

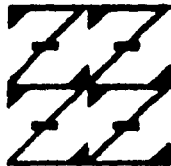
30
29



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**U N A M
F E S
Z A R A G O Z A**



**LO VIMOS EN
DE NUESTRA DEFENSA**

**FORMACION, CARACTERIZACION Y EVALUACION DE LA
SOLUBILIDAD DEL COMPLEJO DE INCLUSION DEL ACIDO
ACETILSALICILICO Y B-CICLODEXTRINA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A

CLAUDIA ESTRELLA GONZALEZ OSORIO

MEXICO, D. F.

MAYO 1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACION DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a usted como Sinodal del Examen Profesional del (la) señor (ita):

GONZALEZ OSORIO CLAUDIA ESTRELLA

para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo:

Le agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: FORMACION, CARACTERIZACION Y EVALUACION DE LA SOLUBILIDAD DEL COMPLEJO DE INCLUSION DEL ACIDO ACETILSALICILICO Y BETA-CICLODEXTRINA.

y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE Q. FRANCISCO SILVA FLORES

VOCAL DRA. RAQUEL LOPEZ ARELLANO

SECRETARIO M. en C. BEATRIZ ESPINOSA FRANCO

SUPLENTE Q.F.B. MINERVA MALDONADO BERNY

SUPLENTE Q.F.B. BLANCA LYDIA GARCIA

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F. 26 de ENERO de 1995.

Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados.
c.c.p. Interesado.

**ESTE TRABAJO FUÉ REALIZADO EN EL ÁREA QUÍMICA DEL
DEPARTAMENTO DE SERVICIOS DE CONTROL ANALÍTICO Y
EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y
ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA
Q.F.B. MINERVA MALDONADO BERNY.**

AGRADESCO:

A DIOS, por darme la vida, conservarme y enseñarme a disfrutar y a aprender en ella.

A mi Madre Martha Osorio

Con mi trabajo deseo expresarte y hacerte sentir mi admiración por tu carácter noble y a la vez arduo. Mi amor que no tiene medida. Tu apoyo constante para que yo mismo encuentre mi propio camino y cumpla mis objetivos. Siempre contarás conmigo.

GRACIAS

A mi tía Claudia Osorio

Por su cariño, apoyo y consejo, a quien amo y respeto como a otra madre.

A mis hermanos, Karina, Ma. del Carmen, Erick y Laura.

Como quisiera tener el poder de la mente y la palabra para eliminar sus temores y así sin miedo, pudieran caminar siempre seguros de sí mismos.

Como quisiera tener la fuerza de la razón y de la verdad para compartirla con ustedes y así, convencida estuviera siempre de que su esfuerzo y empeño están puestos en un camino cierto.

Como me gustaría conocerles, tener la sabiduría para adivinarles lo bueno y lo malo, para poder darles siempre el consejo más certero.

Como me gustaría saber que han triunfado, que su talento es éxito, que su temperamento está correspondido, que han logrado su más profundo anhelo.

Conserven su alegría

A mi Abuelo Agustín Osorio †

Cuyo recuerdo estará siempre presente en mí y espero algún día encontrar nuevamente para darle todo mi amor que aún le corresponde.

A la Q.F.B. Minerva Maldonado por su amistad

A la Q.F.B. Ma. Eugenia Lagarde, jefa del área química, por permitir la realización de éste trabajo en el departamento a su cargo.

Al Q.F.B. Marco Tulio Morales por su apoyo constante a la investigación.

A la Dra. Raquel López Arellano por su comprensión

A los profesores que me legaron su conocimiento

A todo el personal del CINVESTAV que contrubuyó para la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros con quienes compartí una de las etapas más importantes de mi vida.

**Esperando que por sobre todo nuestra amistad perdure,
agradesco a Estela, Alicia, Verónica, Andrea y José permitirme
conocerlos.**

**A la Piedra que hizo diferente el recorrido del camino,
compartiendo conmigo la música que hace el agua al caer y
tocar el suelo.
No importa lo que pase, jamás se desintegrará.**

A Henry y Lety por su valiosa ayuda.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	6
CAPITULO 1. MONOGRAFÍA DE MATERIAS PRIMAS	9
1.0. PROPIEDADES DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	9
1.1 ANTECEDENTES	9
1.2. PROPIEDADES FÍSICAS	10
1.3. EFECTOS TERAPÉUTICOS	13
1.4. METABOLISMO Y ABSORCIÓN	16
1.5. EFECTOS ADVERSOS	17
2.0. PROPIEDADES DE LA β-CICLODEXTRINA	18
2.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES	18
2.2. EFECTOS BIOLÓGICOS	21
2.3. TOXICIDAD	24
CAPITULO 2. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN	25
1.0. DEFINICIONES	25
2.0. REQUERIMIENTOS PARA LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS	26
2.1. GEOMETRÍA MOLECULAR	27
2.2. POLARIDAD	28
2.3. MEDIO DE PREPARACIÓN	29
2.4. FUERZAS DE INTERACCIÓN	31
3.0. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN	33
3.1. PREPARACIÓN EN SOLUCIÓN	33
3.2. PREPARACIÓN EN SUSPENSIÓN	35
3.3. PREPARACIÓN POR AMASADO	36
3.4. PREPARACIÓN EN FASE SÓLIDA	36
3.5. PREPARACIÓN POR FUSIÓN	37
4.0. ESTABILIDAD DEL COMPLEJO	38
4.1. DIAGRAMAS DE SOLUBILIDAD	39
4.2. CÁLCULO DE LA CONSTANTE DE ESTABILIDAD	43

5.0. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS.....	46
5.1. ANÁLISIS POR ULTRAVIOLETA.....	47
5.2. MÉTODOS TÉRMICOS.....	48
5.3. ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO.....	48
5.4. MÉTODOS DIVERSOS.....	49
CAPITULO 3. APLICACIONES GENERALES DE LA β-CICLODEXTRINA.....	51
1.0. APLICACIÓN FARMACÉUTICA.....	51
1.1. AUMENTO DE LA SOLUBILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD.....	52
1.2. EFECTO DE LA ESTABILIDAD FÍSICA Y QUÍMICA.....	54
1.3. REDUCCIÓN DE EFECTOS BIOLÓGICOS ADVERSOS.....	55
1.4. MANUFACTURA DE TABLETAS.....	55
2.0. INDUSTRIA COSMÉTICA Y ALIMENTICIA.....	56
3.0. PESTICIDAS.....	56
4.0. BIOTECNOLOGÍA.....	57
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	58
OBJETIVOS.....	60
HIPÓTESIS.....	61
MATERIAL.....	62
METODOLOGÍA.....	64
RESULTADOS.....	70
CONCLUSIONES.....	97
RECOMENDACIONES.....	98
BIBLIOGRAFÍA.....	99

INDICE DE TABLAS

TABLA 1	Propiedades Generales de la β -Ciclodextrina
TABLA 2	Aumento de la solubilidad de la β -Ciclodextrina en función de la temperatura
TABLA 3	Solubilidad del ácido acetilsalicílico a pH 2
TABLA 4	Análisis de la Varianza para la solubilidad del ácido acetilsalicílico a pH 2
TABLA 5	Datos de solubilidad para determinar la constante de complejación
TABLA 6	Análisis de la varianza para la determinación de la constante de complejación
TABLA 7	Evaluación de la linealidad del sistema
TABLA 8	Análisis de la varianza para linealidad del sistema
TABLA 9	Evaluación de la precisión del sistema
TABLA 10	Evaluación de la reproducibilidad del método
TABLA 11	Análisis de la varianza para la evaluación de la reproducibilidad del método
TABLA 12	Uniformidad de contenido del complejo de inclusión
TABLA 13	Solubilidad del complejo de inclusión del complejo AAS: β -Ciclodextrina
TABLA 14	Análisis de la varianza para la evaluación de la reproducibilidad en la determinación de la solubilidad del complejo de inclusión

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1** Estructura química del ácido acetilsalicílico
- FIGURA 2** Estructura química de la α β y γ -Ciclodextrina
- FIGURA 3** Representación del equilibrio de disolución-disociación-absorción de un complejo de inclusión fármaco-ciclodextrina
- FIGURA 4** Representación del proceso de complejación en solución
- FIGURA 5** Diagrama de solubilidad de fase típico
- FIGURA 6** Diagrama de solubilidad de fase en presencia de β -Ciclodextrina
- FIGURA 7** Termograma para la determinación de la pureza del ácido acetilsalicílico
- FIGURA 8** Diagrama de solubilidad del ácido acetilsalicílico a pH 2
- FIGURA 9** Espectros de Ultravioleta obtenidos en la determinación de la constante de formación del complejo de inclusión del ácido acetilsalicílico y β -Ciclodextrina
- FIGURA 10** Diagrama de solubilidad para determinar la constante de complejación
- FIGURA 11** Espectros de ultravioleta comparativos de las diferentes mezclas de ácido acetilsalicílico y β -Ciclodextrina
- FIGURA 12** Espectro de ultravioleta del ácido acetilsalicílico
- FIGURA 13** Espectro de ultravioleta de la β -Ciclodextrina
- FIGURA 14** Espectro de ultravioleta de la mezcla de complejación por amasado
- FIGURA 15** Termograma DSC del ácido acetilsalicílico
- FIGURA 16** Termograma DSC de la β -Ciclodextrina
- FIGURA 17** Termograma DSC de la mezcla de complejación
- FIGURA 18** Espectro de infrarrojo del ácido acetilsalicílico
- FIGURA 19** Espectro de infrarrojo de la β -Ciclodextrina
- FIGURA 20** Espectro de infrarrojo de la mezcla de complejación por amasado
- FIGURA 21** Diagrama de solubilidad del complejo de inclusión del ácido acetilsalicílico y β -Ciclodextrina a pH 2
- FIGURA 22** Diagrama comparativo de la solubilidad del ácido acetilsalicílico

ABREVIATURAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
β-CD	Beta-Ciclodextrina
USP	United States Pharmacopeia
BP	British Pharmacopeia
SNC	Sistema Nervioso Central
HPLC	High Performance Liquid Chromatographic
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución (equivalente en español de HPLC)
GLC	Gas Liquid Chromatographic
CG	Cromatografía Gas Líquido (equivalente en español de GLC)
DSC	Diferencial Scanning Calorimetry
CDB	Calorimetría Diferencial de Barrido (equivalente en español de DSC)
IR	Infrarrojo
UV	Ultravioleta
ANOVA	Análisis estadístico de la varianza
Fobs	Valor crítico teórico del estadígrafo de contraste F de Fisher
Fcrit	Valor experimental del estadígrafo de contraste F de Fisher
C.V.	Coefficiente de Variación

INTRODUCCIÓN

En los años recientes gran parte de la investigación farmacéutica se ha enfocado hacia el desarrollo de nuevos fármacos o bien a la reformulación de aquellos que durante largo tiempo han sido efectivos. En general se busca que las nuevas formulaciones presenten una mayor estabilidad y mejores propiedades de biodisponibilidad. Esto permite el diseño de nuevos y mejores sistemas de liberación de medicamentos dentro de los que destaca el empleo de Ciclodextrinas para formar complejos de inclusión.

Las Ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos formados por 6, 7 y 8 unidades de glucosa llamadas α , β y γ -Ciclodextrina respectivamente. La estructura formada es en el exterior muy hidrofílica y relativamente hidrofóbica en la cavidad interior. Dadas las características ya mencionadas estas moléculas son capaces de formar compuestos de inclusión con una gran diversidad de moléculas, en medio líquido o sólido.

Los compuestos de inclusión así formados muestran propiedades especiales, que hacen posible el incremento en la estabilidad del principio activo cuando se somete a efectos de temperatura, oxidación o hidrólisis, esto permite que compuestos originalmente incompatibles entre sí puedan ser formulados conjuntamente.

La formación de éstos complejos de inclusión permite adicionalmente incrementar la solubilidad de compuestos poco solubles mejorando importantemente la absorción y

biodisponibilidad de los de los fármacos complejados incrementando finalmente la eficiencia terapéutica alcanzada.

El ácido acetilsalicílico, clasificado como antiinflamatorio no esterooidal, es prescrito en los padecimientos artríticos y en la terapia antiplaquetaria de pacientes con afección cardíaca. En estos pacientes los efectos secundarios se ven acentuados dado que deben consumir el medicamento por tiempos prolongados. El principal efecto secundario es la irritabilidad gástrica, provocada por el propio mecanismo de acción del fármaco, la acumulación de ácido salicílico en las células de la mucosa, y por la baja solubilidad de las tabletas administradas.

El objetivo del presente trabajo fue formar un complejo de inclusión entre el ácido acetilsalicílico y la β -Ciclodextrina, el cual pudiera presentar mejores características de solubilidad, a fin de reducir la irritabilidad gástrica del principio activo.

Se realizó un estudio de solubilidad de fase para determinar las condiciones óptimas de formación del complejo, así como la constante de formación del mismo. De los resultados obtenidos se calcularon las cantidades necesarias para formar el complejo por amasado, eligiéndose éste después de realizar un estudio comparativo con otros métodos. El producto obtenido, así como las materias primas individuales se caracterizaron por las técnicas de UV, DSC e IR. Comparando el comportamiento de los espectros y los termogramas se pudo comprobar la formación del complejo con un rendimiento del 100%.

Se realizó el análisis de solubilidad del complejo, para compararla con la solubilidad del fármaco sin complejar. Obteniéndose un valor de 49.092 mg/10 ml para el fármaco complejoado y 37.70 mg/10 ml para el fármaco sin complejar; mostrándose un aumento en la solubilidad del ácido acetilsalicílico. Adicionalmente, en el espectro de IR se observa que los grupos funcionales lábiles, se encuentran formando puentes de hidrógeno dentro de la cavidad de la β -Ciclodextrina, por lo que posiblemente se incremente la estabilidad de la molécula de ácido acetilsalicílico.

Dados los resultados, es posible que al aumentar la solubilidad y posiblemente la estabilidad, la irritabilidad gástrica que presenta el ácido acetilsalicílico pueda ser reducida en beneficio de los pacientes que necesitan consumir este medicamento por periodos prolongados.

CAPITULO 1

MONOGRAFÍA DE MATERIAS PRIMAS

1. PROPIEDADES DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

1.1 ANTECEDENTES

El ácido acetilsalicílico (AAS) es uno de los medicamentos más empleado mundialmente por su actividad antiinflamatoria y antipirética principalmente. Fue sintetizado en 1853, pero no fue empleado como medicamento hasta 1899 cuando se descubrió que era efectivo contra la artritis, desde entonces la investigación en su entorno no ha cesado y aumenta su uso en el tratamiento de otros padecimientos. En años recientes se ha puesto interés en su efecto sobre la reducción de efectos vasculares graves. Esta actividad se debe principalmente a la capacidad de inhibir la síntesis de las plaquetas sin prolongar el tiempo de sangrado.⁽¹⁾ Su aplicación se ha encaminado a la prevención secundaria después del infarto al miocardio, al tratamiento de trastornos neurológicos reversibles y al tratamiento postoperatorio de angina de pecho, para lo que ha demostrado ser tan efectivo como el dipiridamol o la sulfanpirazona ^(2,3). Para fomentar el uso del AAS en este tipo de padecimientos se ha puesto énfasis en el desarrollo de formas farmacéuticas que ayuden a disminuir los efectos adversos, principalmente de irritabilidad gástrica, a fin de que pueda seguir conservando su lugar como medicamento de primera elección aprovechando al máximo sus propiedades.

1.2. PROPIEDADES FÍSICAS

El ácido acetilsalicílico (aspirina) forma cristales blancos, estables al aire seco, pero se hidroliza gradualmente en el aire húmedo dando como productos de degradación ácido salicílico y ácido acético. Usualmente es inodoro, pero puede presentar un olor ligero a ácido acético que se hace más notable cuando la forma farmacéutica ha permanecido expuesta a altas temperaturas (80 °C). Al mezclarlo con bicarbonato de sodio y ponerlo en contacto con la humedad atmosférica puede formar una goma producto de una solución parcial y posterior hidrólisis.⁽⁴⁾ Las soluciones alcalinas de citratos y acetatos lo disuelven rápidamente pero igual lo hidrolizan para formar las respectivas sales de ácido acético y salicílico.

En solución se descompone a una velocidad que depende del pH siendo menos susceptible a un pH aproximado a 2.5 en el cual es estable por días.⁽⁵⁾ Es estable en alcoholes, glicoles y otros solventes orgánicos.

Su peso molecular es de 180.15 g/mol. Presenta la siguiente estructura química.

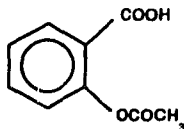


FIG. 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

1.2.1. SOLUBILIDAD

La solubilidad en agua es de 3.3. mg/ml a 25 °C y de 10 mg/ml a 37 °C.⁽⁶⁾ En etanol se disuelven de 20 a 40 mg/ml; es parcialmente soluble en éter absoluto e insoluble en éter de petróleo.

Su solubilidad aumenta en presencia de polietilenglicoles así como por la formación de micelas empleando agentes surfactantes.⁽⁶⁾

1.2.2 PROPIEDADES ESPECTRALES

INFRARROJO

El espectro de infrarrojo de AAS generalmente es obtenido en pastillas de bromuro de potasio. Sus bandas características aparecen en 1757 cm^{-1} debido a la señal del grupo éster. Entre 1680 y 1695 cm^{-1} aparece la señal debida al grupo ácido carboxílico aromático. Adicionalmente se observan las bandas de tensión característica de los ácidos carboxílicos en el rango de los 2500 a 3000 cm^{-1} . Cercano a los 1480 cm^{-1} aparece la banda de tensión C=C también presente en la molécula de AAS.^(6, 7, 8)

ULTRAVIOLETA

El AAS en medio ácido (H_2SO_4 0.1 N o HCl 0.2 N) presenta máximos de absorbancia a 276 nm y 229 nm. Modificando el medio a etanol o agua, aparecen máximos a 280 nm menos definidos y de menor intensidad.⁽⁶⁾

FLUORESCENCIA

En medio ácido (H_2SO_4) se observa una longitud de excitación máxima a 280 nm y de emisión a 335 nm. ⁽⁶⁾

1.2.3. PROPIEDADES EN ESTADO SÓLIDO

PUNTO DE FUSIÓN

El punto de fusión del AAS no está bien definido, se le reporta desde 180 °C a 144 °C aunque la mayoría de las publicaciones oficiales (USP, BP) coinciden en un punto de fusión de 135 °C cuando las condiciones de calentamiento son rápidas. ⁽⁶⁾

