etc.) con objeto de que toda la luminiscencia sea captada por el detector.

Este compartimento debe estar sellado a luz ambiental para evitar posibles interferencias y se debe colocar tan cerca como sea posible del detector para conseguir una máxima eficiencia óptica. Espejos, lentes y otros dispositivos adicionales se pueden utilizar para aumentar el ángulo de detección y conseguir una alta eficiencia óptica, al objeto de obtener una relación señal-ruido óptima; así, se obtiene un instrumento rápido y preciso. La función del compartimento es mantener la mezcla de reactivo y muestra, a una temperatura adecuada y en completa oscuridad a fin de aislar el detector de la luz externa. Normalmente no es necesario el uso de monocromadores porque la intensidad de QL que surge de una de las especies no se ve apenas afectada en su distribución espectral, por la presencia de otras especies.



**Figura 7**  
**Esquema del dispositivo instrumental**

En las técnicas de QL, una vez mezclados los reactivos y la muestra, comienza la reacción quimioluminiscente, y la intensidad de la emisión que se está produciendo disminuye una vez que los reactantes se han agotado. Esto supone que el carácter de la emisión quimioluminiscente es transitorio, y que la escala de tiempo depende de la reacción en cuestión, que va de un corto flash a una emisión continua. Este hecho es crucial para la selección del sistema más conveniente para la incorporación de los reactivos.

## 5. Futuras perspectivas

Hoy en día, el interés analítico de la QL está aumentando considerablemente debido a las ventajas ya comentadas, como bajos límites de detección, rangos dinámicos amplios, alta sensibilidad y la gran versatilidad de los métodos QL. Recientemente, las investigaciones se están centrando especialmente en el desarrollo de productos quimioluminiscentes para aplicaciones de diagnóstico clínico; así, la QL es hoy en día un posible sustituto del marcado isotópico, remplazando así el uso de radioisótopos [50]. La QL se aplica también en el control de calidad de productos cárnicos y residuos, existiendo igualmente aplicaciones en la medida del ozono ambiental.

Siguiendo la tendencia general en análisis químico, la mejora en los métodos de detección está dirigida actualmente a la miniaturización y, por lo tanto, a reducir el gasto de disolventes orgánicos en métodos de separación, empleando más sistemas acuosos y volúmenes de muestra menores con concentraciones inferiores. Como las técnicas quimioluminiscentes pueden proporcionar mejoras en estas situaciones, la instrumentación para medidas quimioluminiscentes y el desarrollo de acoplamientos con interfaces selectivas físicas o químicas que permitan medidas selectivas están también dirigidos a conseguir este fin, de modo que puedan eliminarse las desventajas de las técnicas basadas en medidas directas de QL (como falta de selectividad o dependencia de factores físico-químicos). Así, se están publicando progresivamente avances específicos en cromatografía, EC, inmunoensayo y en el uso de reactores enzimáticos. Desde este punto de vista, los sistemas miniaturizados (“microchip”) son muy atractivos, ya que puede resolver el problema de los límites de detección poco satisfactorios característicos de estos sistemas [51].

Asimismo, el problema del gasto de disolvente está potenciando gradualmente el uso de sistemas analíticos de separación miniaturizados, tales como la cromatografía líquida capilar y de columnas de pequeño diámetro (“narrow-bore”) frente a la CLAR, cromatografía en capa fina de alta resolución miniaturizada, y recientemente EC. Debido a que la QL puede resolver las limitaciones en la detección en estos casos, resulta previsible el desarrollo de este acoplamiento en la próxima década. Como ejemplo, puede mencionarse un sistema descrito recien-

temente, basado en detección quimioluminiscente de enzimas y que emplea la técnica denominada “microensayo a través de electroforesis” (EMMA, electrophoretically mediated microassay), que permite la detección de enzimas a niveles de *zeptomoles*, tanto en capilares abiertos como en canales realizados en microchips, detectándose la oxidasa y catalasa a niveles de 9000 moléculas y empleando una instrumentación relativamente económica.

Sin ninguna duda, cuando se compara con otros métodos de detección convencionales y sensibles (fluorescentes o electroquímicos), la detección QL es una técnica en pleno desarrollo y sus avances se dirigen hacia el desarrollo de nuevos detectores más simples que los ya existentes y que ofrezcan la posibilidad de determinar varias clases de analitos a niveles traza.

**BIBLIOGRAFÍA**

- <sup>1</sup> García-Campaña, A.M., Baeyens, W.R.G., *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*. New York: Marcel Dekker, **2001**.
- <sup>2</sup> García-Campaña, A.M., Baeyens, W.R.G., *Analisis* **2000**; 28: 686-698.
- <sup>3</sup> García-Campaña, A.M., Baeyens, W.R.G., Cuadros-Rodríguez, L., Alés Barrero, F., Bosque-Sendra, J.M. y Gámiz Gracia, L. *Current Organic Chemistry* **2002**; 6: 2001-2020.
- <sup>4</sup> García-Campaña, A.M., Gámiz Gracia, L., Baeyens, W.R.G y Alés Barrero, F. *J. Chromatog. B* 2003; 793: 49-74.
- <sup>5</sup> Campbell. *Chemiluminescence. Principles and Applications in Biology and Medicine*. Chichester: Ellis Horwood/VCH, **1988**.
- <sup>6</sup> Culliford B.J. *The Examination and Typing of Bloodstains in the Crime Laboratory*; US Gov't Printing Office: Washinton DC, **1971**.
- <sup>7</sup> Easwaramoorthy, D., Yueh-Chuan, Y., Hsuan-Jung, H., *Anal. Chim. Acta* **2001**; 439: 95-100.
- <sup>8</sup> Bueno Vargas, M.P., García-Campaña, A.M., Bosque Sendra, J.M. Zhang, X. *Luminescence* **2002**; 17: 204-205.
- <sup>9</sup> Aly, F.A., Nawal, A.A., Abdulrahman, A.A., *Anal. Chim. Acta* **2000**; 414: 15-23.
- <sup>10</sup> Lu, J., Choiwan, L., Yagisawa, S., Ohta, K., Kai, M. *J Pharm Biomed Anal* **2003**; 33:1033-1038.
- <sup>11</sup> White, E.H., Harding, M.J.C. *Photochem Photobiol* **1965**; 4: 1129-1134.
- <sup>12</sup> Nakashima, K., Yamasaki, R., Shimoda, R., Kuroda, N., Akiyama, S., Baeyens, W.R.G. *Biomed. Chromat.* **1997**; 11: 63-64.
- <sup>13</sup> Gleu K.; Petsch, W. *Angew Chem* **1935**; 48: 57-59.
- <sup>14</sup> Rauhut M.M., Sheehan D., Clarke R.A., Semsel A.M. *Photochem Photobiol* **1965**; 4: 1097-1110.
- <sup>15</sup> Rauhut M.M., Sheehan D., Clarke R.A., Roberts B.G., Semsel A.M. *J Org Chem* **1965**; 30: 3587-3592.
- <sup>16</sup> Klopff, L.L.; Nieman, T.A. *Anal Chem* **1984**; 56: 1539-1542.
- <sup>17</sup> Kawashima, T., Hasebe, T. *Anal Sci* **1996**; 12: 773-777.
- <sup>18</sup> Lee, W.Y., Nieman, T.A. *Anal Chim Acta* **1996**; 334: 183-191.
- <sup>19</sup> Han, H.Y., He, Z.K., Zeng, Y.E. *Fresenius J Anal Chem* **1999**; 364: 782-785.
- <sup>20</sup> Schuster G.B. *Acc Chem Res* **1979**; 12: 366-373.
- <sup>21</sup> Gámiz Gracia, L., García-Campaña, A.M., Alés Barrero, F., Cuadros Rodríguez, L., Schiavone, M., Baeyens, W.R.G. *Luminescence* **2002**; 17: 201-204.
- <sup>22</sup> Gámiz Gracia, L., García-Campaña, A.M., Alés Barrero, F., Cuadros Rodríguez, L. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**; 377: 281-286.
- <sup>23</sup> Kuroda, N., Nakashima, K. In *Modern Derivatization Methods for Separation Sciences*; Toyoko'oka, T., Ed.; Wiley: New York, **1999**, Chapter 4.
- <sup>24</sup> DeLuca M.A., McElroy W.D. *Methods Enzymol* **1978**; 57:1-124.
- <sup>25</sup> Poullis J.A., de Pijper M. *Int J Food Microbiol* **1993**; 20:109-116.

