

Resonancia Cuadrupolar Nuclear

Introducción

En este módulo queremos presentar la Resonancia Cuadrupolar Nuclear (RCN) como otra técnica espectroscópica, no destructiva, útil en la caracterización tanto dinámica como estructural, del estado sólido en general y de compuestos farmacéuticos en particular, mostrando aportes tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo.

La RCN está basada en la interacción del momento cuadrupolar del núcleo, usado como sensor, con el Gradiente de Campo Eléctrico (GCE) generado en el sitio del núcleo por el resto de las cargas del cristal. Esta interacción da lugar a niveles de energía discretos que pueden ser detectados, como en la RMN, midiendo la absorción (dispersión) de una señal en un circuito resonante que contiene la muestra estudiada. En este sentido, esta técnica es equivalente a la RMN. En efecto en la RMN, niveles discretos de energía son generados, como ya han visto, por la interacción del momento magnético del núcleo con el campo magnético externo, mientras que en la RCN, los niveles discretos de energía son generados por la interacción del momento cuadrupolar del núcleo con el GCE. En principio, todos los razonamientos aplicables a un sistema de spines en un campo magnético, tienen su correlato al considerar un conjunto de núcleos cuadrupolares en un cristal con gradiente de campo no nulo. Sin embargo, la simplicidad formal del Hamiltoniano Zeeman ha potenciado más el desarrollo de la RMN. Indudablemente, el hecho de que, a diferencia de lo que ocurre con el campo magnético externo, el gradiente de campo queda fuera del control del experimentador ha contribuido también en ese sentido, si bien tal vez radique aquí el principal potencial de la resonancia cuadrupolar. En efecto, ya que es el propio arreglo cristalino el encargado de generar el GCE, la técnica resulta particularmente sensible a las alteraciones locales del arreglo, sean éstas de tipo estructural o dinámico.

Teoría

Es importante aclarar aquí que para que la interacción cuadrupolar exista, el núcleo tiene que ser cuadrupolar, eso implica que el momento de espín (I) tiene que ser mayor a $1/2$. Es decir no existe la interacción cuadrupolar en protones ni en carbonos.

El momento cuadrupolar Q de un núcleo indica el apartamiento de la esfericidad de la distribución de carga nuclear. Este apartamiento depende de la cantidad de nucleones de cada elemento y por ende también tiene variaciones isotópicas. Esquemáticamente la carga nuclear de un núcleo con un $Q < 0$ se puede ver por ejemplo como un elipsoide achatado.

Supongamos entonces que el núcleo es no esférico y se encuentra en presencia de una distribución de carga como se muestra en la Figura 1



Figura 1: Esquema representativo del momento cuadrupolar nuclear en presencia de una distribución de carga.

Se puede observar que la configuración (b) corresponde a un estado de energía más baja ya que coloca las puntas positivas de la carga nuclear más cerca de las cargas negativas. Por lo tanto existe una energía electrostática que varía con la orientación nuclear.

Desde un punto de vista teórico, es necesario comenzar con una descripción en términos de la densidad de carga clásica del núcleo, que llamaremos ρ . Es sabido que la

energía de interacción electrostática de un núcleo de carga ρ ubicado en \mathbf{x}_o con el potencial cristalino V , puede ser representado a través de la serie:

$$E = \int d^3x V(x)\rho(x) = ZeV_o + \sum_j \left(\frac{\partial V}{\partial x_j} \right)_{\bar{x}_o} \int d^3x \rho(x) x_j + \frac{1}{2} \sum_{i,j} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial x_i \partial x_j} \right)_{\bar{x}_o} \int d^3x \rho(x) x_i x_j + \dots$$

El primer término corresponde a la energía electrostática de una carga puntual equivalente a los Z protones del núcleo ubicada en \mathbf{x}_o . No depende de la orientación y no contiene ninguna información sobre la distribución de carga nuclear. Es un término constante y puede ser despreciado. Como se ha comprobado que el momento dipolar eléctrico del núcleo $\bar{P} = \int d^3x \rho(x)\bar{x}$ tiene un valor despreciable, el término dominante en el desarrollo está dado por la contribución cuadrupolar.

$$E^{(2)} = \frac{1}{6} \sum_{i,j} V_{i,j} Q_{i,j} \quad (1)$$

donde:

$$V_{i,j} = \left. \frac{\partial^2 V}{\partial x_i \partial x_j} \right)_{\bar{x}_o} \quad \text{es el gradiente} \quad (2)$$

$$Q_{i,j} = \int (3x_i x_j - \delta_{i,j} r^2) \rho d^3x \quad \text{es el cuadrupolo}$$

Con el objeto de obtener una representación cuántica del acoplamiento cuadrupolar, sólo se necesita reemplazar el operador clásico ρ por su operador mecánico cuántico [1]. De esta manera el Hamiltoniano cuadrupolar resulta:

$$H_Q = \frac{1}{6} \sum_{ij} Q_{ij} V^{ij} = \frac{1}{6} \frac{eQ}{I(2I-1)} \sum_{ij} \left(\frac{3}{2} (I_i I_j + I_j I_i) - \delta_{ij} I^2 \right) V^{ij} \quad (3)$$

donde Q_{ij} es el tensor momento cuadrupolar, V^{ij} es el tensor gradiente de campo eléctrico e $I > 1/2$ es el spin nuclear.

En el sistema de ejes principales del gradiente, tal que $V^{ij} = 0$ si $i \neq j$, resulta:

$$H_Q = \frac{e^2 q Q}{4I(2I-1)} \left[(3I_z^2 - I^2) + \eta (I_x^2 - I_y^2) \right] \quad (4)$$

donde η es conocido como el parámetro de asimetría y eq como el gradiente de campo y los mismos están definidos por:

$$eq = V^{zz} \quad \eta = \frac{V^{xx} - V^{yy}}{V^{zz}} \quad (5)$$

Para un gradiente axialmente simétrico $\eta = 0$, los niveles de energía pueden ser expresados de la siguiente manera:

$$E_m = \frac{e^2 q Q}{4I(2I-1)} (3m^2 - I(I+1)) \quad (6)$$

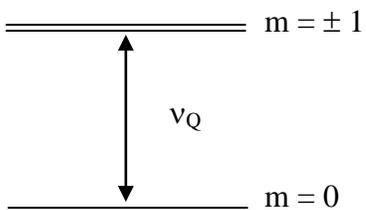
de este modo los niveles de energía son doblemente degenerados en m .

Si $I = 3/2$

$$\begin{array}{l}
 E_{3/2} = E_{-3/2} = \frac{e^2 q Q}{4} \\
 E_{1/2} = E_{-1/2} = -\frac{e^2 q Q}{4}
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{c}
 \text{===== } m = \pm 3/2 \\
 \uparrow \text{ } v_Q \\
 \text{===== } m = \pm 1/2
 \end{array}
 \quad
 \omega_Q = \frac{e^2 q Q}{2\hbar}$$

Para espines semi-enteros hay, en general, $I + 1/2$ niveles de energía doblemente degenerados. En cambio si el espín es entero hay, en general, $I + 1$ niveles de energía, de los cuales I son doblemente degenerados y sólo uno de ellos, aquel con $m = 0$ es no degenerado. Por ejemplo si $I = 1$

$$E_1 = E_{-1} = \frac{e^2 q Q}{4}$$

$$E_0 = -\frac{e^2 q Q}{2}$$


$$\omega_Q = \frac{3e^2 q Q}{4\hbar}$$

Los núcleos cuadrupolares más frecuentemente usados son el ^{35}Cl y el ^{14}N .

Tabla 1: Características magnéticas de los núcleos de Cl y N.

ISOTOPO	% DE ABUND. NAT	ESPIN	SENSITIVIDAD REL. AL ^1H	SENSITIVIDAD REL. AL ^{13}C	MOMENTO CUADRUPOLAR
^{35}Cl	75.53	3/2	0.0047	20	-0.0825
^{37}Cl	24.47	3/2	0.0027	3.73	-0.0649
^{14}N	99.63	1	0.001	5.61	0.016
^{15}N	0.37	1/2	0.001	0.0208	0

En cristales moleculares, la frecuencia de resonancia cuadrupolar, $\nu_Q = \omega_Q / 2\pi$, de los ^{35}Cl en ligaduras C-Cl están usualmente en el rango 20 – 40 MHz, mientras que las del ^{14}N se encuentran en el rango 0.5 – 3.5 MHz.

Tabla 2: Ejemplos de la modificación de la frecuencia de RCN del ^{35}Cl de acuerdo al grupo sustituyente en el R-CH₂Cl.

R	Frecuencia de RCN [MHZ]	R	Frecuencia de RCN [MHZ]
CH ₃ CH ₂ -	32.968	C ₆ H ₅ -	33.627
CH ₃ -	32.985	CH ₃ (CO) -	35.278
CH ₃ CH=CH -	33.455	CH ₃ O(CO) -	35.962
H -	34.023	CF ₃	37.98

Tabla 3: Ejemplos de la variación de la frecuencia de RCN (MHz) del ^{35}Cl con la electronegatividad del grupo sustituyente.

Sustituyente	X= SiCl ₃	X= CCl ₃	Sustituyente	X = Si	X = C
CH ₃ -X	19.11	37.94	X - Cl ₄	20.39	40.63
CH ₂ Cl-X	19.51	39.02	CH ₃ -X-Cl ₃	19.11	37.94
CHCl ₂ -X	19.55	39.39	(CH ₃) ₂ X-Cl ₂	17.78	34.88
CCl ₃ -X		40.68	(CH ₃) ₃ X-Cl	16.46	31.06

En líquidos, el valor del GCE se promedia a cero como consecuencia de la movilidad molecular y en cristales con simetría cúbica también se hace cero como consecuencia de la simetría. Por este motivo no se observa resonancia cuadrupolar pura en estos casos.

Dado que el GCE es debido a la distribución de cargas eléctricas en el cristal, la RCN es una técnica muy sensible a cualquier cambio dinámico o estructural que ocurra en el mismo. De esta manera diferentes formas polimórficas (cambios estructurales, hidratos, etc.) tendrán diferentes frecuencias cuadrupolares.

Es importante destacar que:

- El número de frecuencia cuadrupolares que se observan es proporcional al número de núcleos no equivalentes en la celda cristalina.

Compuesto	Simetría	Cl /moléc.	Moléc./ celda asimétrica	Nº de ν_Q
p-diclorobenceno	P2 ₁ /a	2	1/2	1
p-fluoroclorobenceno	P2 ₁ /a	1	3	3
m-diclorobenceno	P2 ₁ /c	2	2	4
1,1,2,2Tetracloroetano	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	4	2	8

- El área de la línea de resonancia es proporcional al número de núcleos resonantes a esa frecuencia, y por lo tanto la intensidad de la señal es proporcional al tamaño de la muestra.

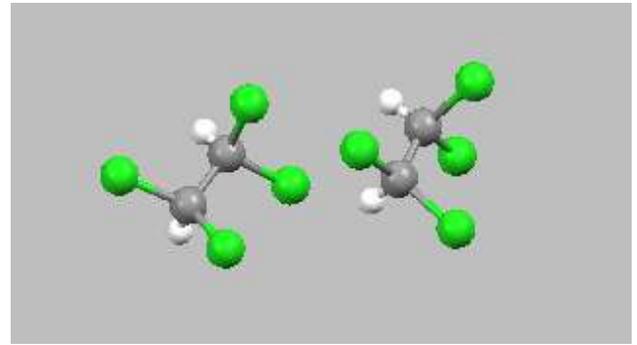
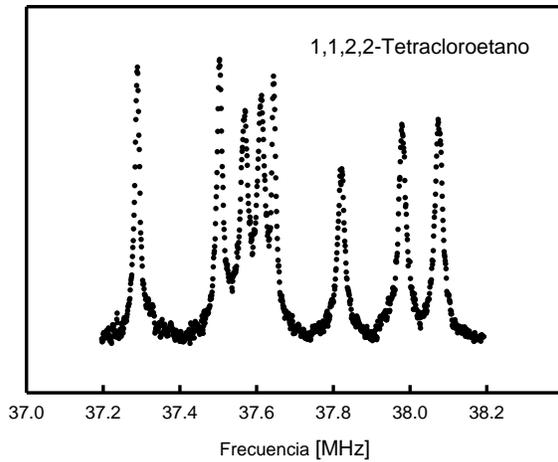


Figure 2: Espectro cuadrupolar 1,1,2,2,-tetracloroetano: ocho líneas de igual área.