B) COMPORTAMIENTO TÉRMICO

Cuando el AAS es analizado por DCS una tasa de calentamiento de 8 °C/min. en atmósfera de nitrógeno se observa una endoterma con Tonset a 130 °C y un máximo a 135 °C. ⁽⁵⁷⁾

C) POLIMORFISMO

Son conocidas dos especies polimórficas, dependiendo del solvente de cristalización del cual se obtengan. La forma 1 se obtiene de la cristalización de etanol al 95 % y la forma 2 se obtiene de la cristalización con hexano. Las dos formas polimórficas tienen dos puntos de fusión diferentes dentro del rango ya mencionado, siendo la forma 2 más soluble en agua. ⁽⁶⁾

1.3. EFECTOS TERAPÉUTICOS

1.3.1 EFECTO ANALGÉSICO

El AAS es uno de los agentes más empleados para reducir el dolor moderado de origen variable. Alivia el dolor de diversas causas, como el muscular, vascular o dental, así como el artrítico, a dosis de 300 a 600 mg. No es eficaz en el tratamiento de dolor visceral que se asocia al de abdomen agudo, cólico renal o infarto del miocardio.⁽⁶⁾

La capacidad para aliviar la sensación del dolor es mediada centralmente, en gran parte debida a que la coordinación antipirética y analgésica se encuentran en la misma área del hipotálamo. Otros investigadores sugieren que la acción es periférica mediante su efecto en la inflamación. El AAS tiene la ventaja de que su consumo no desarrolla tolerancia o adicción, y su toxicidad es más baja que la de otros analgésicos potentes.⁽⁶⁾

1.3.2. EFECTO ANTIPIRÉTICO

El AAS disminuye la temperatura cuando hay fiebre, pero en las dosis usuales tiene poco o ningún efecto cuando la temperatura es normal.⁽¹⁰⁾ Este efecto está relacionado con el incremento de la disipación del calor producido por la dilatación de los vasos sanguíneos superficiales. Considerando que la fiebre por infección se debe principalmente a la síntesis de prostaglandinas, el AAS al bloquear éste efecto provoca el control de temperatura en el hipotálamo facilitando la disipación del calor por vasodilatación.

1.3.3. EFECTO ANTIINFLAMATORIO

Las propiedades antiinflamatorias del AAS son recomendadas en el tratamiento inicial de la artritis reumatoide, fiebre reumática y otras alteraciones inflamatorias en las articulaciones.

Las dosis de AAS necesarias para estos padecimientos son de 5 a 8 g por día en tomas de 1 g cada vez. Su efecto solo suprime el comportamiento inflamatorio doloroso de estas enfermedades, la lesión tisular progresiva no se modifica.⁽¹⁰⁾

1.3.4 EFECTO EN LA INHIBICIÓN DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA

El AAS es uno de los agentes antiplaquetarios más empleados, es económico y eficaz, tolerándose bien a dosis bajas. Se ha reportado que aumenta la supervivencia después del ataque al miocardio, que impide el reinfarcto y la isquemia cerebral transitoria. También se ha demostrado su eficacia en el mantenimiento de la permeabilidad cuando se realizan injertos o transplantes.

Al igual que algunos otros antiinflamatorios no esteroidales que inhiben la función plaquetaria al bloquear la formación del tromboxano A₂, el AAS inhibe de forma irreversible la ciclooxigenasa plaquetaria por acetilación. Dado que la plaqueta es incapaz de sintetizar ciclooxigenasa nueva, el efecto persiste durante toda la vida celular de la plaqueta.

Se ha observado que el AAS afecta a la hemostasia. A simples dosis de 300 mg se produce una ligera prolongación en el tiempo de sangrado que se duplica si la administración se prolonga por una semana. Este efecto llega a durar hasta 10 días mientras se forman nuevas plaquetas, siendo un efecto mayor que el presentado por otros agentes anticoagulantes. Sin embargo no se ha encontrado evidencia entre este efecto y la

hemorragia gastrointestinal, ni mucho menos aumento en el riesgo de una cirugía de un paciente que consume AAS.

La terapia antiplaquetaria del AAS ha sido empleada en la profilaxis secundaria en personas que padecen trombosis arterial o daño cardiovascular. Estudios realizados en pacientes que presentaron previo ataque isquémico, infarto al miocardio o angina inestable, demostraron que una dosis diaria entre 300 y 350 mg reduce en riesgo de reinfartación en un 85 % y la muerte vascular hasta en un 22 %.⁽¹¹⁾ En otras investigaciones aplicando tratamientos prolongados, la administración de dosis altas (1000 mg/día) causó dispepsia y náusea en 10 a 20 % de los pacientes tratados. También se presentó cefalea y gota en 1% de los pacientes tratados a un año. Dichos efectos indeseables pueden ser eliminados cuando se interrumpe el tratamiento o empleando dosis más bajas.⁽¹²⁾

Se ha sugerido que alrededor de 75 mg se puede presentar un efecto similar, trayendo consigo menos efectos indeseables.^(13, 14) A esta dosis, se ha visto una reducción en la oclusión coronaria debida a la formación de trombos; la dosis es bien tolerada y puede ser prescrita por un periodo prolongado.

Con la finalidad de reducir el daño gástrico que provoca a los pacientes el consumir con frecuencia AAS, se ha probado el empleo de tabletas con cubierta entérica, comparando su acción con tabletas sin recubrir, ambas a una dosis de 325 mg. Se encontró un efecto antiplaquetario equivalente entre ambas presentaciones, pero el tiempo al cual se alcanza el efecto deseado es menor en tabletas sin recubrir (10 min.) que el obtenido con tabletas recubiertas (30 min.). Lo anterior puede limitar el valor del empleo de tabletas con cubierta entérica, pero por otra parte es un recurso que disminuye los efectos gastrointestinales que trae consigo las tabletas sin recubrir. Sin embargo cuando las

tabletas recubiertas son masticadas se observa una gran inhibición de la agregación de las plaquetas en un lapso de 15 minutos, observándose una recuperación total de la actividad plaquetaria desde los tres días después de la ingestión. Estos resultados demostraron un rápido inicio en la inhibición plaquetaria, lo que es relevante para fomentar su empleo; así mismo se demuestra que puede recetarse en pacientes que serán sometidos a cirugía sin riesgo de sangrado excesivo. ⁽¹⁵⁾

Esta información abre amplias posibilidades de investigación tanto en el campo médico como en el área de desarrollo farmacéutico dentro del cual el empleo de la β -Ciclodextrina aumenta la estabilidad del AAS, disminuyendo los efectos secundarios indeseables.

1.4. METABOLISMO Y ABSORCIÓN

El AAS es absorbido rápidamente en el estómago y en la porción superior del intestino delgado, presentando una concentración plasmática máxima en 1 a 2 horas. El medio ácido del estómago mantiene una gran porción de salicilato en su forma no ionizada facilitando su absorción. Una vez absorbido se hidroliza a ácido acético y salicilato por acción de las esterasas del tejido y la sangre, sin embargo cuando altas concentraciones de salicilato se unen a la célula parietal el medicamento puede dañar la mucosa gástrica.

El salicilato se une a la albúmina, pero conforme aumenta la concentración sérica del compuesto, una fracción permanece sin unir y disponible para los tejidos. El salicilato generado por la hidrólisis del AAS puede excretarse sin cambio, pero la mayor parte es convertida a conjugados hidrosolubles que son depurados con rapidez en el riñón. ⁽¹⁰⁾

1.5. EFECTOS ADVERSOS

El efecto secundario principal y más frecuente del AAS es la irritación de la mucosa gástrica con consecuente hemorragia.⁽¹⁶⁾ El AAS generalmente es administrado en tabletas, estas no se dispersan o disuelven completamente, lo que trae como consecuencia que grandes partículas del principio activo puedan adherirse a la mucosa y causar un daño visible. Con frecuencia se ha observado que puede producirse úlcera gástrica y si antes la hubo, estas pueden empeorar.⁽¹⁷⁾ Estos efectos se han observado tanto en personas que consumen AAS simple o amortiguado, debido a que las formas farmacéuticas actuales que contienen AAS no difieren significativamente una de otra respecto a su solubilidad por lo que grandes cantidades de este pueden encontrarse intactas en el estómago sin importar la presentación farmacéutica.

Aunado a la irritabilidad gástrica existe un aumento en la pérdida de sangre en las heces fecales, la cifra normal de 1 ml al día aumenta hasta 5 ml en pacientes que ingieren dosis ordinarias, aumenta más aún cuando se consumen dosis altas o por tiempo prolongado. Así mismo, el consumo de alcohol aumenta la hemorragia gástrica dependiente del consumo de AAS.

Algunos de los efectos colaterales indeseables pueden ser disminuidos si se cuenta con una forma farmacéutica que mejore las propiedades de desintegración o disolución.⁽¹⁸⁾

Cuando se consumen altas dosis de AAS se afecta al SNC produciendo un síndrome denominado salicilismo que se manifiesta con mareo, ruido en los oídos, vómito, confusión mental y estimulación del centro respiratorio. Aproximadamente una de cada 500 personas manifiesta algún tipo de hipersensibilidad al AAS. Estas reacciones incluyen hinchazón localizada, urticaria y una forma de asma intensa.