- <sup>26</sup> Tuovila B.J., Dobbs F.C., LaRock P.A., Siegel B. *Appl Environ Microbiol* **1987**; 53: 2749-2753.
- <sup>27</sup> Arretxe, M., Heap, J. M., Christofi, N. *Int Environ Toxicol Water Qual* **1997**; 12:23-29.
- <sup>28</sup> Hoffer, S., Jimenez-Misas, C., Lundin, A. *Luminescence* **1999**; 14:255-261.
- <sup>29</sup> Nielsen, P., Van Dellen, E. *JAOAC Int* **1989**; 72: 708-711.
- <sup>30</sup> Storgårds E., Juvonen R., Vanne L., Haikara A.. *Detection methods in process and hygiene control. European Brewery Convention, Monograph 26-Symposium Quality Issues & HACCP, Stockholm, Sweden, 1997*, pp 95-107.
- <sup>31</sup> Sorlini, C., Cesarotti, E. *Ann Microbiol* **1991**; 41: 267-276.
- <sup>32</sup> Andreotti, P.E., Berthold, F. *Luminescence* **1999**; 14: 19-22.
- <sup>33</sup> Abbott, R.W., Townshend A. *Anal Proc* **1986**; 23: 25-26.
- <sup>34</sup> Abbott, R.W., Townshend, A., Gill, R. *Analyst* **1986**; 111: 635-640.
- <sup>35</sup> Alwarthan, A.A., Townshend, A. *Anal Chim Acta* **1986**; 185: 329-353.
- <sup>36</sup> Andrews, A.R.J., Townshend A. *Anal Chim Acta* **1989**; 26: 368-369.
- <sup>37</sup> Paseková, H., Polásek, M. Cigarro, J.F., Dolejšová, J. *Anal Chim Acta* **2001**; 438: 165-173.
- <sup>38</sup> Calokerinos, A.C., Deftereos, N.T., Baeyens, W.R.G. *J Pharm Biomed Anal* **1995**; 13, 1063-1071.
- <sup>39</sup> Zhang, Z.D., Baeyens, W.R.G., Zhang, X.R., Van der Weken, G. *Analyst* **1996**; 121, 1569-1572.
- <sup>40</sup> Zhao, Y.N., Baeyens, W.R.G., Zhang, X.R., Calokerinos, A.C., Nakashima, K., Van der Weken, G. *Analyst* **1997**; 122: 103-106.
- <sup>41</sup> Aly, F.A., Alarfaff, N.A., Alwarthan, A.A. *Talanta* **1998**; 47: 471-478.
- <sup>42</sup> Alwarthan, A.A. *Anal Sci* **1994**; 10: 919-922.
- <sup>43</sup> Zhang, Z.D., Baeyens, W.R.G., Zhang, X.R., Van der Weken, G. *J Pharm Biomed Anal* **1996**; 14: 939-945.
- <sup>44</sup> Ouyang, J., Baeyens, W.R.G., Delanghe, J., Van der Weken, G., Calokerinos, A.C. *Talanta* **1998**; 46, 961-968.
- <sup>45</sup> Aly, F.A., Alarfaj, N.A., Alwarthan, A.A. *Anal Chim Acta* **1998**; 358: 255-262.
- <sup>46</sup> Rao, Y., Zhang, X.R., Luo, G., Baeyens, W.R.G. *Anal Chim Acta* **1999**; 396: 273-277.
- <sup>47</sup> Safavi, A., Baezzat, M.R. *Anal Chim Acta* **1998**; 358, 121-125.
- <sup>48</sup> Pérez Ruiz, T.; Martínez Lozano, J.; Baeyens, W.R.G., Sanz, A., San Miguel, M.T. *J Pharm Biomed Anal* **1998**; 17: 823-828.
- <sup>49</sup> Li, Z., Wang, Z.B. *Xiamen Dauxue Xuebao* **1997**; 36: 804-807.
- <sup>50</sup> Roda, A., Guardigli, M., Pasini, P., Mirasoli, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**; 377:826-833.
- <sup>51</sup> Greenwood, P.A., Merrin, C., McCreeedy, Greenway, G.M. *Talanta* **2002**; 56:539-545.



# IMITANDO A LA NATURALEZA: NANOAPATITAS

**Dra. Dña. María Vallet Regi**

Universidad Complutense.  
Catedrática de Química Inorgánica de la Facultad de  
Farmacia de la UCM.