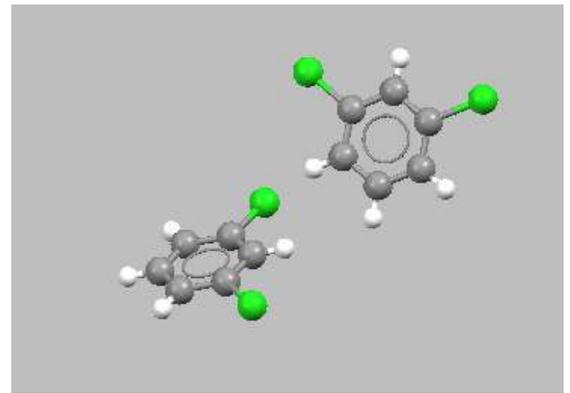
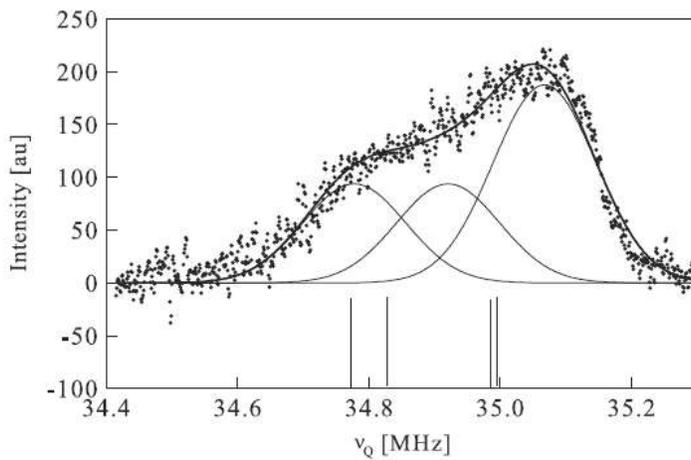


Figura 3: Espectro del m-clorofluorobenceno y m-diclorobenceno. Cuatro líneas de igual área ensanchada por desorden.

Otra característica importante de las líneas de resonancia es el ancho de línea. El mismo es debido principalmente a dos factores:

1. **Ensanchamiento homogéneo.** Tiene su origen en la interacción dipolar y es del orden de 1 kHz.
2. **Ensanchamiento inhomogéneo.** Es debido a muchos factores como impurezas, vacancias, dislocaciones, desorden, etc.

De esta manera el ancho de una línea cuadrupolar puede variar entre 1 kHz (p-diclorobenceno) a cientos o miles de kHz (sistemas amorfos, desordenados)

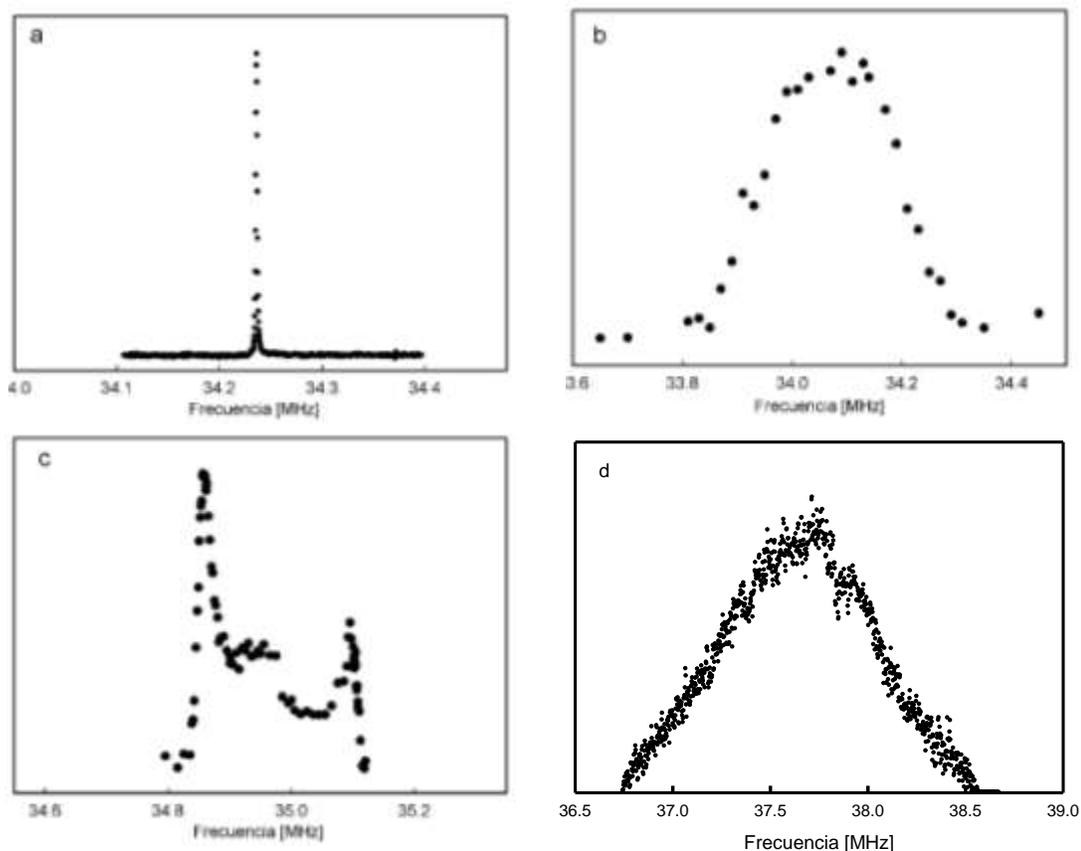


Figura 4: Espectros de RCN del ^{35}Cl en distintos cristales moleculares, a) paradiclorobenceno: fase ordenada, b) p-clorobromobenceno: fase con desorden orientacional, c) diclorobifenilsulfona: fase inconmensurada, d) Tetracloroetano deuterado: fase vítrea.

Como se expresó anteriormente, de manera similar a todas las técnicas espectroscópicas, la detección de los niveles discretos de energía se efectúa empleando una señal electromagnética de prueba para inducir transiciones entre los niveles del sistema. Es decir se perturba el sistema con una señal intensa y acotada en el tiempo (pulso de rf) de manera de igualar las poblaciones de los niveles, finalizado el pulso de excitación se detecta la energía emitida por el sistema (FID).

Cuando uno saca al sistema de espines de su estado de equilibrio existen diversos mecanismos mediante los cuales los espines redistribuyen la energía adsorbida durante el pulso de radiofrecuencia. Esta redistribución de la energía involucra dos procesos; uno de ellos corresponde a interacciones dipolares entre los espines logrando el equilibrio térmico

entre ellos, este proceso se denomina relajación espín-espín (T_2). El segundo proceso corresponde a lograr el equilibrio térmico del sistema de espines con su entorno (red) y se denomina relajación espín-red (T_1). Si bien la red está fuera del alcance de observación del investigador se puede obtener importante información sobre ésta a partir de cómo afecta al sistema de espines. Por este motivo la determinación de la dependencia térmica del tiempo de relajación espín-red es una herramienta muy útil para el estudio de la dinámica molecular dentro del sólido. En general, el estudio de la dependencia con la temperatura de todos los parámetros de la RCN, esto es ν_Q , ancho de línea, T_1 y T_2 hace posible la detección de transiciones de fases así como también de modificaciones dinámicas (reorientaciones moleculares, modos blandos, etc).

Frecuencia de resonancia cuadrupolar nuclear

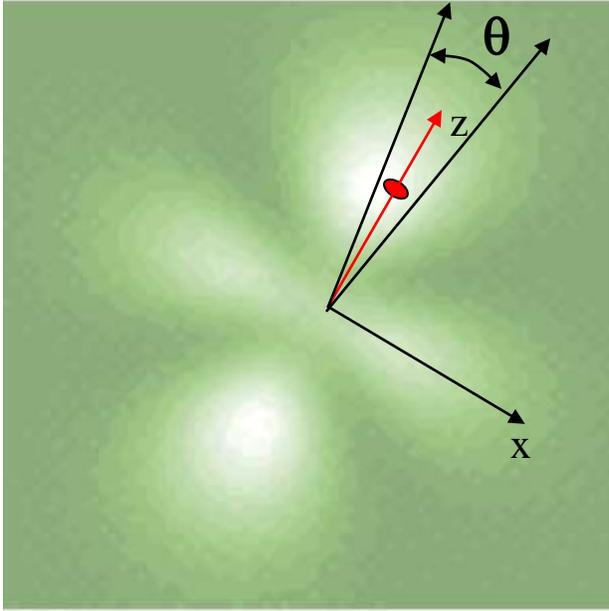
Ya hemos visto que la frecuencia de resonancia de núcleos cuadrupolares con espín $I = 3/2$ para gradientes de campo axialmente simétricos ($\eta = 0$) está descrita por:

$$\nu(T) = \frac{1}{2\hbar} eQ eq(T) \quad (7)$$

donde e es la carga del electrón, Q el momento cuadrupolar del núcleo y $eq(T)$ es el gradiente de campo eléctrico a la temperatura T .

El término $eq(T)$ de la expresión (7) es el gradiente de campo eléctrico en la dirección en la que el valor del gradiente es máximo. Llamaremos z a esa dirección. En general esa dirección coincide con la dirección de la ligadura química donde está el núcleo resonante.

Supongamos que la ligadura realiza torsiones (o libraciones) en torno a un eje perpendicular al eje z . Si el desplazamiento angular debido a la libración es θ (ver Figura 5), el valor instantáneo del gradiente de campo eléctrico en el sitio del núcleo resonante es



$$eq = eq_0 \frac{(3\cos^2(\theta) - 1)}{2} \quad (8)$$

Figura 5: Dirección de máximo gradiente de campo.

donde eq_0 es el valor del gradiente de campo eléctrico en ausencia de libraciones. Las frecuencias de libración están vinculadas a las frecuencias de los modos normales de la red las cuales son típicamente del orden de 10^{12} Hz. Como las frecuencias de RCN son del orden de 10^7 Hz, los núcleos resonantes observan un promedio del gradiente de campo eléctrico, que en el caso que $\theta \ll 1$ (pequeñas amplitudes de oscilación) está dado por:

$$eq = eq_0 \left[1 - \frac{3}{2} \langle \theta^2 \rangle \right] \quad (9)$$

donde $\langle \theta^2 \rangle$ es el promedio temporal de la amplitud cuadrática media de oscilación. En la ecuación (9) se observa rápidamente que cuando $\langle \theta^2 \rangle$ aumenta entonces el gradiente de campo eléctrico y por ende la frecuencia de resonancia, decrecen. Dado que $\langle \theta^2 \rangle$ crece cuando aumenta la temperatura entonces $\nu(T)$ será una función monótona decreciente de la temperatura.

A partir de las ecuaciones (7) y (9) y usando la aproximación armónica para el movimiento molecular (molécula rígida) se puede obtener:

$$\nu(T) = \nu(0) - \sum_{i=1}^N \frac{3\hbar\nu_o}{2I_i\omega_i} \frac{1}{e^{\hbar\omega_i/kT} - 1} \quad [10]$$

$$\nu(0) = \nu_o \left[1 - \sum_{i=1}^N \frac{3\hbar}{4I_i\omega_i} \right] \quad [11]$$

$$\nu_o = \frac{1}{2\hbar} e^2 Q q_o$$

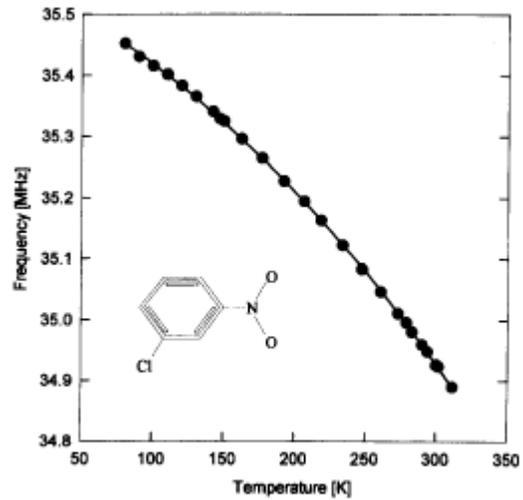


Figura 6: Comportamiento típico de la ν_Q

donde N es el número de modos normales de la red que participan de la promediación del GCE, ω_i es la frecuencia del modo i -ésimo de vibración e I_i es el momento de inercia de la molécula asociado al modo i .

Existen apartamientos de este comportamiento cuando no son las libraciones las que dominan la variación con la temperatura del valor del gradiente del campo eléctrico.

Tal como se puede observar en la ecuación (8) la dependencia térmica del valor de la frecuencia de RCN se puede originar en dos factores. El primero y del cual ya hicimos mención es el promedio temporal de $\langle \theta^2 \rangle$. El otro factor es q_o , el cual describe la contribución a $\nu(T)$ suponiendo a la red estática. Este factor tiene variaciones cuando ocurren transiciones de fase, ya que transformaciones en la estructura cristalina introducen modificaciones del entorno electrónico de:

- 1) la ligadura donde se encuentra el núcleo resonante
- 2) las moléculas o grupos moleculares vecinos al núcleo resonante.

Un ejemplo del comportamiento en transiciones de fase primer orden se muestra en la Figura 7.

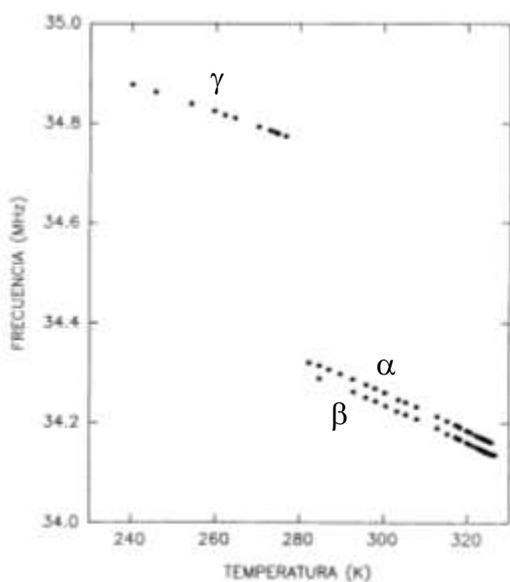


Figura 7: Transición de fase de primer orden en p-diclorobenceno.