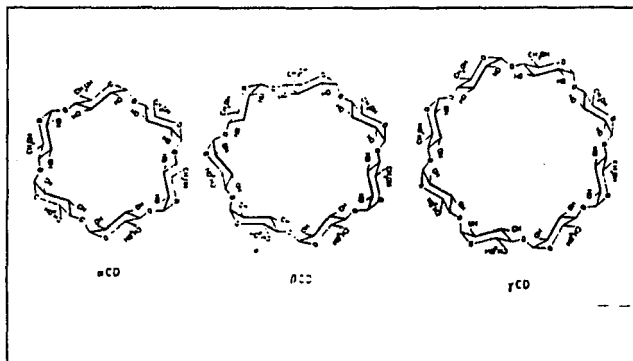
2.0. PROPIEDADES DE LA β -CICLODEXTRINA

2.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

Las Ciclodextrinas (CD) son conocidas como moléculas capaces de formar compuestos de inclusión con diferentes grupos de moléculas, estas son oligosacáridos cíclicos producidos por la degradación enzimática del almidón mediante la acción de la enzima ciclodextrin-glucosil transferasa, la cual es producida por algunas especies de Bacilos, especialmente por *Bacillus macerans*.^(19,20)

Dependiendo de las condiciones de reacción, las Ciclodextrinas contienen seis, siete u ocho unidades de glucosa unidas por enlaces α -1,4 y son más comúnmente conocidas como α , β y Ciclodextrina respectivamente.

FIG. 2. Estructura química de la α , β y γ -Ciclodextrina



Debido a que la tecnología no era suficiente para producirlas en gran escala y a bajo costo, no habían sido empleadas ampliamente a pesar de ser conocidas desde hace tiempo. En la actualidad se ha facilitado su obtención disminuyendo el costo de las mismas, por lo que se ha extendido su empleo.

De las tres Ciclodextrinas la β -CD es la más estudiada, pues se ha encontrado que es posible incluir dentro de ella a compuestos de diferente tamaño formando compuestos más estables.

Algunas de sus propiedades se presentan a continuación: ⁽¹⁹⁾

TABLA 1. Propiedades generales de la β -CD

No. Unidades	6	7	8
Peso Molecular	972	1135	1297
Solubilidad en Agua g/100	14.5	1.85	23.2
Diámetro de la cavidad	0.47-0.53	0.60-0.65	0.75-0.83
Diámetro Exterior	1.46	1.54	1.75
Volumen de la Cavidad	0.174	0.262	0.42
Forma del Cristal	hexagonal	monoclínica	prisma cuadrático

Como consecuencia de la conformación del C₁ de las unidades de glucosa, todos los grupos hidroxilos secundarios están situados a un lado del anillo, y los hidroxilos primarios se orientan al lado contrario. La cavidad está alineada por los átomos de hidrógeno y por los puentes del oxígeno glucosídico. Los electrones no apareados de éste se encuentran dentro de la cavidad, produciendo una alta densidad electrónica, dando a esta características de una base de Lewis. ⁽¹⁸⁾

Los grupos OH del C₂ y del C₃ de la unidad de glucosa adyacente, pueden formar puentes de hidrógeno dando mayor rigidez a la estructura siendo posible que a esto se deba la baja solubilidad de la β-Ciclodextrina.

No se reporta ningún punto de fusión definido, pero se ha observado que alrededor de los 200 °C empieza a descomponerse, este punto varía, dependiendo del contenido de agua, estructura cristalina, composición atmosférica y tasa de calentamiento. ⁽¹⁸⁾

El análisis térmico por DSC presenta dos endotermas, la primera entre los 80 y 100 °C debida a la pérdida de agua, esta puede aparecer o no, dependiendo de el tratamiento previo al que se haya sometido. La segunda endoterma aparece alrededor de los 300 °C debida a la descomposición de la molécula (caramelización). ⁽¹⁸⁾

La solubilidad de la β-CD es solo 1.85 g/100 ml, (a temperatura ambiente) aumentando de manera proporcional con la temperatura, seguida de una fácil recristalización al enfriamiento. La relación temperatura solubilidad se presenta en la tabla 2.

TABLA 2. Aumento de la solubilidad de β -CD en función de la temperatura

TEMPERATURA (°C)	SOLUBILIDAD (mg de β -CD/ g de agua)
20	16.4
25	18.5
30	22.8
35	26.3
45	44.0
55	60.5
70	120.3
80	196.6

En presencia de moléculas orgánicas, la solubilidad de la β -CD decrece considerablemente, debido a la formación de un complejo.

Las Ciclodextrinas son poco reactivas pues no tiene grupos terminales reducibles. Son resistentes las soluciones alcalinas, tanto como la celulosa.

2.2. EFECTOS BIOLÓGICOS

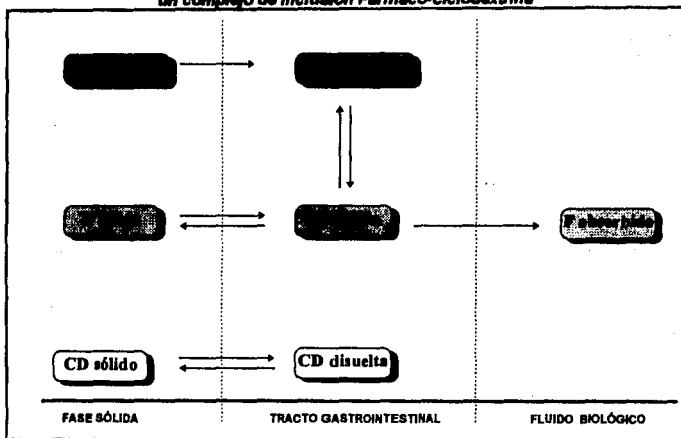
La β -CD es consumida por animales y humanos oralmente, cuando se administran en formas farmacéuticas o como aditivos en los alimentos. En ambos casos, pueden estar presentes como Ciclodextrina libre o como su complejo de inclusión, el cual contiene un fármaco, saborizante o cualquier otro sustrato.

Su dosis es muy baja, y a la concentración del jugo gástrico se favorece una rápida disociación del complejo; por lo tanto la absorción del sustrato y de la β -CD son procesos separados. La absorción del sustrato (hidrofóbico) se ve fuertemente acelerada de tal forma que solo una parte insignificante de la Ciclodextrina se absorbe intacta.

El tamaño de la Ciclodextrina es relativamente grande, y su superficie es hidrofílica, por lo que es considerada como un acarreador, llevando a la molécula hidrofóbica hacia la solución, conservándolo en un estado disuelto y transportándolo hacia la membrana celular de características hidrofóbicas. Después de liberar el sustrato hacia las células (debido a que éstas tienen mayor afinidad por el sustrato que la β -CD) ésta permanece en la fase acuosa. La ruta que seguirá la β -CD después de su administración oral en forma libre o complejada puede resumirse en lo siguiente, representado en la figura 3:

- Disolución rápida y establecimiento de un equilibrio dinámico asociación-disociación.
- Absorción rápida del sustrato hacia la circulación.
- Solo una parte insignificante de la β -CD libre se absorbe de manera intacta en el tracto gastrointestinal.
- La mayor parte de la β -CD es metabolizada en el colon por la flora normal.
- Los metabolitos primarios (maltodextrinas acíclicas, maltosa y glucosa) son entonces metabolizados y absorbidos de igual forma que el almidón, y finalmente excretados como CO_2 y agua. (19)

Fig. 3. Representación esquemática del equilibrio disolución-diseociación-absorción de un complejo de inclusión Fármaco-Ciclodextrina



2.3. TOXICIDAD

Administrando dosis de 200, 400, y 600 mg de β -CD por kilogramo de peso en ratas y perros por vía oral, no se observó ningún efecto significativo de acuerdo a la prueba clínica realizada.⁽²⁰⁾ Estudios patológicos realizados en los mismos animales después de seis meses de tratamiento no detectaron ningún cambio observable.

Otros estudios en ratas revelaron que existe necrosis renal después de la administración diaria de 450 mg de β -CD por kilogramo de peso por vía subcutánea, intraperitoneal o intravenosa. Estos efectos no fueron similares a 100 mg/kg. de 1 a 7 veces al día, sin embargo la dosis de 900 mg./kg. de peso trajo consigo la muerte de los animales. Cuando se interpretan estos datos, es necesario tener en mente que la dosis aplicada a los animales corresponde de 15 a 70 g para una administración subcutánea en humanos.

De esto se concluye que la β -Ciclodextrina posee un cierto grado de toxicidad solo si es administrada parenteralmente y a dosis extremadamente altas. Si un fármaco es eficaz a bajas concentraciones, cuando éste sea complejoado con Ciclodextrinas puede ser disuelto y administrado parenteralmente sin esperar encontrar ningún efecto tóxico. También es importante destacar que las pruebas revelan que cuando la β -Ciclodextrina es administrada oralmente la toxicidad es nula.⁽²⁰⁾

CAPITULO 2

FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON β -CD

1.0. DEFINICIONES

Para poder comprender claramente la relación que se establece entre las moléculas que participan en la formación de un complejo de inclusión es necesario aclarar el lenguaje a emplear.