---

Imitando a la Naturaleza: Nanoapatitas

Los huesos y los dientes de todos los vertebrados son materiales compuestos, *composites naturales*, donde uno de los componentes es un sólido inorgánico, *hidroxiapatita carbonatada*. Aporta el 65% de la masa total del hueso siendo el resto materia orgánica y agua. La mayor parte de la materia orgánica está constituida por colágeno. Sus moléculas se asocian formando fibrillas y estas a su vez se organizan en fibras que dan origen a diversas estructuras macroscópicas (**Figura 1**). Entre las moléculas quedan, de forma regular, pequeños compartimentos o espacios vacíos donde se depositan los nanocrisales de la apatita, en un proceso de biomineralización controlado en el que intervienen más de doscientas proteínas ácidas diferentes. Estas proteínas actúan como inhibidores, nucleadores ó como plantillas para el crecimiento epitaxial de los nanocrisales, anclándolos al colágeno (<sup>1,2</sup>).

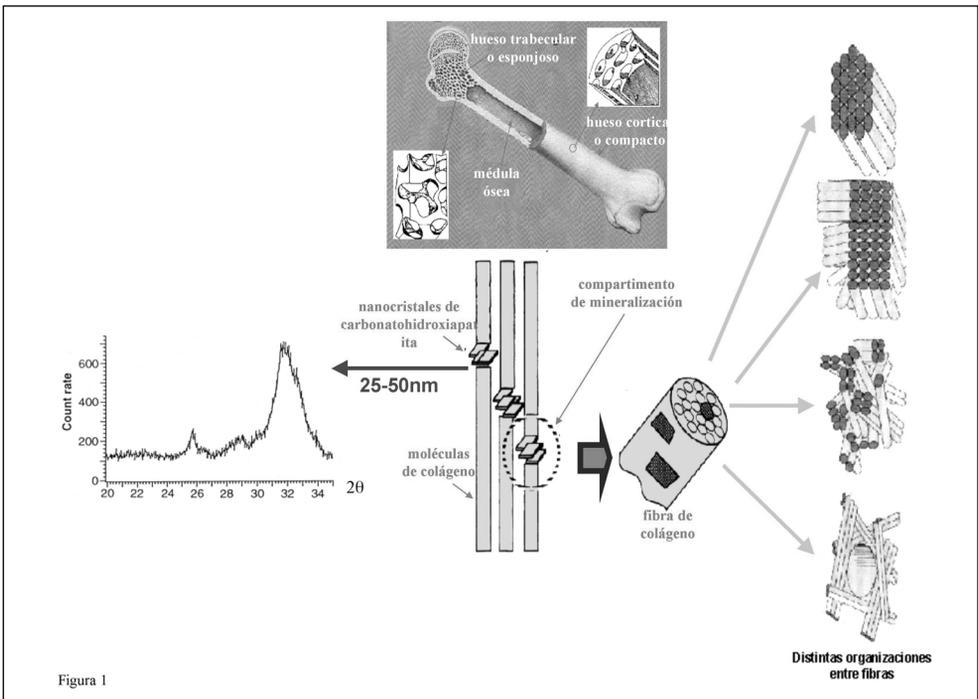
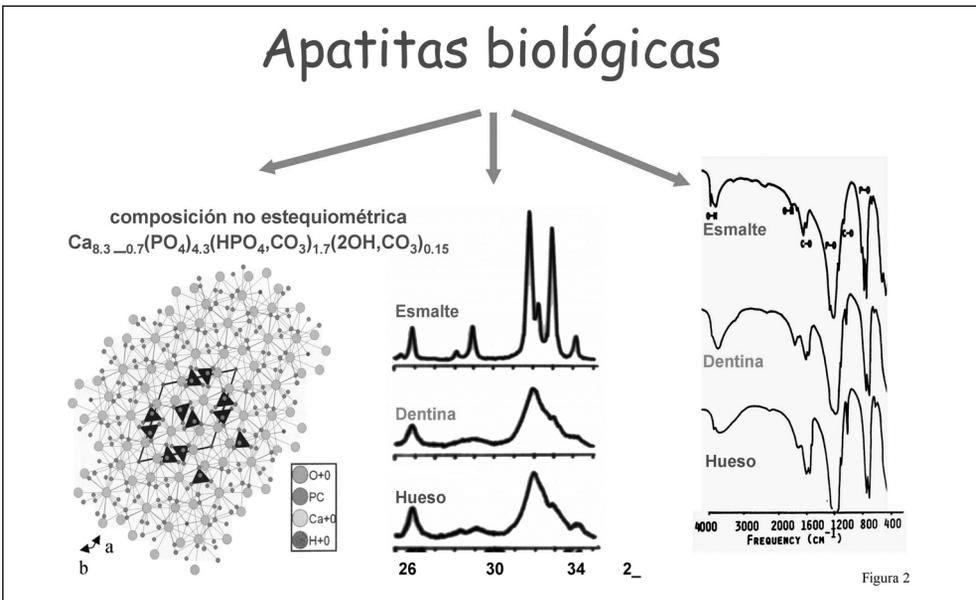


Figura 1

**Fig. 1. Hueso cortical o compacto y hueso trabecular esponjoso. Organización de carbonatoapatita y colágeno para formar tejidos duros. Son posibles diferentes microestructuras. Difractograma de RX que indica el pequeño tamaño de las apatitas.**

Imitando a la Naturaleza: Nanoapatitas

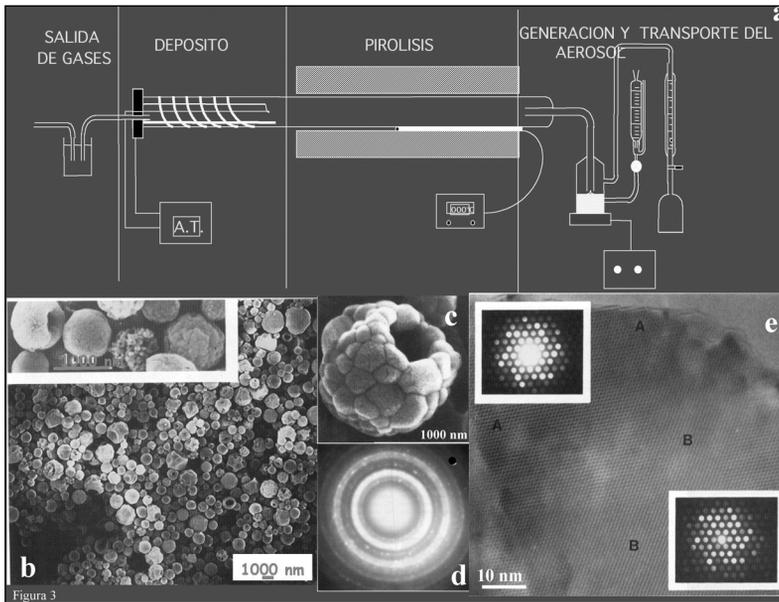
Los huesos tienen una composición, estructura cristalina, morfología, tamaño y orientación de las partículas, específicas. La hidroxiapatita carbonatada de los huesos, tiene un contenido en carbonato entre el 4 y 8 % que se incrementa con la edad a costa del ión hidrógenofosfato. Los cristales son de tamaño nanométrico, con una longitud media de 50 nm, una anchura de 25 nm y un espesor de solo 2-5 nm, dispersos en la matriz orgánica. Su pequeño tamaño es un factor muy importante para explicar la solubilidad de las apatitas biológicas comparadas con las apatitas minerales. Pequeño tamaño y baja cristalinidad son dos características típicas de apatitas biológicas, que junto a su composición no estequiométrica, desorden cristalino interno y presencia de iones carbonato en su red cristalina permiten explicar su comportamiento **(Figura 2)**.