Obsérvese que en transiciones de fase de primer orden, el salto en frecuencia es discontinuo.

En el caso de transiciones de fase de segundo orden (ej. Cloranil, 2,6-dinitroclorobenceno) se observa un cambio continuo de la frecuencia de una estructura cristalina a otra.

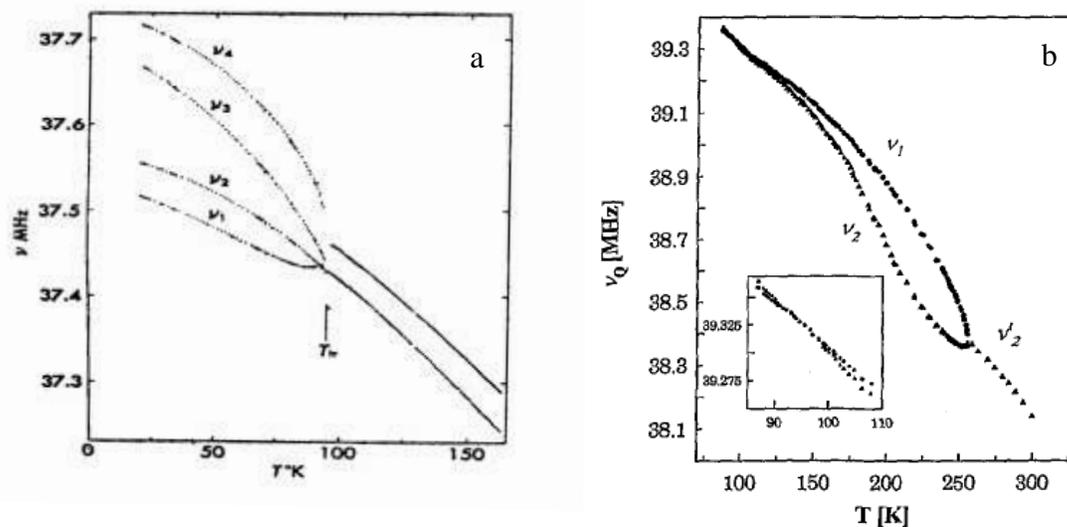


Figura 8: Dependencia con la temperatura de las frecuencias de RCN en a) Cloranil [2] y b) 2,6 dinitroclorobenceno [3].

Tiempo de relajación espín-red (T_1)

Vibraciones de la red y reorientaciones

La inversa del tiempo de relajación está asociada a la probabilidad de transición entre los niveles cuánticos debido a distintos tipos de movimientos. Por lo tanto este tiempo da en principio información más directa acerca de los movimientos moleculares.

La parte dependiente del tiempo del Hamiltoniano $H_Q(t)$ induce transiciones entre los niveles de energía cuadrupolar m y $m + \mu$. Las probabilidades de transición se pueden escribir de la siguiente manera [4,5]:

$$W_{m,m+\mu} = \frac{1}{\hbar^2} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-i\mu\omega_Q t} \langle (m|H_Q(t)|m+\mu)(m+\mu|H_Q(t+\tau)|m) \rangle dt \quad (12)$$

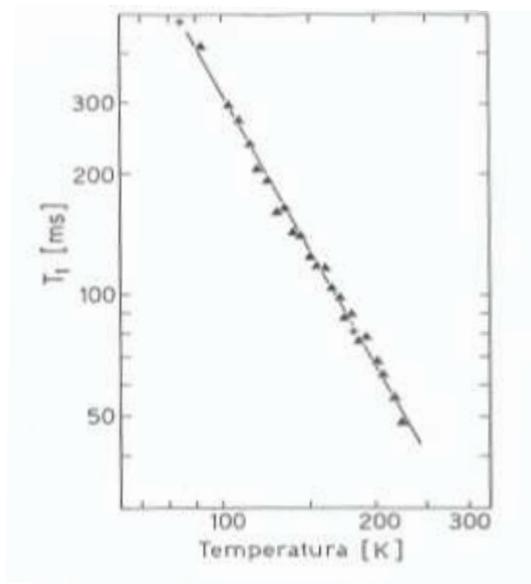
$$W_{m,m+\mu} = \frac{1}{\hbar^2} |Q_{\mu m}|^2 \int_{-\infty}^{\infty} e^{-i\mu\omega_Q t} \langle V_{\mu}(t)V_{\mu}^*(t+\tau) \rangle dt \quad \mu = \pm 1, \pm 2 \quad (13)$$

La probabilidad de transición es de este modo proporcional a la transformada de Fourier de la función autocorrelación de una componente del tensor GCE a la frecuencia de resonancia ω_Q , reduciéndose de este modo el problema al cálculo de la función autocorrelación:

$$K_{\mu}(\tau) = \langle V_{\mu}(t)V_{\mu}^*(t+\tau) \rangle \quad (14)$$

basado en un modelo teórico para el movimiento molecular.

En cristales moleculares la dependencia con la temperatura de T_1 debida a vibraciones de la red obedece (para $T > 70$ K) a la relación:



$$\left. \frac{1}{T_1} \right)_{red} \propto T^m \quad m \approx 2 \quad [15]$$

Figura 9: Dependencia con la temperatura de T_1 en Paradiclorobenceno fase α .

Cuando el potencial cristalino es no armónico este exponente puede llegar a tomar valores cercanos a 3 y en el caso de amorfos el exponente es del orden de 1.

Sin embargo, con frecuencia se observan apartamientos del comportamiento T^2 cuando aparecen, por ejemplo, reorientaciones moleculares o de grupos moleculares. A menudo esta técnica da valores bastante precisos de los parámetros de activación porque el T_1 es muy sensible a la velocidad de los movimientos y cambia, a veces, varios órdenes de magnitud cuando la reorientación se hace cada vez más rápida. Observemos para ello el caso del p-clorobenzotricloruro [6].

Obsérvese que para $T < 200 \text{ K}$ el comportamiento es típico de vibraciones moleculares, pero existe un pronunciado decaimiento en T_1 a partir de esa temperatura en dos de las tres líneas de resonancia. Esto puede ser interpretado en términos de grandes fluctuaciones del GCE inducidas por reorientaciones del grupo CCl_3 . Bajo estas condiciones se puede demostrar que la probabilidades de transición están dadas por:

$$\left. \frac{1}{T_1} \right)_{reo} \propto \frac{\omega_Q^2 \tau_c}{1 + \omega_Q^2 \tau_c^2} \quad (16)$$

donde τ_c es el tiempo de correlación entre saltos.

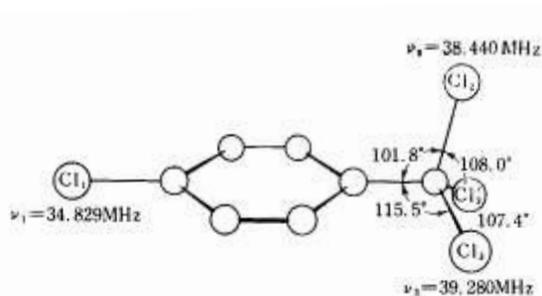
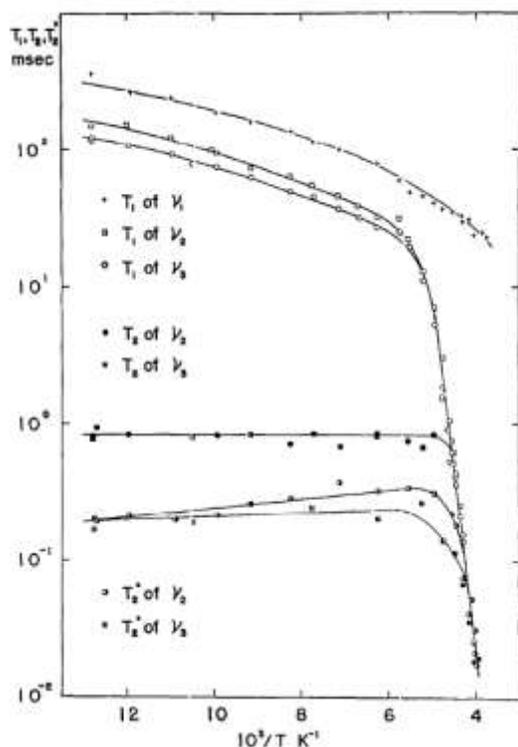


Figura 10: Dependencia con la temperatura de T_1 y T_2^* en p-clorobenzotrifluoruro.

En la expresión (16) se observan dos límites. Cuando las reorientaciones son lentas $\omega_Q \tau_c \gg 1$ resulta (para un proceso térmicamente activado tipo Arrhenius ($\tau_c = \tau_0 e^{E_a/kT}$))

$$\left. \frac{1}{T_1} \right)_{reo} \propto \frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_0} e^{-E_a/kT} \quad (17)$$

Cuando las reorientaciones son rápidas $\omega_Q \tau_c \ll 1$

$$\left. \frac{1}{T_1} \right)_{reo} \propto \omega_Q^2 \tau_0 e^{E_a/kT} \quad (18)$$

De esta manera el comportamiento global de los datos experimentales del p-clorobenzotricloruro puede ser explicado por la suma de dos procesos independientes, esto es, las vibraciones de red más las reorientaciones del grupo molecular CCl₃ en el límite de movimientos lentos:

$$\frac{1}{T_1} = AT^\lambda + \frac{1}{\tau_0} e^{-E_a/kT} \quad (19)$$

En este caso particular se obtiene una energía de activación para el movimiento de $E = 45.6 \text{ kJ/mol}$.

A veces el grupo que se reorienta no contiene al núcleo cuadrupolar sino que es un grupo vecino. También en este caso se observan cambios en el tiempo de relajación debido a la modulación del GCE. En este caso:

$$\left. \frac{1}{T_1} \right)_{\text{mod}} \propto \left(\frac{q'}{q} \right)^2 \frac{\omega_Q^2 \tau_c}{1 + \omega_Q^2 \tau_c^2} \quad (20)$$

donde (q'/q) representa la fracción del GCE que está fluctuando debido a la reorientación del grupo vecino.

Veamos un ejemplo donde se observan reorientaciones del grupo que contiene al núcleo resonante y reorientaciones de grupos vecinos. Este es el caso del Cloruro de Sulfonil 2-Nitrobenceno [7].

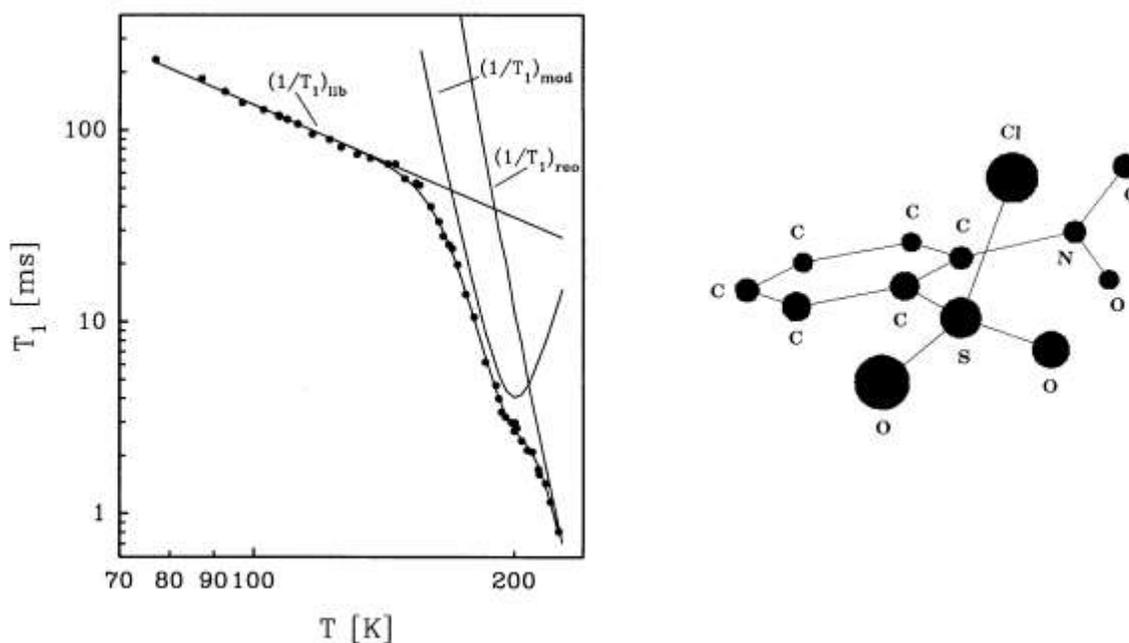
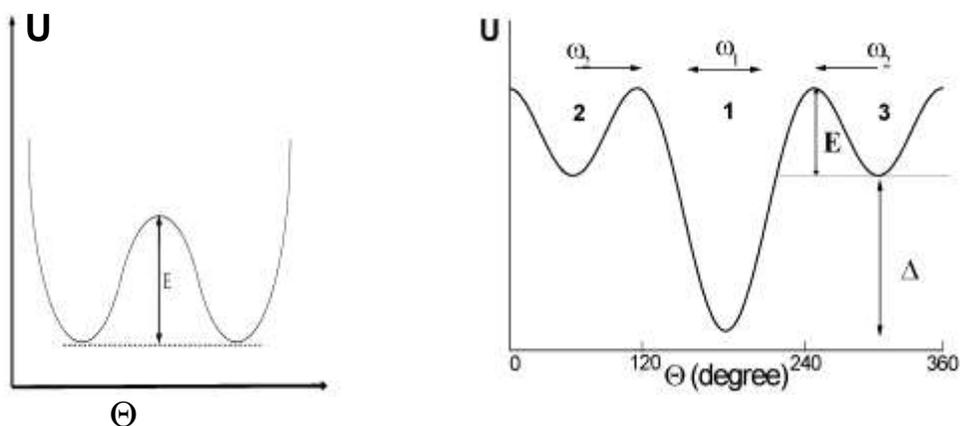


Figura 11: Dependencia con la temperatura de T_1 en el Cloruro de Sulfonyl 2-Nitrobenzeno.