El proceso de inclusión es el resultado de la capacidad de un compuesto con ciertas características estructurales y estéricas, así como de polaridad, para "englobar" especialmente a un segundo componente. El compuesto que es incluido (substrato) está situado en la cavidad de la molécula ocluyente (ligando) sin afectar significativamente la estructura de éste. A la especie formada se le llama complejo de inclusión o complejo molecular. Los términos formación de complejo, complejación, asociación molecular o enlace se consideran sinónimos. Este complejo surge a partir de las dos especies unidas mediante un enlace no covalente y presenta una estequiometría sustrato-ligando definida. De acuerdo a este tipo de interacción, una característica importante de un complejo de inclusión es la posibilidad de establecer un equilibrio de disociación-asociación cuando se encuentre en solución.

Se le llama sustrato a la especie que interactúa y cuyas propiedades físicas o químicas serán observadas experimentalmente. El ligando es la molécula que interactúa con la primera y cuya concentración será la variable independiente en el proceso experimental de formación del complejo.⁽²¹⁾ Este tipo de nomenclatura será únicamente

operacional y no tiene implicación acerca de la naturaleza de la interacción o de las propiedades del complejo.

Una característica importante del ligando es la capacidad para formar una estructura con espacios libres cuyas dimensiones permitirán la inclusión de otra molécula.

La formación de los complejos no depende de la afinidad química o de la presencia de ciertos grupos, pero sí de un arreglo espacial adecuado. La β -Ciclodextrina presenta ésta característica, y por lo tanto puede interactuar con una gran variedad de moléculas.

De acuerdo con las características que presentan los complejos se han clasificado de diferentes formas. Dependiendo de la estructura del ligando y el espacio libre de éste, puede tener la forma de una rejilla, de un canal o una capa. Otro criterio de clasificación puede ser el número de moléculas que participan en la formación del complejo, dividiéndose en polimoleculares y monomoleculares. De los primeros los más conocidos son los formados con urea, los complejos monomoleculares más conocidos son los formados con Ciclodextrinas, que presentan una estructura cristalina estable.

2.0. REQUERIMIENTOS PARA LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS

Existe una serie de factores técnicos que van a limitar la formación de complejos. Muchos fármacos no pueden ser complejados, o el proceso no trae consigo efectos benéficos. En otros casos la cantidad del fármaco en el complejo es muy baja, lo que es desventajoso cuando se desea formular en tabletas. También es una limitante el hecho de que los compuestos inorgánicos no pueden complejarse, a excepción de algunos ácidos en su forma no disociada.

Sin embargo los requisitos principales que deben cumplirse son los relacionados a las propiedades del fármaco, las cuales van a determinar la estabilidad y demás propiedades del complejo formado. Estos requisitos son: a) la solubilidad del fármaco debe ser menor a 10 mg/ml, b) el punto de fusión debe ser menor a 250 °C, c) la estructura debe estar formada por no más de cinco anillos condensados y d) el peso molecular debe encontrarse entre 100 y 400, con moléculas más pequeñas el contenido de fármaco es muy bajo, y las moléculas de mayor peso no caben en la β -Ciclodextrina.

A continuación se ahondarán con detalle algunas condiciones adicionales a las mencionadas.

2.1. GEOMETRÍA MOLECULAR

La β -CD es capaz de formar compuestos o complejos de inclusión, únicamente con moléculas que presenten un tamaño adecuado y compatible con las dimensiones de su cavidad.

Las características geométricas de una molécula, aun más que las características químicas son el factor decisivo para determinar que tipo de moléculas pueden penetrar en la cavidad de la β -CD.

Las moléculas incluidas en la β -CD están orientadas de tal forma que se procure el máximo contacto entre la parte hidrofóbica de dicha molécula y la cavidad apolar de la β -CD. La parte hidrofílica del sustrato permanece tanto como sea posible fuera de la fase del complejo; esto asegura un máximo contacto entre el solvente y los grupos OH de la cavidad. Es posible la formación de complejos con moléculas significativamente más grandes que la cavidad de la Ciclodextrina, solo que únicamente ciertos grupos penetran en de la cavidad.

A pesar de que la geometría de las moléculas es un factor determinante en la formación de complejos, se ha encontrado que con moléculas de similar tamaño no se forman complejos de estabilidad similar, esto se debe a que las características iónicas de una molécula también son determinantes.

En la actualidad con la ayuda de la computación, considerando únicamente las características estructurales, es posible predecir el arreglo espacial final de un complejo, lo que permite saber de antemano si existe la posibilidad de su formación. Esto evita realizar investigaciones que consumen más tiempo, y no siempre resulta posible formar un complejo. En investigaciones recientes se han empleado sistemas computacionales de modelización^(23, 24, 25) principalmente en los estudios con naproxén; estos han permitido determinar la estructura final del complejo, los resultados han sido tan satisfactorios y verídicos como los reportados con H-NMR.

2.2. POLARIDAD

El grado de complejación además depende de la polaridad de la molécula a incluir, generalmente con moléculas que son fuertemente hidrofílicas y con un alto grado de hidratación o grupos ionizables, no es posible o solo de forma parcial la complejación. De esto se deduce que solo las moléculas que presenten una menor polaridad que el agua pueden ser satisfactoriamente complejadas con Ciclodextrinas.

Si existen fuerzas de cohesión muy intensas dentro de la molécula a incluir de forma que se impide su separación, lo cual es un prerequisite para la inclusión, la complejación se verá de cierta forma impedida. Una medida de la cohesión entre las moléculas de una sustancia

cristalina es el punto de fusión; cuando éste es más alto que 250 °C generalmente no es posible preparar complejos de inclusión estables.

Es importante destacar el efecto de la presencia de ciertos grupos funcionales en el complejo. Se ha observado que la estabilidad de un complejo es proporcional al carácter hidrofóbico de sus sustituyentes. La presencia de grupos metilo o etilo incrementan la estabilidad del complejo debido a su baja polaridad. Se sugiere que las especies iónicas deben estar en su forma no ionizada, ya que usualmente (aunque no siempre) se favorece la formación de los complejos.

2.3. MEDIO DE PREPARACIÓN

En algunos casos, no es necesaria la presencia de solventes para formar un complejo de inclusión, basta con mezclar los polvos de la sustancia a incluir con la β -CD también en estado sólido, lo anterior sucede con ácido salicílico y β -CD almacenados en recipientes cerrados por un tiempo prolongado. Sin embargo, no es posible que esto suceda con todas las moléculas que desean ser complejadas, ya que deben presentar sublimación, de lo contrario dicho proceso se vuelve impracticable o demasiado largo.

La complejación se prefiere realizar en presencia de algún medio líquido, en el cual resulta un proceso relativamente rápido, sin embargo se ha observado que sustancias muy solubles en agua son solo débilmente complejadas; siendo las parcialmente solubles preferidas para la complejación. ⁽¹⁹⁾

Para alcanzar un equilibrio en solución se necesitan periodos de tiempo muy largos o la sustancia a incluirse debe ser previamente disuelta en algún solvente orgánico; es aquí donde el empleo de cualquier solvente se ve restringida. Se recomienda emplear solventes de bajo peso molecular, tales como metanol, etilenglicol, glicerina, etc., la gran mayoría de

los solventes orgánicos no puede ser empleada pues existe la posibilidad de que se formen complejos estables con la Ciclodextrina, como con piridina o tolueno.

En algunos casos los residuos de solvente no pueden ser removidos pues forman parte integral del producto apareciendo como un complejo solvente: β -CD. Un ejemplo de esto es el etanol, ya que muchos complejos de fármacos con Ciclodextrinas se preparan en éste medio, del 0.01 % al 2 % del solvente puede ser formado en forma de complejo.

Generalmente no es deseable el empleo de solventes orgánicos, pero en muchos casos es inevitable. Las moléculas muy poco solubles en agua, no pueden ser complejadas a ninguna concentración o tiempo sin el empleo de un solvente orgánico. La presencia de solventes deshidratantes (etanol, acetona) favorecen el aislamiento del producto cristalino. La filtración y el secado del complejo aislado es más rápido y el producto obtenido es un polvo fino. Sin el empleo de éstos solventes, la filtración es en muchos casos lenta y después del secado se forman hojuelas duras que es necesario pulverizar mecánicamente.

Otro factor importante a considerar es el pH del medio, ya que de este dependerá el grado de ionización de una molécula, reflejado en la estabilidad del complejo. En un estudio realizado con diferentes antiinflamatorios no esteroideos⁽²⁶⁾ empleando medios de preparación con diferente pH, se observó que la constante de máxima estabilidad de estos complejos se encuentra cercana al valor de pKa de cada uno de los principios activos empleados. Igualmente el pH va a determinar el grado de cristalización y por lo tanto la posibilidad de separar el complejo de su medio de preparación.

2.4. FUERZAS DE INTERACCIÓN

Una vez que se han alcanzado los requerimientos mencionados es necesario que exista entre ambas moléculas (β -CD : sustrato) la presencia de fuerzas que estabilicen o hagan posible que la interacción entre ambas persista.

En la mayoría de los estudios realizados al respecto se ha considerado la formación del complejo en medio líquido, lo que no implica que las fuerzas de interacción no puedan establecerse en otro medio.