**Fig. 2. Estructura cristalina de la hidroxicarbonatoapatita. Diagrama de RX de esmalte, dentina y hueso. Espectros infrarrojos de esmalte, dentina y hueso.**

Los huesos de los vertebrados a diferencia de las conchas de los moluscos se pueden considerar como un *“biomineral vivo”* porque en su interior existen células que están en constante actividad. El proceso

Imitando a la Naturaleza: Nanoapatitas



**Fig. 3. Esquema del método pirosol para la obtención de materiales en polvo. Micrografías SEM y TEM y diagrama de difracción de electrones de las partículas y nanocrisales de apatita obtenidas por este método.**

de formación del hueso se inicia por la acción de los osteoblastos, células especiales que sintetizan y segregan la matriz de colágeno en forma de una sustancia gelatinosa, el *osteoides*, que posteriormente se mineraliza por precipitación controlada de fosfato de calcio. Los osteoblastos quedan atrapados en el interior de la fase mineral evolucionando a *osteocitos* que mantienen de forma constante la acción formadora de hueso. Por otra parte otras células, los *osteoclastos*, catabolizan el hueso destruyéndolo. Este proceso dinámico de formación y destrucción del hueso permite su crecimiento durante la época de desarrollo del organismo, manteniendo su forma y consistencia, y su regeneración cuando se produce una fractura. Al mismo tiempo constituye el mecanismo de movilización y depósito de dos elementos esenciales, el fósforo y el calcio, de los que los huesos constituyen el almacén o reserva principal.

Los dientes tienen la misma naturaleza que los huesos excepto en su capa superficial externa, el *esmalte*. El esmalte dental tiene un conte-

Imitando a la Naturaleza: Nanoapatitas



**Fig. 4. Esquema del método de cristalización controlada. Micrografías TEM y DE de los nanocristales de apatita obtenidos.**

nido inorgánico mucho mayor que el del hueso, hasta un 90 %, y contiene cristales prismáticos, mucho más grandes y muy orientados. Todo ello justifica su distinto comportamiento mecánico. De hecho, el esmalte se considera el material más duro y resistente del mundo biológico. Sin embargo, a diferencia del hueso, el esmalte dental de un organismo adulto no contiene células por lo que no es capaz de regenerarse y cualquier deterioro que sufre resulta irreversible.

El fosfato de calcio más utilizado en la fabricación de implantes es la hidroxiapatita, por ser el compuesto más parecido al componente mineral de los huesos. Presenta buenas propiedades como biomaterial, *biocompatibilidad*, *bioactividad*, *osteoconductividad*, *unión directa al hueso*, etc. Dentro del abanico de los fosfatos de calcio existentes, o de posible formulación, es importante conocer la estrecha dependencia entre relación Ca/P, acidez y solubilidad. En efecto, cuanto menor es la relación Ca/P, mayor es la acidez y solubilidad de la mezcla. Para

## Imitando a la Naturaleza: Nanoapatitas

relaciones  $\text{Ca/P} < 1$ , tanto acidez como solubilidad son muy elevados, y estos parámetros disminuyen mucho para relaciones  $\text{Ca/P}$  próximos al valor 1.67, que es el valor de la hidroxiapatita estequiométrica,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  <sup>(3, 4)</sup>.

Las fases minerales que forman los organismos se pueden intentar reproducir en el laboratorio o por vías geoquímicas. Sin embargo, las condiciones bajo las cuales se forman son muy distintas, pues en el entorno biológico prevalecen unas condiciones mucho menos estrictas. Es importante destacar el hecho de que los minerales biogénicos suelen diferir de sus correspondientes inorgánicos en dos aspectos muy concretos: la *morfología* y el *modo* en que se ordenan dentro del sistema biológico.

Es muy probable que existan mecanismos generales para la formación de estos minerales y, si pudiésemos entender los *principios comunes* que determinan su formación, sería posible generar otros nuevos o modificar los ya existentes para una amplia gama de aplicaciones en ciencia de materiales, incluido el campo de los biomateriales.

En el afán de obtener nanoapatitas en el laboratorio se han puesto a punto diversos métodos, entre los que puedo citar el *método pirosol*, por el cual, a partir de un aerosol, se pueden obtener nanopartículas de hidroxiapatita, formadas a su vez por miles de nanocristales <sup>(5)</sup>, o el *de cristalización controlada*, por el cual también es posible la obtención de nanocristales de hidroxiapatita carbonatada <sup>(4)</sup>. A su vez, la posibilidad de trabajar a distintas temperaturas permite diseñar el tamaño de estos cristales. Así, en la **(Figura 4)** pueden observarse la distinta morfología, cristalinidad y tamaño de cristal al trabajar a temperatura ambiente o a 90° C. Esto permite poder ajustar estos parámetros, en función del tamaño de cristal que se quiera obtener.