Aquí para $T < 154 K$ dominan las vibraciones de la red, para $154 < T < 200 K$ se hacen importantes las reorientaciones del grupo NO_2 y para $T > 200 K$ dominan las reorientaciones del grupo SO_2Cl . En el caso del grupo NO_2 , por su simetría se propone una reorientación entre pozos simétricos mientras que en el grupo SO_2Cl se considera una reorientación entre pozos asimétricos.



Para el grupo NO_2 se obtiene, en este caso, una energía de activación $E = 28.4 \text{ kJ/mol}$ y un $(q'/q) = 4 \times 10^{-3}$, mientras que para el grupo SO_2CL se obtiene una energía $E = 38.4 \text{ kJ/mol}$.

Transiciones de fases

Cuando una transición de fase ocurre en un cristal, esto también se manifiesta en la dependencia con la temperatura del tiempo de relajación en una variedad de formas dependiendo de la naturaleza de la transición. En primer lugar el valor de T_1 es típico de la fase sólida donde se encuentra y por lo tanto en presencia de una transición de fase se observan cambios en T_1 .

Veamos algunos ejemplos. Uno de ellos es el Cloruro de Sulfonil 4-Nitrobenceno [8] que presenta dos transiciones de fase de primer orden y otro es el Cloranil [2] que como ya se mencionó anteriormente sufre una transición de fase de segundo orden.

En el caso del Cloruro de sulfonil 4-Nitrobenceno (ver Figura 12) se observan cuatro fases de un mismo compuesto. Se usaron dos muestras. Muestra 1 recristalizada para eliminar impurezas, mientras que la muestra 2 fue usada en el estado provisto por el proveedor. La muestra 1 a altas temperatura se encuentra en la fase β y al enfriarla lentamente, transige a 145 K a la fase α , pero una vez enfriada a temperatura de aire líquido, la fase estable es la α . Por su parte la muestra 2 al ser enfriada cristaliza a bajas temperatura en la fase δ . A medida que la temperatura aumenta, la muestra transige a la fase γ a $T = 118.5 \text{ K}$. En esta nueva fase hay dos líneas de resonancia. Finalmente a $T = 131 \text{ K}$, la fase γ transige a la de alta temperatura. Estos saltos en T_1 a la temperatura de transición coinciden con lo observado en la frecuencia cuando se trata de transiciones de primer orden.

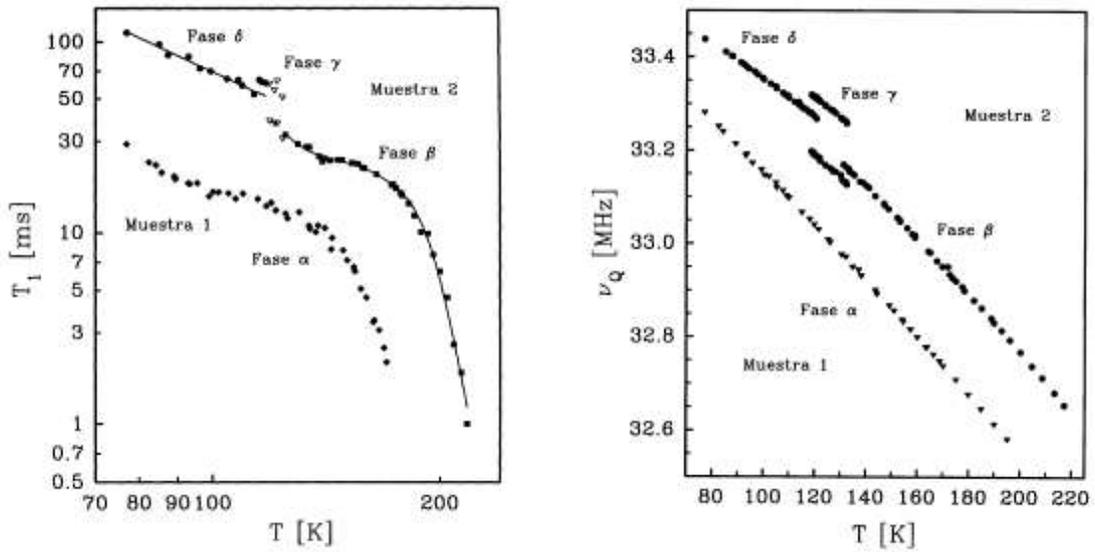


Figura 12: Dependencia con la temperatura del T_1 y de la frecuencia en Cloruro de sulfonil 4-Nitrobenzeno

En cambio en el caso del Cloranil, al tratarse de una transición de fase de segundo orden, el comportamiento de T_1 en las proximidades de la transición muestra una dependencia tipo λ , en contraposición al cambio continuo observado en la frecuencia

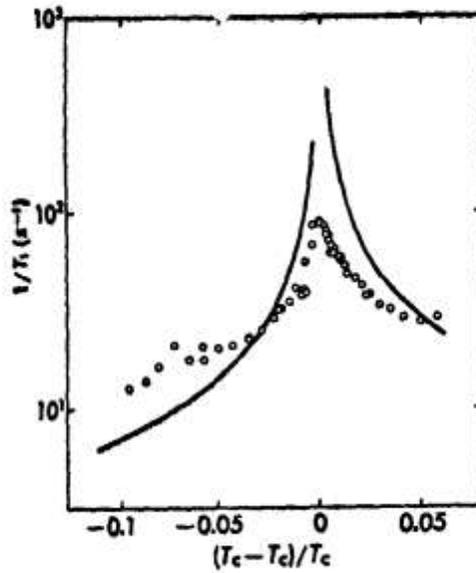


Figura 13: Dependencia con la temperatura de $1/T_1$. Las curvas sólidas representan el modelo teórico.

Cinética de transformación [9]

Sin constituir una propiedad intrínseca de los procesos de primer orden, la nucleación y el posterior crecimiento de la nueva fase representa el mecanismo cinético operante en muchas de las transformaciones observadas en sólidos. Conceptualmente, el proceso no difiere del que regula la aparición de gotas de aguas en ambientes sobresaturados de vapor.

Inducidas por fluctuaciones locales en el arreglo (metaestable) de la fase madre, la nucleación de la fase producto en regiones minúsculas del cristal representa el paso preliminar del proceso de transformación. Tales regiones diminutas reciben el nombre de embriones y tienen, en la mayoría de los casos, una existencia fugaz.

El cambio de energía libre debido a la formación de un embrión esférico de radio r viene dado por:

$$\Delta G = -\frac{4\pi}{3}r^3\Delta G_V + 4\pi r^2\sigma \quad (21)$$

donde ΔG_V representa el cambio de la energía de Gibbs por unidad de volumen a esa temperatura y σ es el incremento de energía libre por unidad de área inducido por efectos derivados de la tensión (diferencia de energía superficial) entre las superficies de contacto.

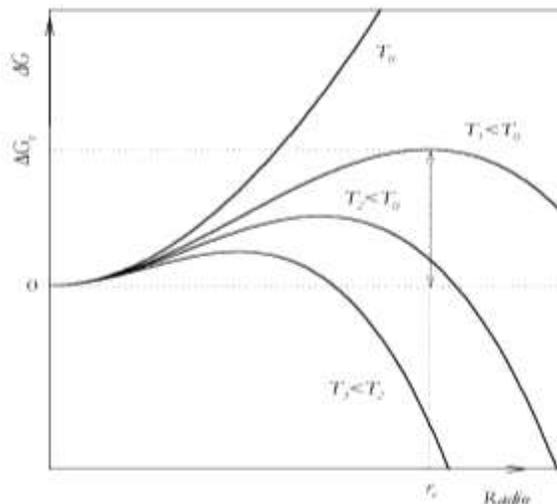


Figura 14: Variación esquemática de la barrera de nucleación como función del radio para diferentes temperaturas.

Cuando el radio es lo suficientemente chico, el segundo término domina; el embrión resulta termodinámicamente inestable y se disuelve en la fase madre. Sin embargo, si la fluctuación alcanza un radio levemente superior a un valor crítico r_c , el balance de energía se vuelve paulatinamente menos desfavorable y estimula el crecimiento del embrión que ahora pasa a constituir un núcleo de la nueva fase

Dependiendo de la naturaleza del material y del cambio de fase involucrado, pueden distinguirse dos tipos de nucleación que llamaremos homogénea y heterogénea. La primera tiene lugar cuando todos los elementos de volumen de la fase madre son idénticos, sea en términos de propiedades energéticas, químicas o estructurales. Por esta razón, la nucleación homogénea es un proceso que debido a la presencia de vacancias, impurezas u otras imperfecciones pocas veces tiene lugar. En su lugar, suele observarse un crecimiento preferencial alrededor de los defectos del arreglo que, por esto mismo, recibe el nombre de heterogéneo. Tratándose de un material policristalino, las regiones entre granos son especialmente aptas para este proceso facilitando el proceso de transformación.

A partir de la tasa de nucleación I (o número de núcleos generados por unidad de tiempo) y de la velocidad de crecimientos de dichos núcleos γ , es posible evaluar con relativa facilidad la fracción ξ de volumen transformado a un dado instante de tiempo t y teniendo en cuenta efectos de solapamiento entre regiones ya transformadas Avrami obtuvo la expresión clásica :

$$\xi = 1 - e^{-C t^4} \quad (22)$$

que rige la cinética de transformación en procesos de nucleación homogénea.

En el caso de nucleación heterogénea en sistemas policristalinos, la evolución de la fase producto fue estudiada por Cahn, quien obtuvo expresiones maestras que describen la dependencia temporal de ξ cuando la nucleación tiene lugar ya sea en la superficie entre dos granos, en el borde o espacio lineal en que confluyen tres granos o en los vértices o puntos de encuentros de cuatro granos adyacentes. Así por ejemplo la descripción de la

cinética de transformación por nucleación en bordes de granos resulta tener los siguientes valores límites:

$$\xi = 1 - e^{-Dt^4} \qquad \xi = 1 - e^{-Ft^2} \qquad (23)$$

correspondientes al comienzo de la transición y al final de la transición respectivamente.

De este modo un gráfico $\{\log[\ln(1/(1-\xi))]\}$ versus $\{\log(t)\}$ consiste de dos líneas rectas de pendiente 4 y 2, separadas por una región intermedia donde la pendiente decrece de un valor extremo al otro.

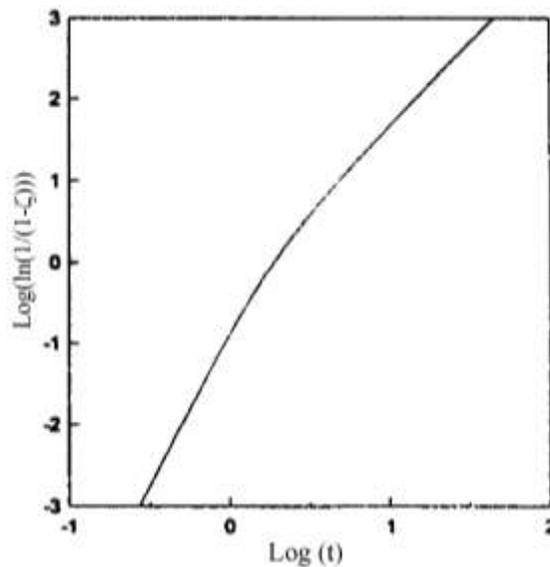


Figura 15: Curva maestra para las transformaciones que nuclean en bordes de grano.

El cambio de pendiente se explica en términos de una saturación de sitios y está asociado intrínsecamente al carácter heterogéneo del proceso: como los sitios de nucleación no están distribuidos aleatoriamente sino concentrados en regiones específicas de dimensionalidad menor, la fracción del espacio cristalino apropiada para la generación de la nueva fase se agota proporcionalmente antes que el volumen cristalino total. Antes de que esto ocurra, la naturaleza aleatoria de la nucleación inicial se manifestaría a través de una

dependencia que cualitativamente reproduce el comportamiento observado en la nucleación homogénea.