El proceso de inclusión consiste esencialmente de una sustitución de las moléculas de agua por un sustrato de menor polaridad.⁽²¹⁾ Este proceso se ve energéticamente favorecido dadas las características hidrofóbicas de la cavidad de la β -Ciclodextrina. (Fig. 4). Numerosas investigaciones han tratado de explicar cuales son las fuerzas involucradas, y han llegado a la conclusión de que es el resultado de varios efectos, que contribuyen en mayor proporción uno u otro, dependiendo de las características del sustrato. Estos efectos son:

- a) Sustitución de las moléculas de agua por la molécula de sustrato favorecida energéticamente por una interacción apolar-apolar.
- b) Interacciones electrostáticas de Van der Waals entre el ligando y el sustrato, y en algunos casos el establecimiento de puentes de hidrógeno.
- c) Contribución de la energía liberada en la relajación del anillo de la β -Ciclodextrina.

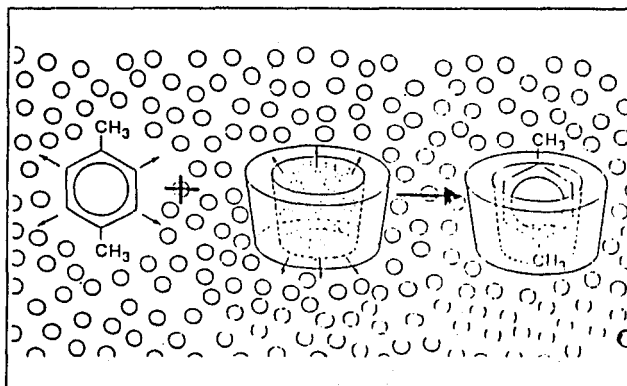
Todos estos factores pueden estar involucrados, pero la contribución de cada uno de ellos puede variar de acuerdo al medio de preparación.

El tipo de interacciones que se establecen son muy débiles; la energía de un puente de hidrógeno es de 10^1 Kcal/mol, y las interacciones de Van der Waals representan solo 1 Kcal/mol. Pero, si es posible que se establezca un arreglo espacial específico, las

moléculas involucradas pueden establecer múltiple puntos de interacción de este tipo y la especie formada puede alcanzar una adecuada estabilidad comparable a las especies formadas por enlaces covalentes.

También se ha sugerido que la cavidad de la β -Ciclodextrina actúa como una base de Lewis^(19, 27) que contiene una alta densidad electrónica, por lo que la estabilidad del complejo aumenta proporcionalmente a la basicidad del sustrato.

FIG.4. REPRESENTACIÓN DEL PROCESO DE COMPLEJACIÓN EN SOLUCIÓN.



○ (molécula de agua)

3.0. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

No se han definido métodos generales para la preparación de todos los complejos de inclusión, ya que la elección de éste dependerá de las características de la molécula a incluir de los requerimientos y alcances de una preparación en el laboratorio y a escala industrial. A continuación se explicarán de manera general los métodos más usuales y los puntos a considerar en uno u otro.

3.1. PREPARACIÓN EN SOLUCIÓN

El método más sencillo para preparar complejos de inclusión y que se aplica a moléculas solubles en agua, consiste en adicionar la sustancia a incluir a una solución de β -CD la cual debe estar a temperatura media (30° a 40 °C), agitando constantemente. Dado que la estabilidad del complejo depende en gran medida de la temperatura, no es conveniente emplear temperaturas arriba de 80 °C , además no debe perderse de vista que existe un aumento considerable en la solubilidad de la β -Ciclodextrina conforme aumenta la temperatura. Dicha solución puede presentar un pH neutro, ácido o alcalino, dependiendo de las características de la molécula a incluir, de manera que pueda encontrarse en su forma no ionizada. La mezcla así preparada se deja agitar intensamente por un periodo de 2 a 4 horas para alcanzar un estado de equilibrio. Posteriormente se enfría lentamente para separar el producto por cristalización y filtración.

La cantidad de sustrato complejado no puede ser incrementado repitiendo el proceso antes de separar el producto de las aguas madres; es decir recalentando y reenfriando.

Este método no es aplicable cuando el complejo formado es muy soluble, pues resulta imposible distinguir y/o separar el verdadero complejo de inclusión de una mezcla física. Sin embargo se tiene la ventaja de que se obtiene un rendimiento del 100%.

3.1.1 Coprecipitación

Un procedimiento alternativo cuando se desea incluir un principio activo muy soluble en agua es el método de coprecipitación.^(21, 27, 28, 31) Este consiste en adicionar una solución del fármaco preparada en un solvente orgánico adecuado (que disuelva completamente al fármaco) a una solución acuosa de β -Ciclodextrina, guardando la relación molecular. Esta solución se agita hasta la precipitación espontánea del producto (5 a 24 hrs) o se evapora al vacío. Con este método no deben emplearse altas concentraciones de fármaco y β -Ciclodextrina dado que es posible la precipitación de los cristales puros.

3.1.2 Spray drying o Freeze drying

Otro método de preparación en solución o alternativo^(24, 27, 30, 31) consiste en mezclar una solución del principio activo en agua o en una mezcla agua-solvente (preferentemente miscible en agua) a una solución acuosa de β -Ciclodextrina. La mezcla se agita hasta formar una solución completa (trasparente). Algunos investigadores (24) han sugerido periodos de agitación prolongados de hasta 24 horas, sin embargo también han reportado que basta formar una solución y proceder con el siguiente paso,⁽³⁰⁾ y se obtiene complejos de iguales características empleando un mismo fármaco.

A la mezcla obtenida se le somete a un proceso de secado por atomización (spray-drying) o a liofilización (freeze-drying) para obtener el producto final. Kurozumi, et al.^(30, 31)

sugieren el lavado del producto inmediatamente después de obtenerlo, con un solvente adecuado y frío para eliminar la cantidad de fármaco que pueda quedar sin complejarse.

Para todos los métodos de preparación de complejos en los cuales se emplee un solvente orgánico, es conveniente contar con una técnica de análisis que permita detectar la presencia de solvente residual en el producto final.

3.2. PREPARACIÓN EN SUSPENSIÓN

La solubilidad de la β -Ciclodextrina puede llegar a ser una limitante, sin embargo no siempre es necesario disolverla completamente para poder preparar un complejo, ya que es posible adicionar la sustancia a incluir a un suspensión acuosa a temperatura ambiente, agitando por un periodo mayor de 2 a 24 horas. El seguimiento de la formación del complejo puede hacerse por microscopía, basándose en el hecho de que los cristales típicos de la β -CD y de la molécula a incluir deben desaparecer paulatinamente para dar lugar a un polvo amorfo fino. También es posible determinar si el producto obtenido es solo un mezcla mecánica o en realidad un complejo de inclusión, realizando estudios de difracción de rayos X. Para propósitos industriales éste es uno de los procesos más recomendados y sencillos.

3.3. PREPARACIÓN POR AMASADO

Cuando el fármaco a complejar es poco soluble en agua, se recomienda preparar el complejo mediante amasado. En este caso se emplea una mínima cantidad de agua sin el empleo de ningún solvente o empleando una pequeña cantidad de etanol para suspender la sustancia a complejar.^(24, 33) Al emplear este proceso de preparación se evita la presencia de moléculas de agua dentro de la cavidad de la Ciclodextrina y se procura una mejor complejación. La pasta que se forma por éste proceso, es amasada mecánicamente por un periodo de 2 a 4 horas, después debe dejarse secar para ser pulverizada nuevamente y obtener un polvo. Algunas veces se recomienda lavar el producto con algún solvente orgánico para remover el fármaco libre que haya quedado adsorbido al complejo. Este método es de fácil aplicación a nivel industrial y hace posible obtener un complejo puro. Se tiene la ventaja de recuperar alrededor del 98% de sustancia complejada y no se ha detectado la presencia de solvente en los complejos obtenidos.

3.4 PREPARACIÓN EN FASE SÓLIDA

Cuando el fármaco a complejar es altamente susceptible a la hidrólisis, los métodos que se han mencionado no son aplicables. Se ha demostrado que es posible la interacción de la β -Ciclodextrina con algunos fármacos realizando únicamente un proceso de molienda en seco o simple mezclado físico.^(31, 33)

Estos procedimientos son muy similares: se mezclan las cantidades estequiométricas establecidas y se realiza (dependiendo del proceso que se desea seguir) un proceso de mezclado por volteo, vibración, etc., o una molienda de la mezcla en un equipo adecuado. Estos procedimientos se limitan a sustancias altamente reactivas.

3.6. PREPARACIÓN POR FUSIÓN

Este método aún no es muy usual, ya que se limita a sustancias con punto de fusión bajo y bien definido. La sustancia a complejar es fundida y mantenida en ese estado hasta completar la adición de la cantidad de Ciclodextrina necesaria finamente pulverizada. Existe la desventaja de que hay un gran exceso de sustrato, el cual debe ser removido después del enfriamiento empleando un solvente adecuado.

3.5.1. Preparación por fusión en recipientes cerrados.

Al igual que el método anterior éste no es muy conocido, ya que su aplicación se limita a aquellas sustancias que pueden sublimar o que presentan puntos de fusión relativamente bajos.

El método consiste en realizar una mezcla física de la sustancia a complejar de acuerdo a las condiciones previamente encontradas. Esta mezcla se coloca en recipientes de vidrio o de acero inoxidable que puedan ser sellados herméticamente, los cuales se llevan a una temperatura por arriba del punto de fusión del principio activo dentro de una estufa, manteniendo a esta temperatura por un lapso de 1 a 4 horas. Al producto así obtenido se le realizan lavados con un solvente adecuado o se le realiza un proceso de sublimación para retirar el exceso de principio activo no complejoado.⁽³³⁾

4.0. ESTABILIDAD DEL COMPLEJO

Cuando se encuentran relacionadas más de una especie molecular en un sistema, se establece un equilibrio entre estas, que está definido por una constante, cuyo valor refleja la asociación-disolución de las especies involucradas, e indica cual o cuales especies prevalecen en el estado de equilibrio.