El método de *solidificación de disoluciones líquidas* (Liquid Mix Technique en la bibliografía inglesa) es otro procedimiento químico que permite obtener grandes cantidades de carbonato hidroxiapatita y otros fosfatos, útiles para la fabricación de implantes <sup>(6)</sup>. En la **(Figura 5)** se pueden observar las distintas etapas de esta vía de síntesis química, que constituye un procedimiento reproducible, no complicado, con un alto

Imitando a la Naturaleza: Nanoapatitas

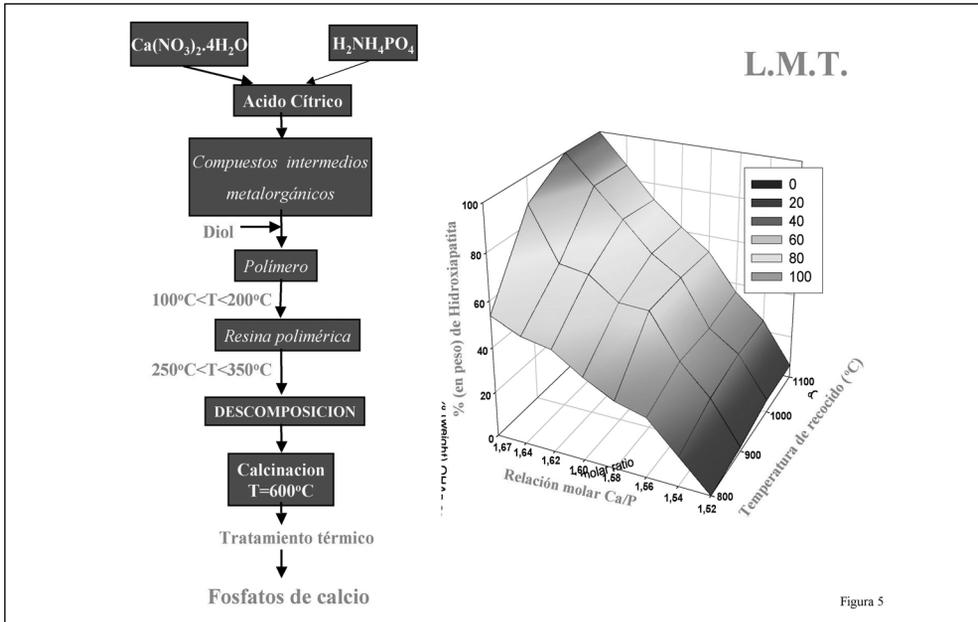


Figura 5

**Fig 5. Esquema del método L.M.T. Diagrama de estabilidad de hidroxiapatita frente a la temperatura de recocido.**

rendimiento de producto y que a su vez se puede sintetizar en grandes cantidades en cada operación. Esto permite obtener lotes idénticos de producto, y seleccionar, en función de las condiciones de síntesis, la obtención de hidroxiapatita,  $\beta$ -fosfatotricálcico, o mezclas binarias con composiciones predefinidas, que evolucionan, bajo condiciones fisiológicas, a nanoapatitas carbonatadas.

En la actualidad, para todas aquellas aplicaciones clínicas que requieran soportar carga, se están utilizando implantes, en su mayoría metálicos, lo que origina problemas importantes debido a:

- la gran diferencia de propiedades mecánicas entre el implante artificial y el hueso natural, lo que da lugar a *rupturas*,
- la presencia de iones que, procediendo del implante artificial, pueden ser tóxicos o perjudiciales y son causa de *dolor*,
- y la imposibilidad de regenerar el hueso natural.

Una alternativa, para paliar en parte estos problemas mientras no se logre un material similar al hueso es recubrir el implante metálico con cerámicas.

Esto se está realizando tanto en implantes dentales como en prótesis de cadera, aunque el camino que hay que recorrer es todavía muy largo para mejorar estos productos.

El proceso de recubrimiento de un metal por una cerámica es complejo y existen muchos métodos para realizarlo. De él depende, en gran parte, el éxito clínico, ya que la calidad y la duración de la fijación en la interfaz dependen en gran medida de la *pureza, tamaño de partícula, composición química del recubrimiento, espesor de la capa y características superficiales del sustrato*.

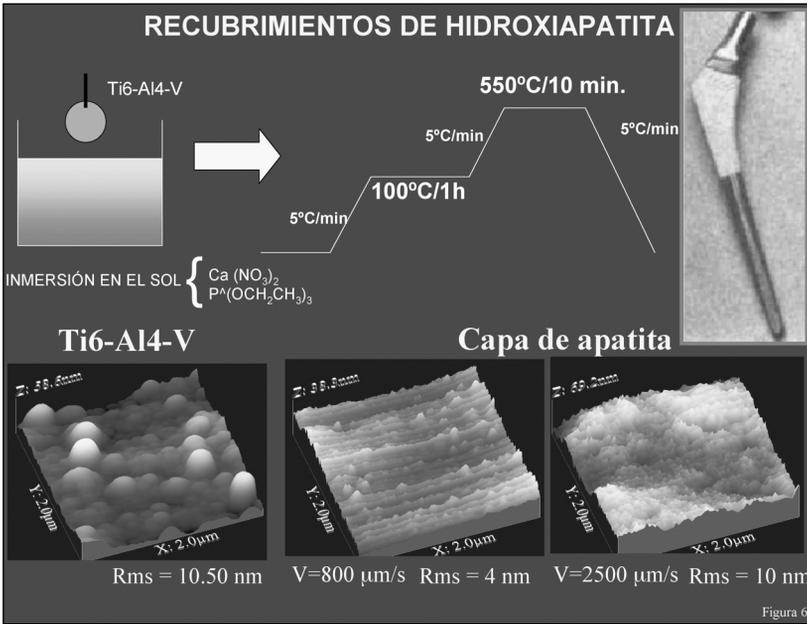
Otra de las ventajas que se obtienen al recubrir un implante metálico por una cerámica es la *reducción de la liberación de iones procedentes de la aleación metálica*. La cerámica constituye una verdadera y eficaz barrera que ralentiza la cinética de difusión de iones metálicos al organismo vivo.

Por esta razón, se está utilizando la hidroxiapatita, para mejorar la fijación de las prótesis articulares de cadera, dadas sus excelentes propiedades biológicas. Uno de los procedimientos químicos para recubrir implantes metálicos con hidroxiapatita es el método de *inmersión* <sup>(7)</sup>. En la **(Figura 6)** se esquematiza este procedimiento, que es altamente operativo.

Otro procedimiento es el *método pirosol*, donde a partir de un aerosol se pueden sintetizar recubrimientos cerámicos, y donde una vez más, en función de las condiciones de síntesis, se pueden obtener distintas morfologías de la capa depositada <sup>(8)</sup>.