Cuando la nucleación ocurre en la superficie de contacto entre granos o en los vértices policristalinos, el comportamiento puede describirse en términos similares: en ambos casos, el proceso inicial de nucleación tiene un carácter aleatorio que puede representarse a través de rectas de pendiente igual a 4. Luego de la saturación de sitios, el comportamiento límite también es rectilíneo pero ahora la pendiente vale 1 si la nucleación tiene origen en las superficies entre granos o 3 si ésta se origina en los vértices.

Es importante destacar que para variaciones de ζ entre 3% y 97 % se deben esperar en general líneas rectas de pendiente intermedia.

Como ejemplo mostraremos el caso de la cinética de transformación orden - desorden en el p-cloronitrobenzeno [10] por medio de la RCN. En este caso, debido al ensanchamiento inhomogéneo de la fase desordenada, es más fácil seguir la desaparición gradual de la línea ordenada. Así:

$$\xi_{des} = 1 - \xi_{ord} = \frac{V_{des}}{V_t} = 1 - \frac{V_o}{V_t} \approx 1 - \frac{A_{ord}}{A_t} \quad (24)$$

donde V_t representa el volumen de la muestra y $A_{ord}(t)$ denota la amplitud de la señal de RCN de la fase ordenada al tiempo t .

El comportamiento puede describirse correctamente a través de una recta de pendiente igual a 2 que cubre todo el rango experimental observado (ver Figura 16). El proceso de transformación responde a una mecánica de nucleación y crecimiento y como ocurre en muchos casos, la región de quiebre predicha por las curvas maestras queda fuera del rango observado, el cambio tiene lugar bajo la condición de saturación de sitios. Del valor de la pendiente se deduce que la nucleación (claramente heterogénea) está localizada en los bordes de grano del policristal.

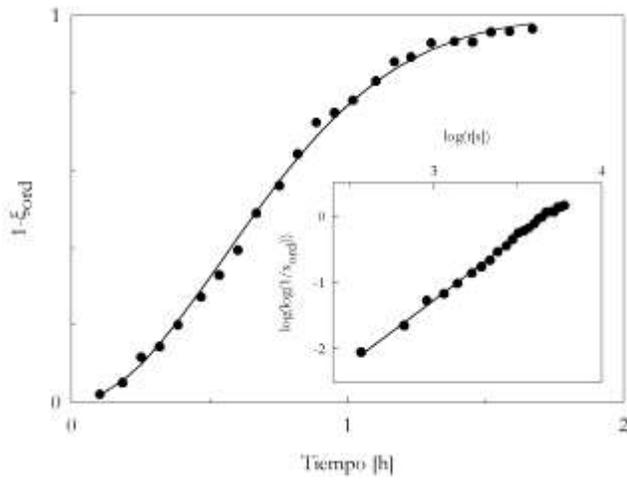


Figura 16: Evolución de la fracción de muestra desordenada de p-cloro nitrobeneno durante la transformación orden-desorden a 283 K.

Requisitos experimentales

Equipamiento: el equipo es bastante parecido a un espectrómetro de pulsos de RMN. Consta de un transmisor de potencia, un circuito resonante, un receptor y un sistema de adquisición de datos.

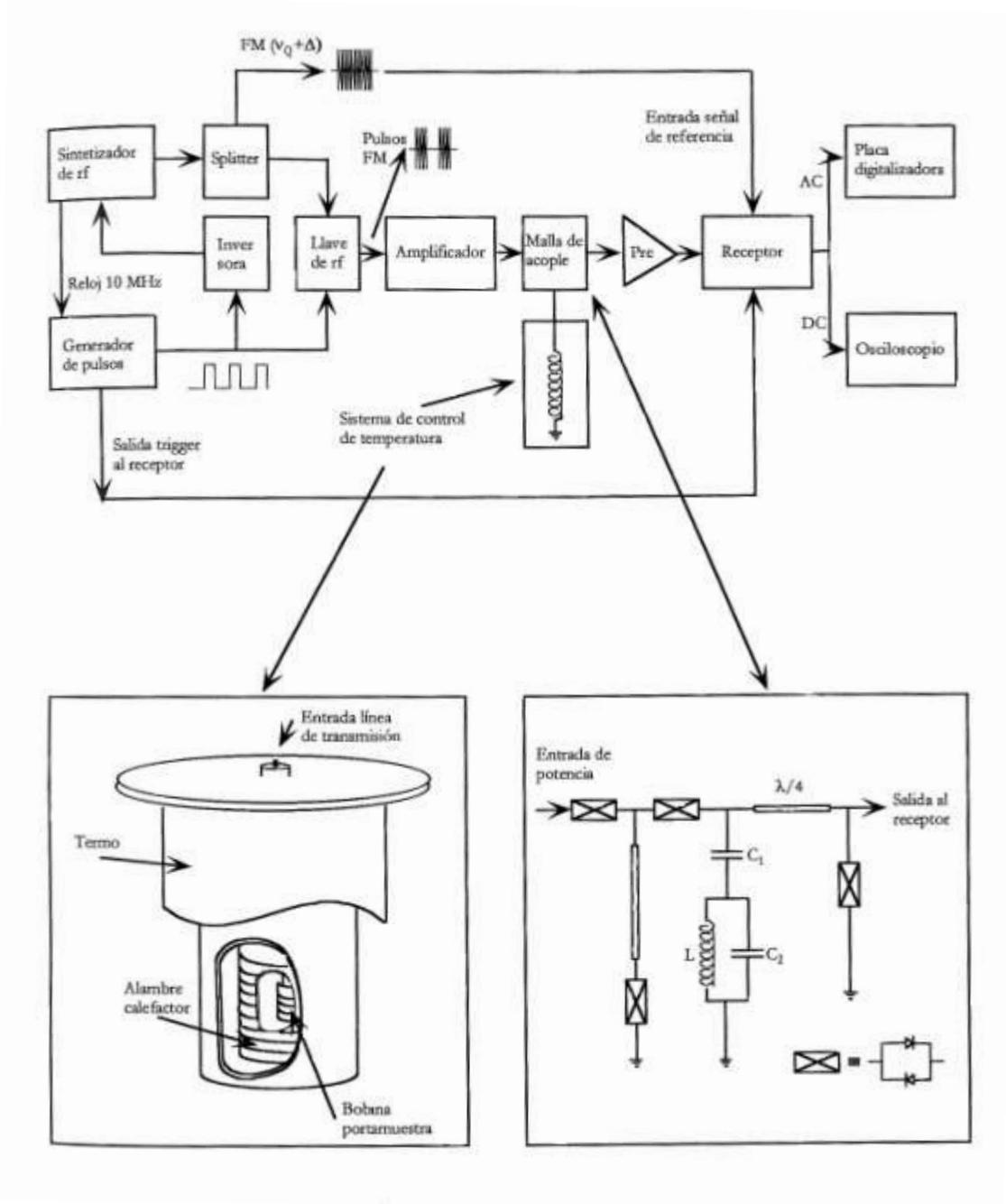


Figura 17: Representación esquemática de un espectrómetro de RCN

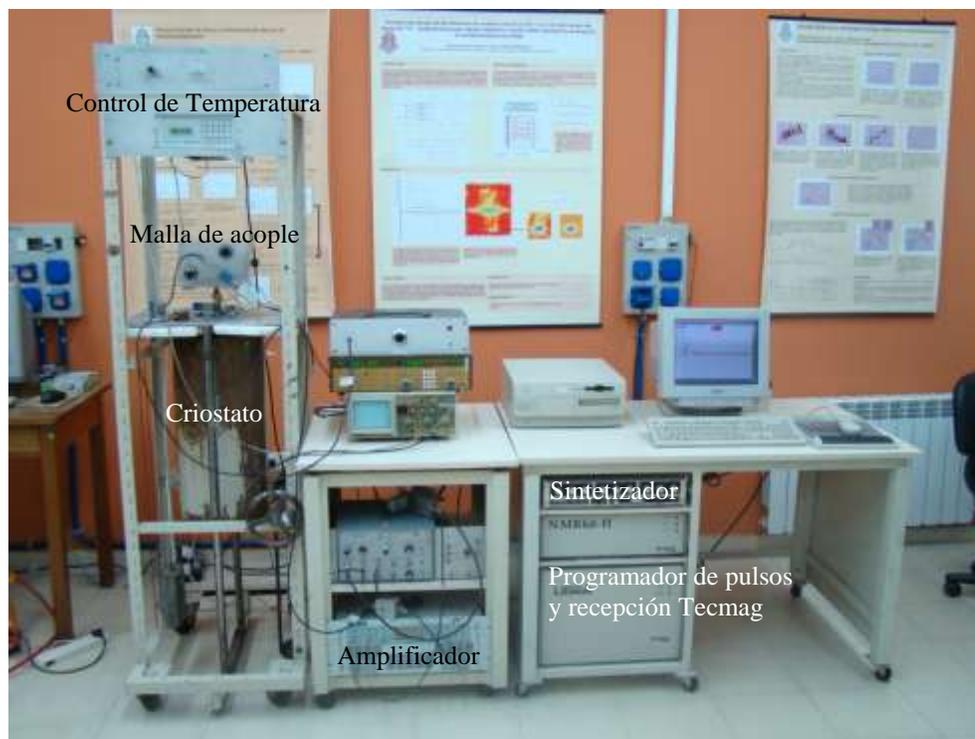


Figura 18: Vista general de un espectrómetro de NQR.

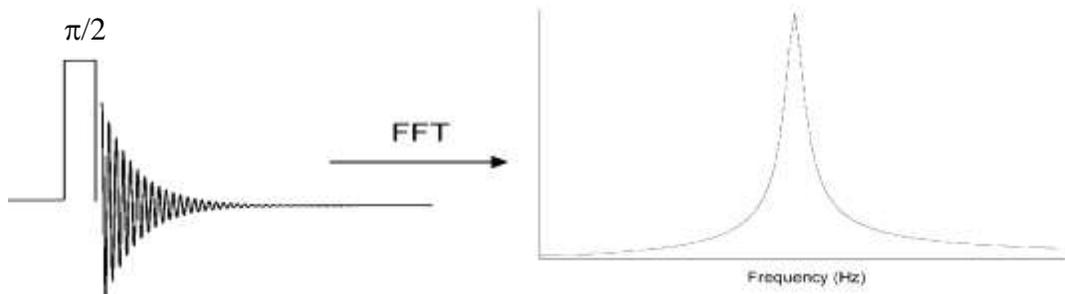


Figura 19: Sistema transmisión/ recepción de un espectrómetro de NQR.



Figura 20: Vista general del criostato.

Si las líneas son angostas, la forma de línea se obtiene por Transformada de Fourier de la FID.



y los tiempos de relajación spin-red se determinan usando la secuencia estándar $\pi/2 - \tau - \pi/2$ con τ variable. El aspecto típico de la curva es:

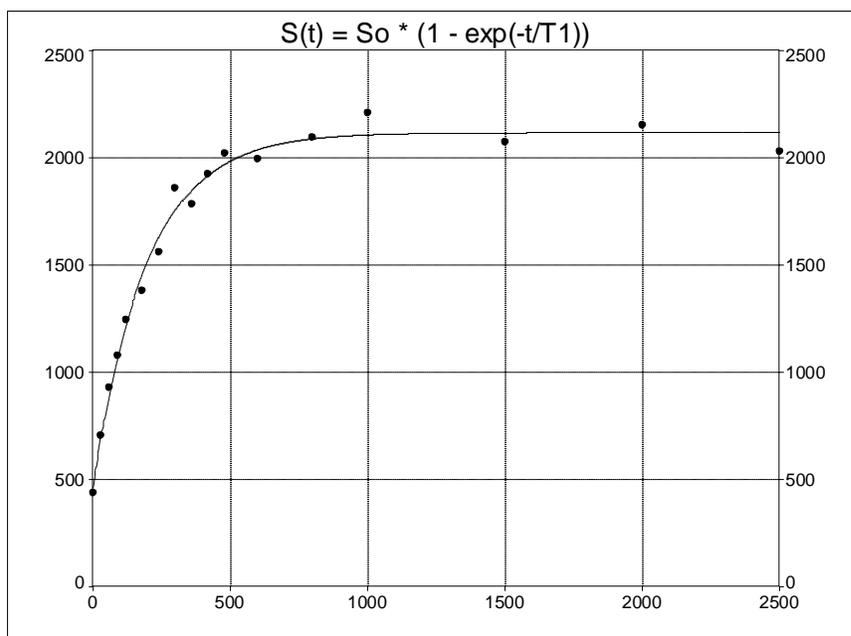


Figura 21: Intensidad de la señal cuadrupolar en función de τ .