En el caso de los complejos formados con β -Ciclodextrina, cualquier efecto que se origine en un principio activo a consecuencia de su inclusión (aumento de la solubilidad y biodisponibilidad, modificación de la estabilidad, etc.) depende directamente de la constante de estabilidad (K). A su vez esta se encuentra en función de las especies en solución y la relación estequiométrica que establezcan entre sí.

En soluciones diluidas generalmente prevalece una estequiometría 1:1, sin embargo a altas concentraciones o con ciertos fármacos es posible que se establezcan otros equilibrios tales como:



El definir cual tipo de estequiometría prevalece está en función del comportamiento del sistema y al tipo de análisis que se realice para determinarla.

Al reportar el valor de la constante y para que este no sea ambiguo, debe indicarse la temperatura y el pH, ya que se ve afectada por ambos factores. Un aumento en la

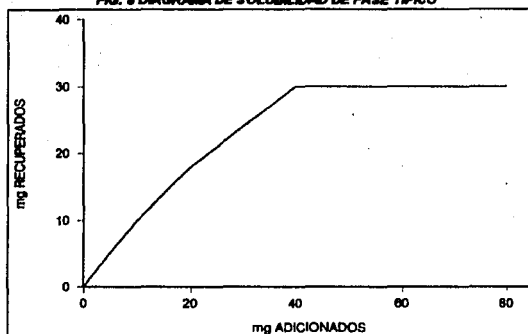
temperatura, tiene como consecuencia un decremento en el valor de la constante (K), así mismo el pH determinará la presencia de las especies en su forma ionizada o no ionizada, dependiendo de la naturaleza de la molécula, favoreciendo o no la formación y estabilidad del complejo.

4.1. DIAGRAMAS DE SOLUBILIDAD

El método de solubilidad es una de las técnicas existentes para determinar la constante de estabilidad de un complejo. Se tiene el principio de que en el equilibrio la solubilidad de un fármaco puro, en un solvente dado a temperatura constante, es una cantidad característica de dicha sustancia, y por lo tanto es utilizable como criterio de identificación y pureza.

Para determinar experimentalmente esta solubilidad, se colocan sucesivas y crecientes cantidades de fármaco en diferentes ampollas de vidrio a las que se les adiciona un volumen constante de solvente en el cual es solo ligeramente soluble. Se llevan los sistemas al equilibrio por agitación prolongada y a temperatura constante. Se analizan las soluciones sobrenadantes y se calcula el contenido total de soluto.⁽²⁸⁾ Se traza un diagrama de solubilidad de fase, (Fig 5) representando la cantidad de fármaco encontrado en solución por unidad de volumen (en el eje Y) en función de la cantidad de fármaco añadido (en el eje de las X). La gráfica obtenida implica que a lo largo del segmento ascendente todo el fármaco se encuentra disuelto, siendo la pendiente igual a 1. La solución llega a la saturación por lo que una adición posterior no incrementa la concentración de la solución y la pendiente se vuelve casi cero.

FIG. 6 DIAGRAMA DE SOLUBILIDAD DE FASE TÍPICO



La extrapolación al eje Y determina la solubilidad máxima del fármaco. Es importante determinar con exactitud este valor, pues se emplea en la determinación del valor de la constante.

La mayoría de los trabajos realizados para determinar la constante de estabilidad de un complejo se han realizado empleando este método^(37, 38, 39) basándose en el hecho de que, si el fármaco en cuestión presenta una mayor solubilidad en presencia de β -Ciclodextrina, esta cantidad adicional será efecto de un segundo componente o debido a la formación de un complejo.

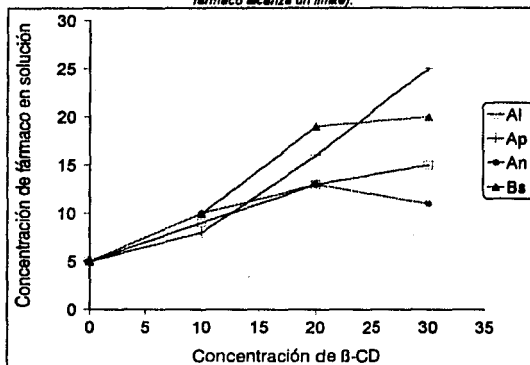
El procedimiento experimental para calcular el valor de la constante, consiste en determinar la solubilidad molar total del fármaco (St) pero ahora en función de la concentración molar total de β -Ciclodextrina (Lt), a una temperatura y fuerza iónica constante. Esto se realiza preparando varias ampollitas que contengan una cantidad igual de fármaco en considerable exceso a su solubilidad, se les adicionan un volumen fijo de

solvente, el cual contiene diferentes concentraciones de β -Ciclodextrina, que se irán incrementando. El sistema se lleva al equilibrio por agitación en un baño de agua a temperatura constante, esto comúnmente toma de 1 a 2 días aunque en algunos casos llega a necesitarse 1 o 2 semanas. Después se analiza la fase en solución (habiendo separado la fase sólida por filtración o centrifugación) para determinar la concentración total de fármaco (S_t) sin importar el estado molecular en que el fármaco se encuentre.

Se grafican las concentraciones obtenidas en cada ampollita en función de su correspondiente concentración de β -Ciclodextrina, de esta forma se obtienen diferentes tipos de diagramas, que determinan una comportamiento diferente. (Fig. 6)

El diagrama más simple muestra un incremento lineal de S_t en función de L_t . La premisa básica es que un incremento en la solubilidad es una consecuencia de la formación de uno o más complejos solubles. La presencia de sólido puro (fármaco adicionado en exceso) en todo el rango de estudio, asegura que el potencial químico, la actividad del fármaco libre (S) en solución y la concentración es una constante. Si esto se cumple, se observa un comportamiento lineal de primer orden en función de L_t . Este tipo de diagrama se toma como una evidencia de una estequiometría 1:1.

FIG. 8. DIAGRAMAS DE SOLUBILIDAD DE FASE EN PRESENCIA DE β -CD
Al (solubilidad no limitada), Ap (la solubilidad del fármaco aumenta más rápidamente que la concentración de β -CD), An (la solubilidad del fármaco disminuye cuando aumenta la concentración de β -CD), Bs (la solubilidad del fármaco alcanza un límite).



Con algunos fármacos se observan desviaciones a este comportamiento cuando la solubilidad del fármaco se incrementa más rápidamente que la concentración de β -Ciclodextrina o viceversa, a estos diagramas se les denomina de tipo Ap (positivo) y An (negativo) respectivamente. Cuando se observa este comportamiento, la estequiometría sustrato-ligando no es constante.

Otro tipo de diagrama es el que refleja un incremento lineal en la solubilidad del fármaco a medida que aumenta la concentración de β -Ciclodextrina, por la formación de un complejo soluble que alcanza un límite, dando lugar a la formación de una platea. Una posterior adición de β -Ciclodextrina no incrementa la solubilidad o el complejo formado comienza a precipitar, observándose un decremento en la concentración de la solución casi

hasta el punto equiparable a la concentración del fármaco libre. Este tipo de diagrama se denomina de tipo Bs o de solubilidad limitada.

En cualquiera de los diagramas se emplea únicamente la porción lineal de estos para calcular el valor de la constante.

4.2. CALCULO DE LA CONSTANTE DE ESTABILIDAD

Cuando tomando en consideración el tipo de diagrama obtenido en el estudio por solubilidad de fase, se asume la formación de un complejo con estequiometría 1:1, las expresiones de balance de masa, considerando las especies presentes durante la experimentación son:

a) para el fármaco

$$St = [S] + [SL] \quad (1)$$

b) para la β -Ciclodextrina

$$Lt = [L] + [SL] \quad (2)$$

Se ha indicado que el cálculo de la pendiente se realiza considerando la parte lineal de los diagramas de solubilidad, empleando los valores de la pendiente y el intercepto. El cálculo de la pendiente se obtiene como sigue: la concentración del fármaco en una solución saturada (S) que ha sido previamente determinado sin la presencia de β -Ciclodextrina, es sustraída de la concentración total de fármaco (St) y se divide entre la concentración total de β -Ciclodextrina (Lt). Al interpretar un diagrama de solubilidad debe recordarse que la solubilidad inherente a la complejación será siempre constante, por lo que el aumento en la solubilidad del fármaco será debida a la formación de un complejo.

Las concentraciones totales quedan entonces definidas por:

$$St = S + SL \quad (3)$$

$$Lt = L + SL \quad (4)$$

Donde

St = Concentración total de fármaco.

S = Concentración de fármaco libre.

Lt = Concentración total de β -Ciclodextrina.

SL = Concentración de fármaco complejoado.