En 1971 Hench y col. descubrieron que ciertas composiciones de vidrios se enlazan al hueso<sup>(9,10)</sup> **(Figura 8)**. A dichos vidrios se les denomina *vidrios bioactivos* y han sido objeto de numerosos estudios, con vistas a su utilización clínica como implantes para la sustitución y reparación de tejidos óseos. La unión con el hueso se produce a través de una capa de hidroxicarbonatoapatita formada en la superficie de los vidrios bioactivos cuando entran en contacto con los fluidos biológicos. Dicha capa se forma como consecuencia de la alta reactividad de los vidrios en un medio acuoso, que propicia un rápido intercambio de los

Imitando a la Naturaleza: Nanoapatitas



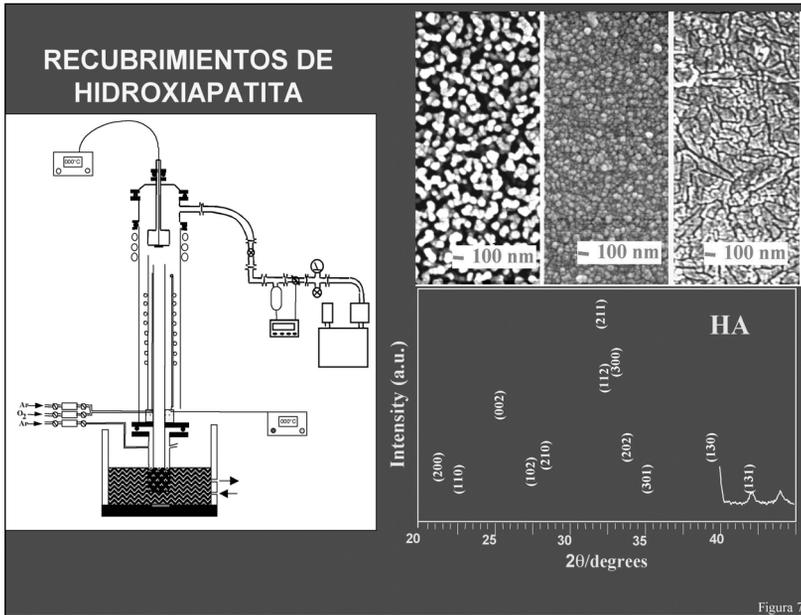
**Fig 6. Obtención de recubrimientos de hidroxiapatita por el método de inmersión. Micrografías de fuerza atómica del sustrato (Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V) y de los recubrimientos de hidroxiapatita.**

iones de la superficie del vidrio con los de los fluidos circundantes. Este proceso produce una variación de la concentración iónica del fluido y, simultáneamente, la formación de una capa de gel de sílice en la superficie del vidrio, favoreciendo ambos efectos la cristalización de hidroxicarbonatoapatita. La **Figura 9** esquematiza un posible mecanismo.

Los vidrios bioactivos reaccionan con los fluidos, y como producto de la reacción se forma carbonatoapatita. Este tipo de ensayos se pueden realizar en muy diversos fluidos, pero de cara a las aplicaciones que se buscan, una buena elección es utilizar un fluido fisiológico simulado, que tenga los mismos iones y en concentraciones similares a las del plasma<sup>(11)</sup>. El ensayo *in vitro* se puede llevar a cabo en sistema *estático*, o en sistema *dinámico* para reproducir mejor las condiciones en las que se encontrará el vidrio cuando se ensaye *in vivo*<sup>(12,13, 14, 15)</sup>.

Una vez crecida la capa de carbonatoapatita sobre la superficie de vidrio, se puede caracterizar por técnicas de superficie<sup>(16,17, 18, 19, 20)</sup>. Como

Imitando a la Naturaleza: Nanoapatitas



**Fig. 7. Obtención de recubrimientos de hidroxiapatita por el método pirosol. Difractograma de RX y micrografías de SEM de tres microestructuras de tres recubrimientos diferentes de hidroxiapatita, obtenidos con diferentes condiciones de síntesis.**

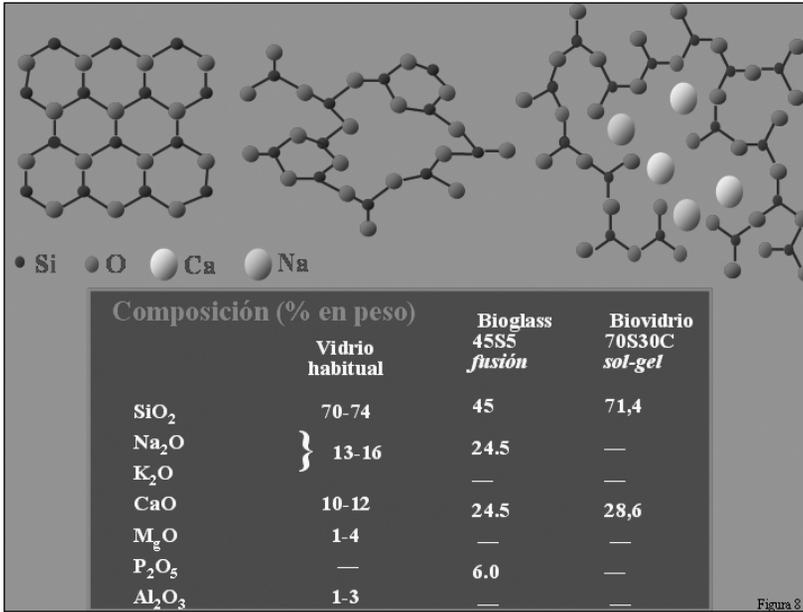
ejemplo, veamos la información que nos suministra la incidencia rasante de difracción de RX (**Figura 10**). En efecto, al cabo de 3 días el perfil de difracción es similar al del hueso (comparar con figuras 1 y 2).

La microscopía de barrido (SEM) nos permite visualizar la morfología de la capa de carbonatoapatita, y la de transmisión (TEM), la forma acicular de sus cristales, así como su tamaño, que oscila entorno a los 50 nm. La difracción de electrones permite afirmar que se trata de un material policristalino nanométrico, donde los halos de difracción pueden corresponder a una fase tipo apatita (**Figura 10**).

El espesor de la capa se puede estudiar por SEM, practicando un corte transversal a la muestra, como puede observarse en la **Figura 11**. Los espesores que se alcanzan oscilan entre 2 y 10  $\mu\text{m}$ .