En cambio si se trata de líneas anchas (FID muy cortas) se usa el Spin-Echo Fourier Transform Mapping Spectroscopy . Consiste en realizar las medidas sobre el eco de Hahn usando la secuencia $\pi/2 - \tau - \pi$ con $\tau = 100 \mu s$ y variando la frecuencia de irradiación. En

este caso los tiempos de relajación spin-red también se miden sobre el eco usando la secuencia $\pi/2 - \tau - \pi/2 - 50\mu - \pi$

Preparación de la muestra: No es necesaria una preparación específica de la muestra. En general los porta-muestra son tubos de vidrios de 2 cm de longitud y diámetros entre 0.5 cm y 1 cm. En el caso de pastillas, las mismas se pueden introducir directamente en el espectrómetro envueltas en teflón.

APLICACIÓN DE LA RCN A LA CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS DE INTERÉS FARMACÉUTICO.

A partir de las características de la RCN que se han mostrado hasta aquí desarrollaremos a continuación un conjunto de experiencias a partir de las cuales trataremos de visualizar la potencialidad de la RCN en la caracterización de drogas de interés farmacéutico. En particular se mostrarán las posibles aplicaciones de la RCN como una técnica analítica, no destructiva, para el estudio cualitativo y cuantitativo tanto de materias primas como productos terminados.

a) Espectroscopia de RCN cualitativa

Como se ha explicado anteriormente, a partir del espectro de RCN es posible identificar diferentes moléculas. Sin embargo, las características de la RCN permiten identificar fácilmente entre sistemas similares como por ejemplo diferentes sales de una misma molécula. Podemos observar en la Figura 22 que es claramente diferente el espectro de RCN del diclofenac ácido de los espectros de sus sales diclofenac sódico y diclofenac potásico [11].

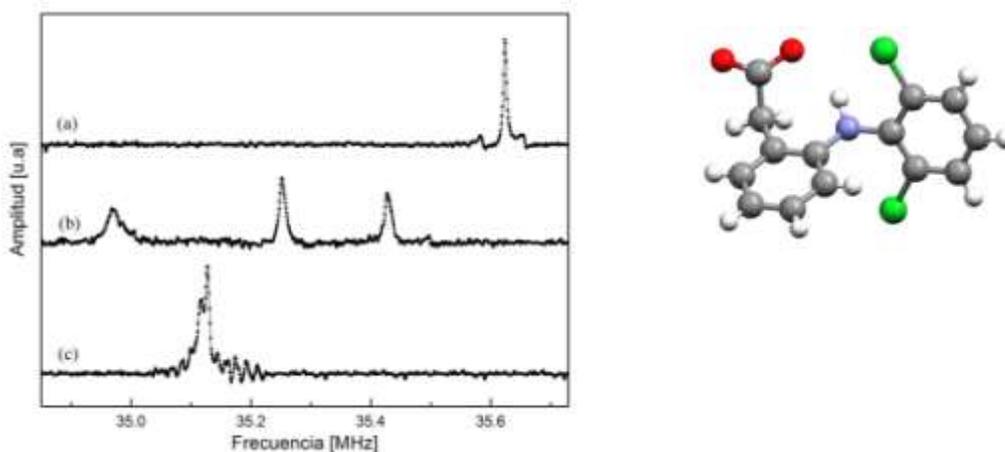


Figura 22: Espectros de RCN de a) diclofenac ácido, b) diclofenac sódico y c) diclofenac potásico.

También se pueden identificar diferentes grados de hidratación de una muestra. En la Figura 23 se puede observar cómo se modifica el espectro de RCN del diclofenac sódico cuando la muestra es tri o penta hidratada.

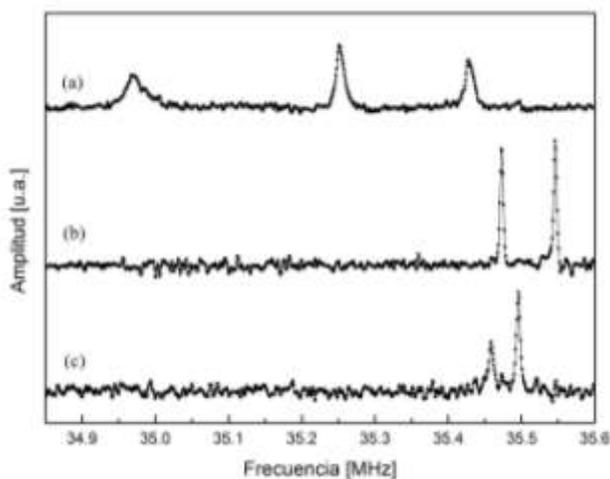


Figura 23: Espectros de RCN de a) diclofenac sódico anhidro, b) diclofenac sódico trihidratado y c) diclofenac sódico pentahidratado.

La posibilidad de identificar distintos polimorfos de un compuesto de interés farmacéutico muestra el gran potencial que tiene la RCN como técnica analítica cualitativa. En la Figura 24 vemos comparativamente los espectros de RCN de cuatro polimorfos de la clorpropamida. El polimorfo denominado II no muestra ningún pico en el rango estudiado; esto puede deberse a desorden estructural y/o efectos dinámicos.

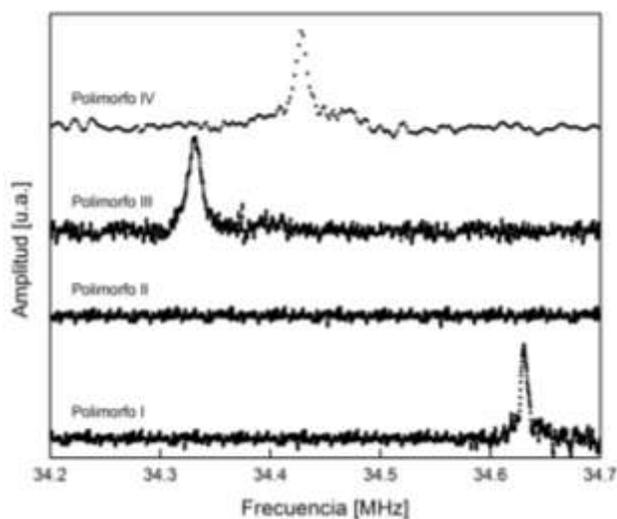


Figura 24: Espectros de RCN de distintos polimorfos de la Clorpropamida.

b) Espectroscopía de RCN con variación de temperatura

A partir del estudio de la dependencia térmica del espectro de RCN es posible, como ya se mencionó, detectar transiciones de fase a otros polimorfos cuando variamos la temperatura de la muestra. Esto permite construir cuál es el diagrama de fases del compuesto en el rango de temperatura estudiado caracterizando a qué temperaturas y entre qué polimorfos ocurren las diferentes transiciones de fase. Esto también permite la caracterización de nuevos polimorfos que no están presentes a temperatura ambiente. Como ejemplo de esto podemos observar en la Figura 25 cómo es la dependencia con la temperatura de distintos polimorfos de la clorpropamida.

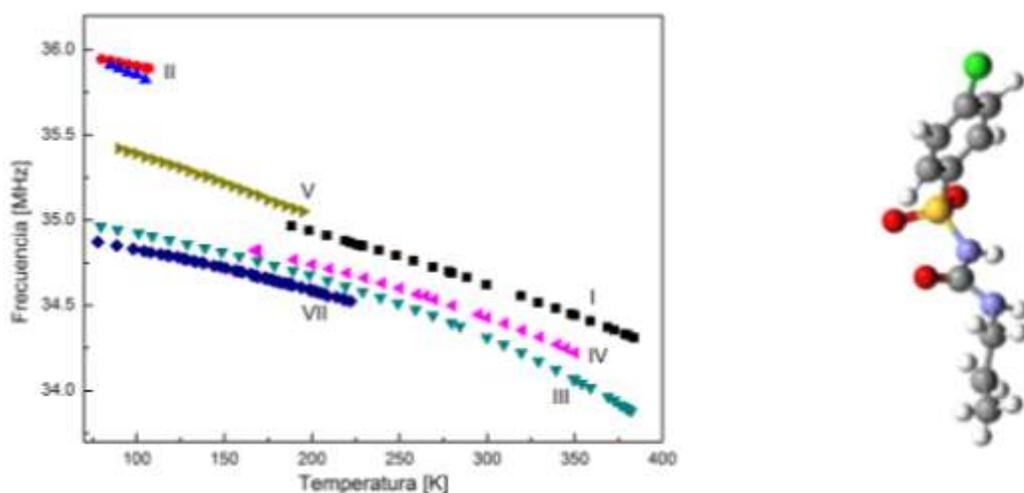


Figura 25: Dependencia con la temperatura de la frecuencia de resonancia en distintos polimorfos de Clorpropamida.

Como otro ejemplo mostramos en la Figura 26 la dependencia con la temperatura de los polimorfos I y II de la Furosemida. Aunque existe un único núcleo de Cloro en la celda asimétrica el espectro de RCN muestra dos frecuencias de resonancia y esto es debido a la existencia de un desorden orientacional del grupo furano alrededor de dos posiciones de equilibrio. A altas temperaturas hay una transición de fase donde desaparece este desorden orientacional lo cual se evidencia en un espectro de RCN con un único pico.

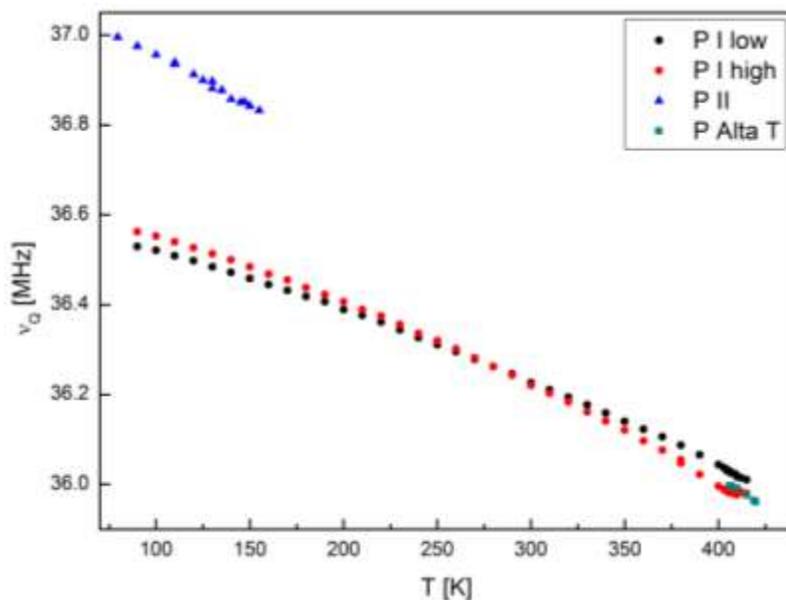
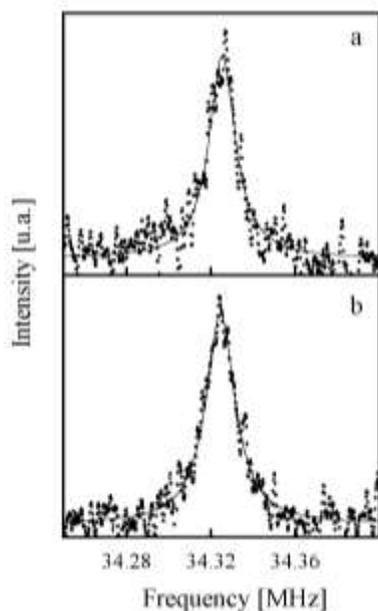


Figura 26: Dependencia con la temperatura de la frecuencia de resonancia de los polimorfos I y II de la Furosemida.

c) Espectroscopía de RCN aplicada a productos terminados



Debido a que la RCN utiliza un núcleo cuadrupolar, que pertenece al compuesto, como sensor, el espectro no se modifica por la presencia de otros principios activos o excipientes presentes en la muestra salvo que existan interacciones químicas entre ellos o que tenga frecuencias de resonancia en el mismo rango. Como ejemplo de esto en la Figura 27 se muestra que no existen diferencias en el espectro de un tubo de vidrio conteniendo 250 mg de Clorpropamida pura y el de una tableta comercial que contiene excipientes y una dosis igual de principio activo.

Figura 27: Espectro de RCN y patrón de difracción de (a) 250 mg de Clorpropamida pura polimorfo A, (b) Comprimido conteniendo 250 mg de Clorpropamida polimorfo A y excipientes.

Otras técnicas experimentales utilizadas frecuentemente en la caracterización de compuestos farmacéuticos se ven seriamente afectadas por la presencia de excipientes, especialmente cuando se está trabajando con bajas dosis de principio activo. En la Figura 28 se muestra el espectro de RCN y el patrón de difracción de Rayos X de una muestra compuesta por una mezcla de 21 mg de Clorpropamida polimorfo A y 900 mg de Lactosa. Mientras el espectro de RCN no es afectado, el patrón de difracción de rayos X se modifica fuertemente pues es posible identificar sólo uno de los picos correspondiente a la clorpropamida.

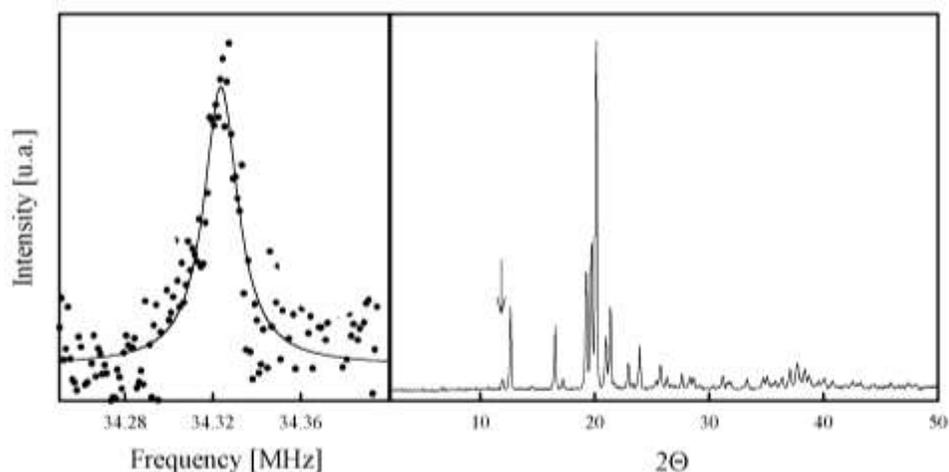


Figura 28: Espectro de RCN y patrón de difracción de una muestra conteniendo 21 mg de Clorpropamida polimorfo A y 900 mg de Lactosa.. La flecha indica el único pico correspondiente a Clorpropamida que puede ser identificado claramente.

Por esto la RCN es una técnica no destructiva para la caracterización de productos farmacéuticos terminados. Un ejemplo de esta aplicación de la RCN es el estudio de comprimidos de diclofenac sódico manufacturados en Argentina y Brasil. El principio activo en los comprimidos debe estar en su forma anhidra; sin embargo se detectaron comprimidos en los cuales se detectaron hidratos del diclofenac sódico lo cual afecta su velocidad de disolución como se observa en las Figuras 29 - 36 de abajo donde se denomina DPA a productos manufacturados por laboratorios Argentinos y DPB los que fueron manufacturados en Brasil.

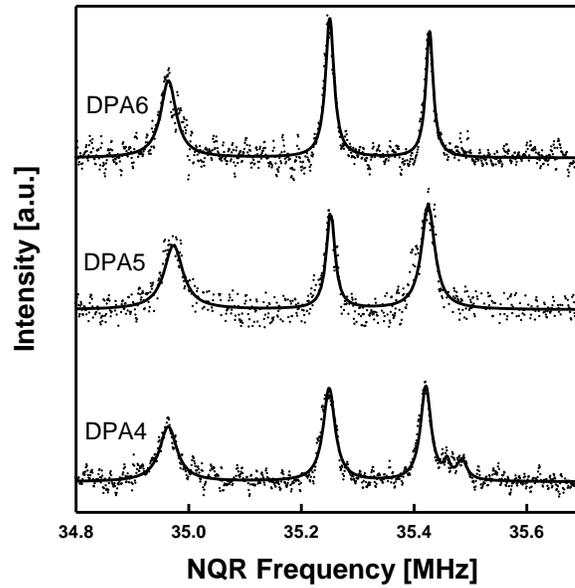


Figure 29: Espectro de RCN de las muestras DPA4, DPA5 y DPA6. Estos espectros muestra que el diclofenac sódico están su forma anhidra.

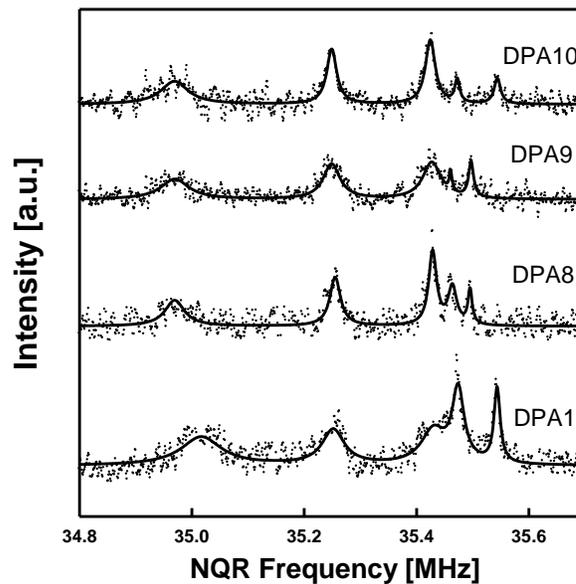


Figure 30: Espectros de RCN de muestras de DPA1, DPA3, DPA8, DPA9 y DPA10. Los espectros muestran otros picos además de los que corresponden a la fase anhidra indicando la presencia de otras formas cristalinas.

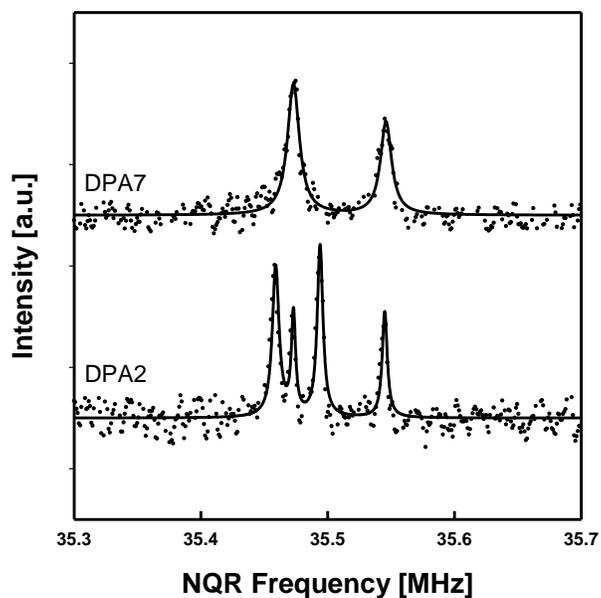


Figure 31: El espectro de RCN de la muestra DPA2 muestra que el diclofenac sódico está en una mezcla de las formas trihidrato y pentahidrato. El espectro de la muestra DPA7 muestra la presencia de la forma trihidratada.

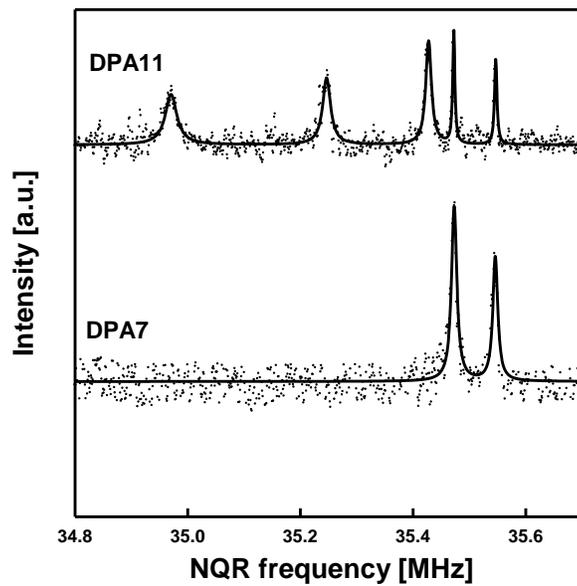


Figure 32: El espectro de RCN de comprimidos de diferentes lotes producidos por un mismo laboratorio muestran modificaciones en la forma cristalina del principio activo. La muestra DPA7 es la forma trihidratada y la muestra DPA11 es una mezcla de la forma anhidra y el trihidrato.

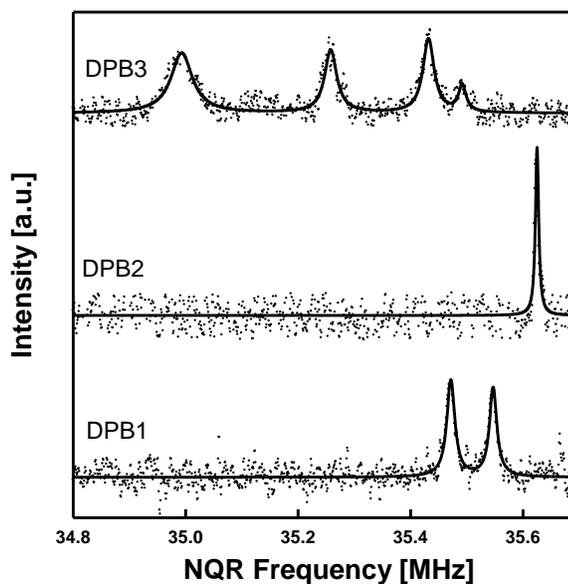


Figure 33: Espectros de RCN de muestras producidas en Brasil. La muestra DPB1 está en la forma trihidratada, la muestra DPB2 en la forma ácida y la muestra DPB3 en la forma anhidra.

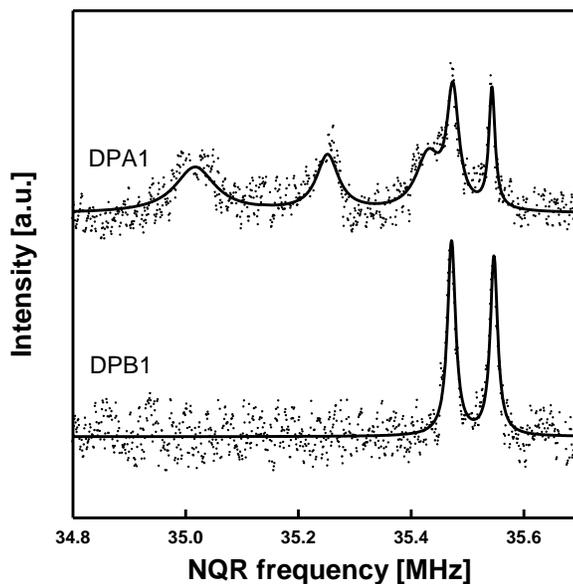


Figure 34: Las muestras DPA1 y DPB1 son producidas por el mismo laboratorio pero en diferentes países. Del espectro de RCN se puede determinar que el principio activo está como una mezcla de las formas anhidra y trihidratada en el producto fabricado en Argentina mientras que en el producto Brasileiro el principio activo está en la forma trihidratada.

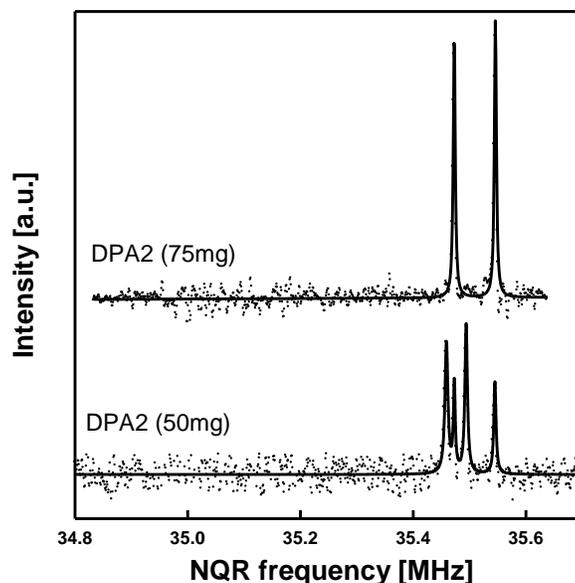


Figure 35: Los espectros de RCN de comprimidos con diferentes dosis producidas por el mismo laboratorio muestran modificaciones del principio activo. Los comprimidos de 75 mg están en la forma trihidratada mientras que los de 50 mg son una mezcla de las formas trihidratada y pentahidratada.

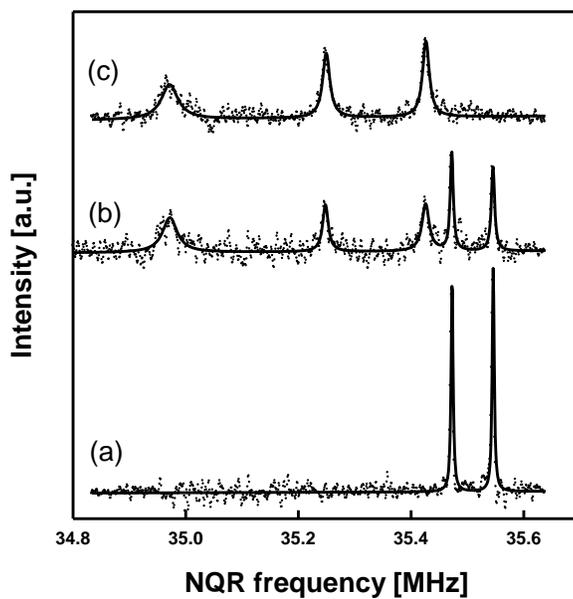


Figure 36: Se siguió por RCN el proceso de secado de la muestra DPA2 de 75 mg, que se encontraba en la forma trihidratada. (a) Espectro de RCN de la muestra sin tratar. (b) Espectro de RCN luego de un proceso de secado 60 hs a 60°. (c) Espectro de RCN luego de secar el comprimido por 48 hs a 70°.

Otra aplicación de la RCN al área de la industria farmacéutica fue demostrar su utilidad como elemento de control para determinar el número de comprimidos de 250 mg de Diabinese (clorpropamida) dentro de los frascos [12]. Se pudo ver que hay una relación lineal entre la integral de la señal de RCN y el número de comprimidos en el frasco (ver Figura 37) y el error en la determinación era menor al 3%.