La técnica de espectroscopia de dispersión de energías (EDS) nos confirma que la composición química de esta capa es calcio y fósforo, y

Imitando a la Naturaleza: Nanoapatitas



**Fig 8. Sílice cristalina, amorfa y amorfa con iones calcio y sodio actuando como modificadores de la red. Composición de un vidrio corriente, del vidrio bioactivo patentado por Hench (Bioglass45S5), y de un vidrio bioactivo obtenido por Vallet *et al.***

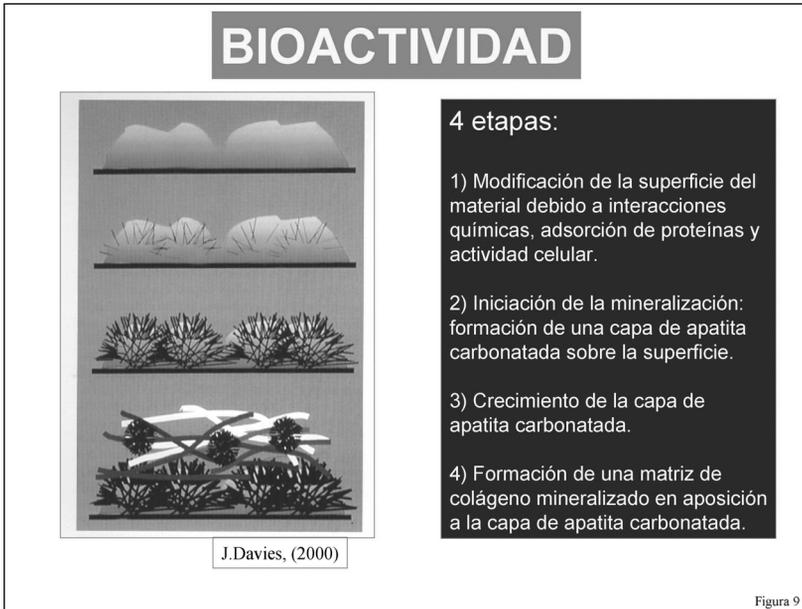
la técnica de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (IRTF) la presencia de carbonatos.

Cada una de estas técnicas, individualmente, no permitirían concluir que la capa recién formada sobre la superficie de estos vidrios bioactivos es *carbonatohidroxiapatita*, pero la conjunción de la información recogida por todas ellas, nos conduce a afirmar que la apatita crecida sobre la superficie de estas piezas es semejante a las apatitas biológicas, esto es, nanocristalina y no estequiométrica con presencia de carbonato.

Otras técnicas como resonancia magnética nuclear de sólidos (RMN) y espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) pueden reforzar la caracterización de esta capa<sup>(21)</sup>.

La *ingeniería de tejidos*, iniciada hace una década, está en pleno apogeo investigador y dando los primeros frutos en desarrollo. Consiste en

Imitando a la Naturaleza: Nanoapatitas



**Fig 9. Posible mecanismo de bioactividad.**

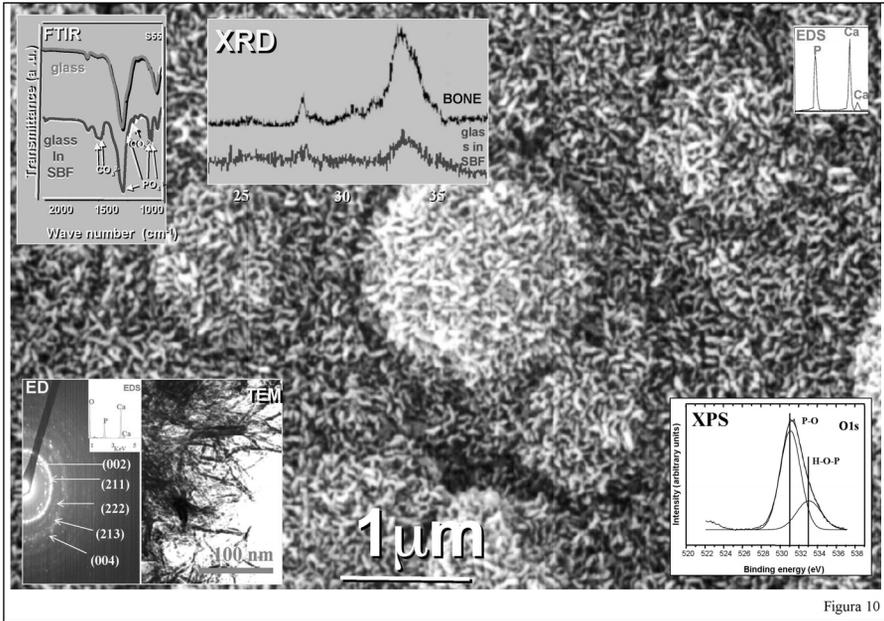
disponer de un andamio fabricado con un material artificial, por ejemplo, con una biocerámica (**Figura 12**).

La posibilidad de conformar piezas cerámicas con porosidad diseñada, para utilizarlas como sustratos en ingeniería tisular, abre un espectacular futuro para los fosfatos de calcio y otras biocerámicas. Sobre el sustrato se cultivan células para que la pieza llegue a colonizarse. Esto puede realizarse tanto *in vitro* como *in vivo*.

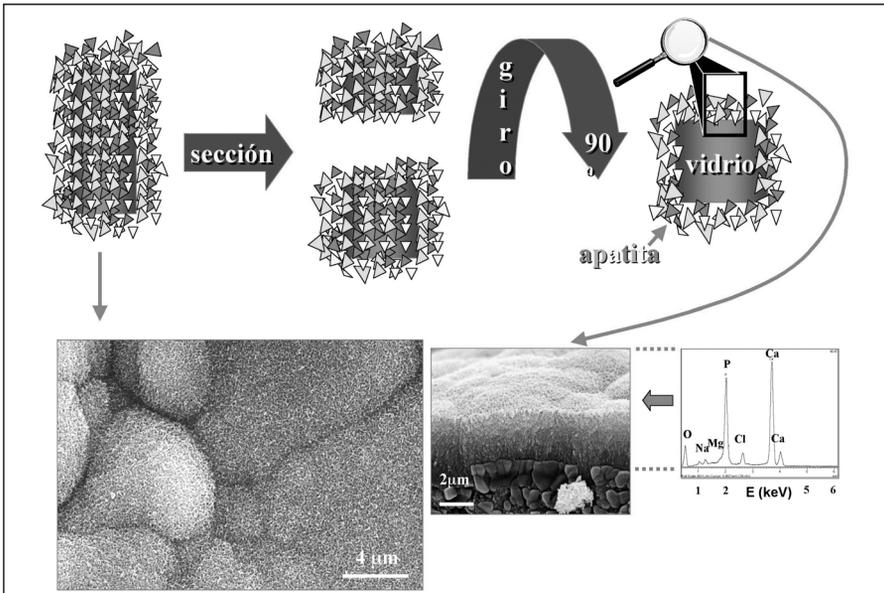
Uno de los objetivos primordiales es el desarrollo de materiales para lograr la reparación funcional y la reconstrucción de estructuras biológicas. En este sentido se está dedicando especial atención a la obtención y caracterización de superficies de diferentes sustratos, para su aplicación en el desarrollo de andamios tridimensionales utilizables en ingeniería de tejidos.