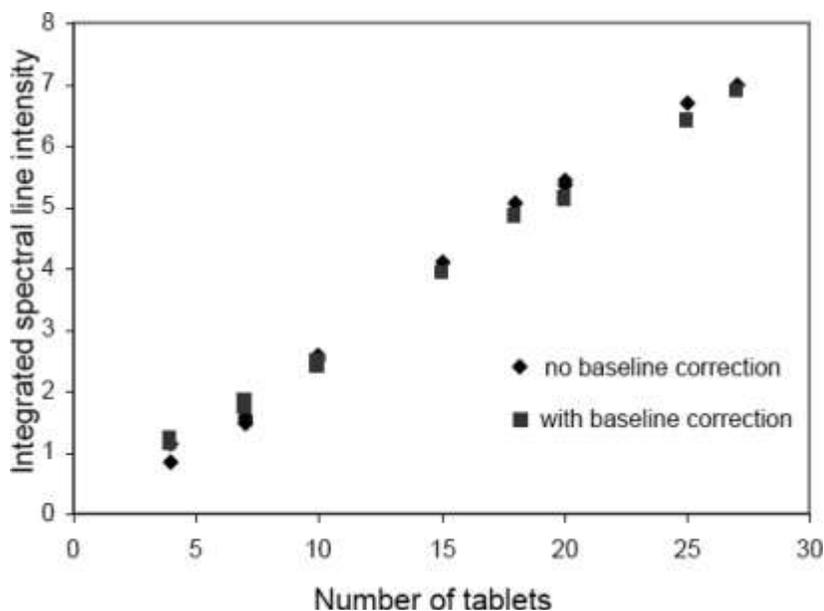


Figure 37: Integral del espectro de RCN en función del número de comprimidos. Puede observarse que hay una relación lineal entre ambos parámetros.

d) Espectroscopía de RCN cuantitativa

Como hemos mencionado anteriormente, el área bajo la línea de RCN es proporcional al número de núcleos cuadrupolares presentes en la muestra. Por lo tanto la RCN puede ser utilizada como una técnica cuantitativa realizando previamente una adecuada calibración. Para realizar esta calibración se determina el área de la línea de RCN para diferentes cantidades conocidas de la materia activa manteniendo los mismos parámetros del espectrómetro para todas las mediciones. En la Figura 38 se muestra una curva de calibración para Clorpropamida polimorfo A obtenida a partir de cinco cantidades conocidas. Como se puede observar para esta materia activa y el espectrómetro utilizado es posible cuantificar cantidades superiores a 20 mg. Se prepararon dos muestras más

conteniendo una mezcla de lactosa y Clorpropamida polimorfo A, una de ellas con una masa total de 852.9 mg con sólo 98.2 mg de principio activo y la otra con una masa total de 843.7 mg conteniendo sólo 52.5 mg de Clorpropamida. Utilizando la curva de calibración, el área de la línea de resonancia de las muestras se corresponden a 93.4 mg y 49.8 mg de Clorpropamida respectivamente. Como pueden observarse, en este caso las discrepancias entre los valores son inferiores al 5%.

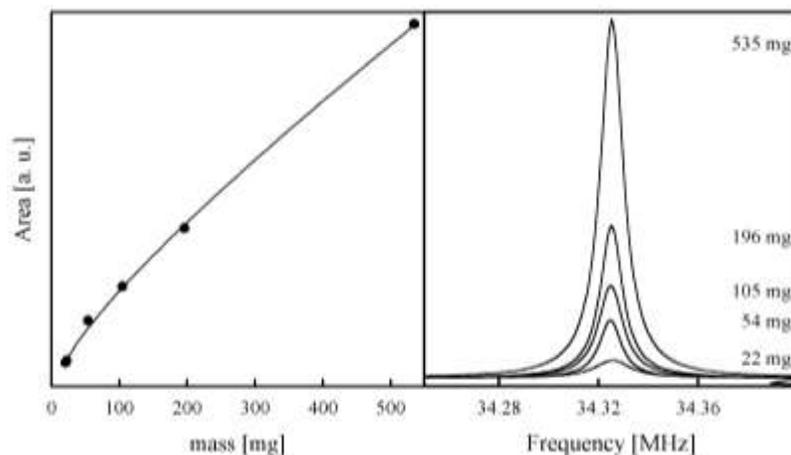


Figura 38: Curva de calibración para Clorpropamida polimorfo A [13].

También es posible detectar la señal de la Clorpropamida en dosis iguales o menores a 10 mg. En este caso es necesario incrementar notablemente el número de promediaciones para mejorar la relación señal/ruido, pero aún así el error asociado al área de la línea de resonancia es muy elevado comparado con el obtenido en muestras de 20 mg.

Estos límites de detección y cuantificación dependen de las características del espectrómetro y del compuesto en particular (número de núcleos cuadrupolares por unidad de volumen, impurezas, etc.).

Es también posible determinar el porcentaje de cada polimorfo presente en muestras que contienen mezclas usando el área bajo los picos de RCN. Para este experimento se prepararon seis muestras conteniendo mezclas de Clorpropamida polimorfos A y C en diferentes proporciones. Después de adquirir los espectros a ambas frecuencias, el porcentaje de polimorfo C en la muestra total se puede calcular como el área de la línea de

RCN del polimorfo C dividido por la suma de las áreas de las líneas de RCN de ambos polimorfos. Como puede observarse en la Figura 39 los porcentajes determinados por RCN están en un buen acuerdo con los obtenidos mediante pesaje.

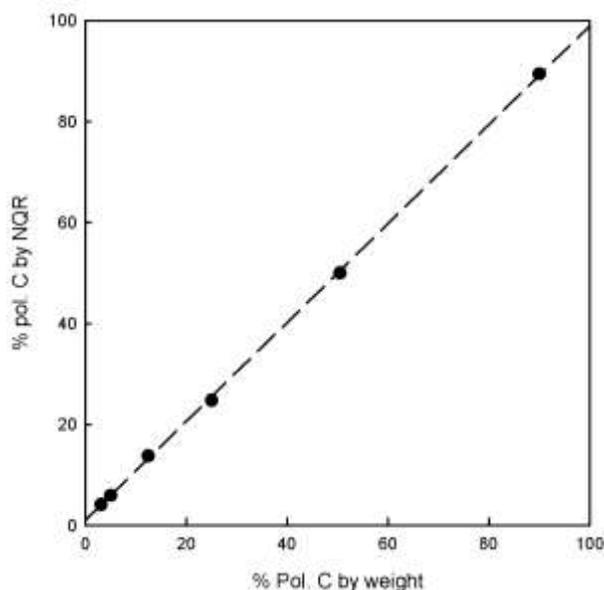


Figura 39: Porcentaje de polimorfo C obtenido por RCN versus porcentaje del mismo obtenido por pesada.

Es importante resaltar que para este tipo de determinación no es necesario realizar una calibración previa.

Finalmente es posible cuantificar una mezcla de formas cristalina y amorfas en la muestra mediante la determinación de la cantidad de forma cristalina dado que la fase amorfa es bastante difícil de detectar (en general presentan líneas de RCN muy anchas de alrededor de centenas o cientos de kHz). Por lo tanto, es necesario realizar una calibración previa del espectrómetro para la forma cristalina y una cuantificación de la cantidad total de principio activo presente en la muestra. Como un ejemplo se prepararon mezclas de forma cristalina (polimorfo A) y amorfa de Clorpropamida con Lactosa (ver tabla 4). En la Figura 40 se muestran dos espectros de diferentes mezclas cristalina/amorfa/lactosa comparados con el espectro correspondiente a igual cantidad de principio activo todo en forma cristalina. Las diferencias en áreas representan la parte de la muestra que se encuentra en

estado amorfo. En este caso el límite de cuantificación de la forma cristalina es el mismo mencionado anteriormente.

Tabla 4: Determinación de contenido de fase amorfa. (a) masa de muestra cristalina obtenida utilizando la curva de calibración mostrada en la Figura 38. (b) masa de muestra amorfa obtenida por diferencia entre la masa total y la masa de muestra cristalina.

	Muestra 1		Muestra 2	
	Por pesada	Por RCN	Por pesada	Por RCN
Excipiente (lactosa)	653 mg		640 mg	
Muestra cristalina	98 mg	93 mg ^a	50 mg	46 mg ^a
Muestra amorfa	102 mg	107 mg ^b	150 mg	154 mg ^b
% amorfo	51	53	75	77

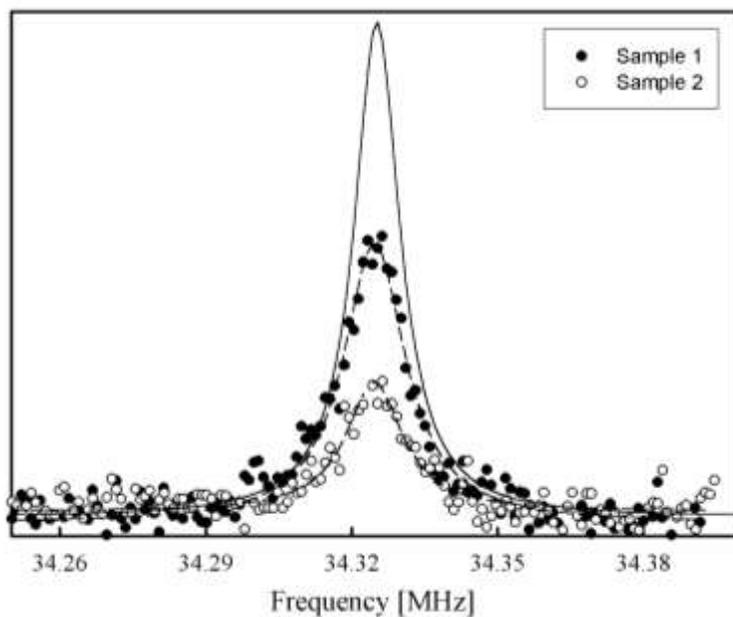


Figura 40: Cuantificación de mezclas amorfo/cristalinas de Clorpropamida.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA TÉCNICA

Para poder detectar la RCN el compuesto debe estar en estado sólido y poseer un núcleo cuadrupolar, es decir N, Cl, Br, I, etc..($I > \frac{1}{2}$). A primera vista parecería que esto limita mucho a la técnica, sin embargo un gran número de compuestos de interés farmacéutico poseen átomos de nitrógeno ó cloro o están como clorhidratos.

El espectro de RCN es único para cada sustancia (a una dada temperatura) dado que es debido a la distribución de GCE de la muestra y usualmente el espectro de RCN está caracterizado por no más de tres o cuatro picos.

Otra ventaja de la RCN es que no se requiere ninguna preparación especial de la muestra. El único problema está asociado con efecto de tamaño finito, por ejemplo cuando la relación superficie/volumen de los granos es grande. En estos casos la línea de RCN está ensanchada y resulta necesaria la recrystalización del compuesto para observar la señal.

Otro problema puede aparecer si los excipientes u otro principio activo tienen frecuencias de resonancia en el mismo rango. Es bastante improbable que esto ocurra pues sería necesario que tengan el mismo núcleo cuadrupolar que la sustancia estudiada y tener la misma distribución de GCE. Esto es más probable que ocurra en diferentes fases de un mismo compuesto y aún en este caso es posible asignar las frecuencias a los distintos estados cristalinos tal como fue mencionado anteriormente.

REFERENCIAS

- [1] Slichter C.P., Principles of Magnetic Resonance, Cap 10, 3ª Ed. Springer-Verlag
- [2] Chihara H. and Nakamura N., J. Chem Phys. **59**, 5392 (1973).
- [3] Pérez S. C. and Brunetti A., J. Phys. Condens. Matter, **7**, 101 (1995)
- [4] Abragam A., The principles of Nuclear Magnetism, Claredon 1961
- [5] Chihara H. and Nakamura N, “Study of molecular motion by nuclear quadrupole resonance and relaxation”, Advanced in Nuclear Quadrupole Resonance, Vol. 4, Heyden (1980)
- [6] Kiichi T, Nakamura N. and Chihara H., J. Mag. Reson., 6, 516 (1972)
- [7] Pérez S. C., Armstrong R. and Brunetti A, J. Phys. Condens. Matter, **5**, 4045 (1993)
- [8] Pérez S. C., Armstrong R. and Brunetti A, J. Phys. Condens. Matter, **5**, 4055 (1993)
- [9] Christian J. W., The theory of transformation in metals and alloys, Part I, Pergamon Press, Oxford (1975)
- [10] Meriles C., Pérez S. C., Schurrer C. and Brunetti A, Phys. Review B, **56**, 22, 14374 (1997).
- [11] Limandri S, Wolfenson A et al, Analytical Chemistry, **83**, 1773 (2011).
- [12] Tate E., Althoefer K., Barras J., Rowe M., and Smith J.A.S.; Analytical Chemistry, **81**, 5574 (2009).
- [13] Pérez S.C. et al., Int. J. of Pharm., **298**, 143 (2005)