Uno de los aspectos prioritarios es el estudio y modificación de las propiedades superficiales de los sustratos, con el fin de modular su interacción con entidades biológicas tales como macromoléculas y células <sup>(22, 23, 24, 25)</sup>. La estrategia de reparación y sustitución de partes

Imitando a la Naturaleza: Nanoapatitas

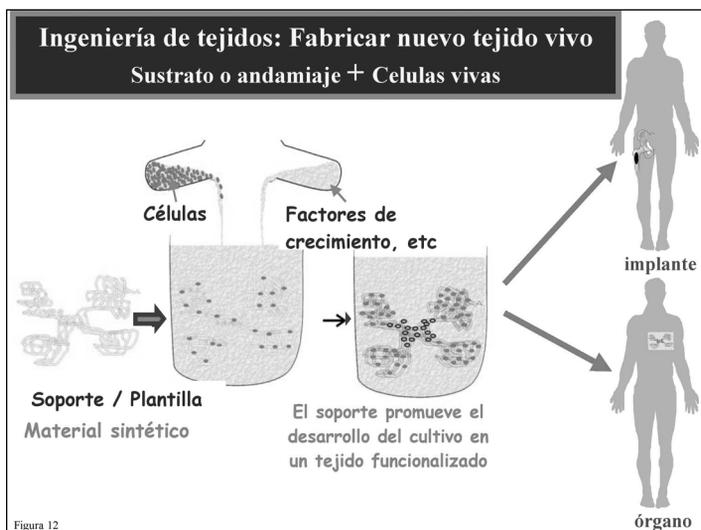


**Fig 10. Caracterización de la capa de nanocarbonatoapatita por las técnicas de FTIR, RX, EDS, SEM, TEM y XPS.**



**Fig 11. Imagen de la superficie y el espesor de un vidrio sobre el que se ha formado carbonatohidroxiapatita. EDS de la capa formada.**

Imitando a la Naturaleza: Nanoapatitas



**Fig 12. Esquema de utilización de sustratos en ingeniería de tejidos.**

dañadas del organismo será, en un futuro próximo, claramente distinta a la de los implantes biomédicos tradicionales, utilizados en la actualidad.

Como conclusión puede afirmarse que se pueden obtener en el laboratorio nanocarbonatoapatitas equivalentes a las apatitas biológicas. Esto ya no es un problema, y de hecho se pueden llegar a ellas a través de distintos procedimientos químicos.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) S. Mann, J. Webb, RJP. Williams. Biomineralization. Chemical and Biochemical perspectives. VCH. Germany. 1989
- (2) Introducción a la Química Bioinorgánica. M. Vallet, J. Faus, J. Moratal, E. García-España. Editorial Síntesis. Madrid. 2003
- (3) M. Vallet-Regí. Anales de Química. International Edition. Suplemento 1. 93.1, S6-S14, 1997
- (4) L.M. Rodríguez-Lorenzo, M. Vallet-Regí. Chemistry of Materials. 12 (8), 2465, 2000
- (5) M. Vallet-Regí, M.T. Gutiérrez Ríos, M.P. Alonso, S. Nicolopoulos. J. Solid State Chemistry. 112, 58-64. 1994
- (6) J. Peña, M. Vallet-Regí. J. Europ. Ceram. Soc. 23, 1687, 2003
- (7) I. Izquierdo-Barba, A. Asenjo, L. Esquivias, M. Vallet-Regí. Eur. Inorg. Chem. 1608, 2003

## Imitando a la Naturaleza: Nanoapatitas

- (8) M.V. Cabañas, M. Vallet-Regí. *J. Mater. Chem.* 13, 1104, 2003
- (9) Hench L.L. et al. *J. Biomed. Mater. Res.* 2, 17, 1971
- (10) Hench L.L. et al. *Science.* 295, 1016, 2002
- (11) T. Kokubo, H. Kushitani, S. SAC, T. Kitsugi and T. Yamamuro. *J. Biomed. Mater. Res.* 24, 721, 1990
- (12) I. Izquierdo-Barba, A.J. Salinas, M. Vallet-Regí. *J. Biomed. Mater. Res.* 51, 191, 2000
- (13) A. Rámila, M. Vallet-Regí. *Biomaterials.* 22/16, 2301, 2001
- (14) M. Vallet-Regí, A. Rámila. *Chemistry of Materials.* 12, 961, 2000
- (15) A. Martínez, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí. *Chemistry of Materials.* 12, 3080, 2000
- (16) M. Vallet-Regí. Perspective article. *J. Chem. Dalton Trans.* 02, 97, 2001
- (17) M. Vallet-Regí, C.V. Ragel, A.J. Salinas. *European Journal of Inorganic Chemistry,* 1029, 2003
- (18) A. Rámila, S. Padilla, B. Muñoz, M. Vallet-Regí. *Chemistry of Materials.* 14, 2439, 2002
- (19) D. Arcos, J. Peña, M. Vallet-Regí. *Chemistry of Materials.* 15(21), 4132, 2003
- (20) CV. Ragel, M. Vallet-Regí. *J. Biomed. Mater. Res.* 51, 424, 2000
- (21) M. Vallet-Regí, J. Pérez-Pariente, I. Izquierdo-Barba, A.J. Salinas. *Chemistry of Materials.* 12, 3770, 2000
- (22) DG. Castner, BD. Ratner. *Surface Science.* 500, 28, 2002
- (23) M. Tirrell, E. Kokkoli, M. Biesalski. *Surface Science.* 500. 61. 2002
- (24) B. Kasemo. *Surface Science.* 500. 656. 2002
- (25) JD. Hartgerink, E. Beniash, SI. Stupp. *Science.* 294, 1684, 2001

Socios de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia  
Nacional de Farmacia a quien expresamos nuestra sincera  
gratitud por su mecenazgo:

CAJA MADRID

————— ○ —————

Laboratorios Rovi

————— ○ —————

Farmaindustria

————— ○ —————

Alcaliber S. A. Almirall Prodesfarma Bristol-Myes Squibb, S.L. Fundación  
Aventis Grupo Ferrer Internacional Industrial Farmacéutica Cantabria  
Laboratorios Esteve Laboratorios Lilly Laboratorios Menarini Novartis  
Farmacéutica Tedec-Meiji Farma S.A.

————— ○ —————

Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos Colegio Oficial de  
Farmacéuticos de Madrid

————— ○ —————

Colegios Oficiales de Farmacéuticos de: A Coruña, Alicante, Barcelona, Badajoz,  
Bizkaia, Burgos, Cáceres, Cádiz, Girona, Palencia, Principado de Asturias, Santa  
Cruz de Tenerife, Tarragona, Toledo y Zaragoza.