De acuerdo a la definición de constante de equilibrio para una estequiometría 1:1

$$K_{eq} = \frac{[SL]}{[S][L]} \quad (5)$$

despejando para obtener [SL]:

$$[SL] = K_{eq} [S][L] \quad (6)$$

Substituyendo (6) en (3) y (4)

$$St = [S] + K_{eq} [S][L] \quad (7)$$

$$Lt = [L] + K_{eq} [S][L] \quad (8)$$

Por definición:

$$m = \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1}$$

De la parte recta del diagrama de solubilidad, considerando Y_2 como la concentración máxima (St) y Y_1 como la concentración del fármaco en una solución saturada sin presencia de β -Ciclodextrina que es igual a la obtenida al valor obtenido por el intercepto (S), a X_2 como la concentración total de β -Ciclodextrina y X_1 como cero (concentración correspondiente al intercepto con el eje Y), la pendiente quedará definida como:

$$m = \frac{St - S}{Lt} \quad (9)$$

Substituyendo las ecuaciones (6) y (8) en la anterior

$$m = K_{eq} [S] [L] / [L] + K_{eq} [S] [L]$$

$$m = K_{eq} [S] [L] / [L] \{1 + K_{eq} [S]\}$$

$$m = K_{eq} [S] / 1 + K_{eq} [S]$$

Expresado en función de la constante de equilibrio:

$$m (1 + K_{eq} [S]) = K_{eq} [S]$$

$$m + K_{eq} [S] (m) = K_{eq} [S]$$

$$m + K_{eq} [S] (m) - K_{eq} [S] = 0$$

$$m + K_{eq} \{ [S] (m) - [S] \} = 0$$

$$m = - K_{eq} \{ [S] (m) - [S] \}$$

$$K_{eq} = m / - [S] (m) - [S]$$

$$K_{eq} = m / [S] (1 - m)$$

Sobre esta ecuación se substituyen los valores correspondientes y se calcula el valor de la constante.

Existen otros métodos que pueden emplearse para determinar la constante de estabilidad basándose en el aumento o disminución en la intensidad de la propiedad medida como puede ser variaciones en el espectro de UV,⁽²⁷⁾ el espectro de emisión o excitación fluorescente,⁽⁴²⁾ modificación en la conductividad eléctrica ⁽³⁸⁾ o en las propiedades térmicas,⁽⁴³⁾ cada una de estas plantea supuestos diferentes, por lo que con frecuencia se obtienen valores de la constante de estabilidad con un rango muy amplio de discrepancia que solo en pocas ocasiones pueden ser comparadas.

5.0. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN.

No resulta convincente el afirmar a priori la formación de un complejo de inclusión basándose en la realización de determinado proceso u obteniendo un polvo fino. Frecuentemente es posible encontrarse ante compuestos que no pueden ser complejados o que lo son en solución pero no en estado sólido. También es posible que el producto obtenido del proceso de preparación en solución sea solamente una mezcla finamente dispersada de sustrato y β -CD, en otros casos es una mezcla de sustrato no complejado y β -CD hidratada sin complejar; por lo tanto es necesario determinar la cantidad de sustrato complejado en el producto obtenido basándose en los cambios que se presenten en las propiedades de la sustancia complejada. Dentro de dichos cambios los más fácilmente observables son los que ocurren en los espectros de UV y fluorescencia, así como cambios en las propiedades cromatográficas, de reactividad, etc. Estos cambios se toman como indicativos de una complejación.

5.1. ANÁLISIS POR ULTRAVIOLETA

La determinación cuantitativa del contenido de sustrato puede realizarse empleando las técnicas analíticas comunes como UV, HPLC o GLC. En el caso de UV, puede inferirse una complejación mediante cambios en la longitud de onda de máxima absorbanza o en el coeficiente de extinción.

Para la determinación del contenido de sustrato es aconsejable que el complejo se disuelva en etanol al 50 % y diluirlo posteriormente en etanol puro, en el cual la β -CD es insoluble. Para complejos muy estables o poco solubles se recomienda disolver el producto en 5 ml de dimetilformamida y entonces diluir con etanol al 50 %.

Por esta técnica la cantidad de sustrato que es cuantificado puede estar total o parcialmente complejado o sin complejar, para aclararlo se debe recurrir al empleo de las técnicas termoanalíticas.

Generalmente los cambios que aparecen en los espectros de UV son pequeños pero significativos. Usualmente se observa un efecto batocrómico o un ensanchamiento de la banda de absorción, así como un cambio considerable en la intensidad de la absorción con aumento en la concentración de β -CD.

5.2 MÉTODOS TÉRMICOS

Las técnicas termoanalíticas (DSC, TG, DTA) son un recurso muy útil para evaluar la verdadera complejación, debido a que estas técnicas están basadas en determinar los cambios que ocurren en un compuesto sometido a un programa de temperatura, es de esperar que cuando un fármaco se encuentre complejado, el comportamiento normal ante las condiciones evaluadas va a verse modificado.

Empleando calorimetría diferencial de barrido (DSC) se ha observado que después de realizar los procedimientos de complejación, los termogramas característicos de diferentes compuestos se han visto drásticamente modificados, pues existe la completa desaparición de los picos asignados a la evaporación, fusión descomposición etc. permaneciendo únicamente las características de la β -Ciclodextrina. Este comportamiento se atribuye a una verdadera complejación^(23, 28, 30, 31, 32, 47)

5.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

Esta técnica se emplea generalmente para la caracterización de sustancia orgánicas sólidas, sin embargo generalmente no es del todo adecuado para asegurar la formación de un complejo sino solo complementaria de otras técnicas. Las bandas características de la β -Ciclodextrina solo cambian ligeramente cuando se encuentran formando un complejo, y la fracción de la molécula incluida es menor al 25%⁽³⁸⁾ Sin embargo cuando ya se ha evaluado la complejación por alguna otra técnica el cambio en la intensidad y la frecuencia de las bandas asignadas a los grupos funcionales principales en el área de la huella digital se toma como un hecho que confirma la formación de un complejo.^(28, 29, 30)

5.4. MÉTODOS DIVERSOS

5.4.1. Cromatografía en capa fina

Puede ser empleada adicionalmente para verificar la formación de complejos, pues es posible observar un cambio en los valores de R_f , los cuales son generalmente disminuidos, claro que esto dependerá de la mezcla de elusión y del fármaco analizado.

5.4.2. Difracción de Rayos X

Quando la molécula que se ha complejoado es sólida, es posible caracterizar sus propiedades cristalinas antes y después de haberla complejoado, comparando los difractogramas de las materias primas por separado. Generalmente la estructura cristalina de las materias primas empleadas cambia considerablemente, formándose polvos amorfos, por lo que los picos característicos desaparecen o su intensidad disminuye.

Al emplear ésta técnica es necesario que las muestras estén completamente secas, pues en el caso de moléculas pequeñas la estructura cristalina que se obtenga del complejo puede ser idéntica a la que se obtenga con una Ciclodextrina hidratada. Esta de uso común para éste fin, y se le considera como el mejor método para determinar la formación de un complejo, siendo posible establecer la orientación y geometría del producto, sin embargo es un trabajo complicado para ser empleado como una técnica rutinaria, pues es tardada y de alto costo, requiriendo de preparación especial para manejar correctamente el equipo y saber interpretar adecuadamente los resultados. (23,28,31,32)

5.4.3. Resonancia Magnética Nuclear

Es una técnica empleada ampliamente ya que permite no solo corroborar la formación de un complejo, sino además es posible determinar con mayor exactitud la relación estequiométrica que se establece así como un modelo representativo de la complejación.⁽⁴¹⁾ La técnica se basa en la modificación en las señales de la β -Ciclodextrina y de los fármacos protonados. Si la inclusión ocurre los protones localizados dentro o cerca de la cavidad de la β -Ciclodextrina serán fuertemente protegidos o enmascarados. Se ha empleado para examinar el tipo de interacción de substratos con características aromáticas (ácido benzoico sustituido, fenoles sustituidos, derivados de ácidos carboxílicos aromáticos como el ácido acetilsalicílico). Se demostró que es posible que moléculas más grandes que la cavidad de la β -Ciclodextrina puedan ser parcialmente incluidas si los grupos funcionales presentes exhiben un tamaño o arreglo adecuado.⁽²²⁾ Dentro de la cavidad de la β -Ciclodextrina, se observan claras modificaciones en los comportamientos de la molécula debidos a interacción de los protones de las moléculas involucradas.

CAPITULO 3

APLICACIONES GENERALES DE LA β -CICLODEXTRINA

1.0. APLICACIÓN FARMACÉUTICA

El aumento en el empleo de la β -Ciclodextrina en la industria farmacéutica se ha debido a su gran potencial de aplicación, ayudando a resolver problemas difíciles a un costo relativamente bajo.

Se ha observado que al menos 10 % de los fármacos que se administran oralmente pueden ser complejados, modificándose sus propiedades físicas y/o químicas.

En términos prácticos los complejos con β -Ciclodextrina ofrecen las siguientes ventajas:
(20.22.43)

a) Permite que los principios activos líquidos se conviertan en una forma cristalina, los cuales pueden ser adecuadamente formulados en tabletas.

b) Los sabores y olores desagradables pueden ser enmascarados o eliminados, así mismo la incompatibilidad fármaco - excipiente es reducida.

c) Se ha observado una mejora en la estabilidad física y química de compuestos altamente volátiles y que son estabilizados contra su pérdida por volatilización, principios activos que son fácilmente oxidables o hidrolizables o que sufren descomposición por efecto de la luz.
(20.22)

d) Una aplicación de gran importancia es la posibilidad de incrementar la solubilidad en agua así como la velocidad de disolución de fármacos poco solubles, con lo que aumenta la biodisponibilidad y se alcanzan niveles sanguíneos más altos, existiendo la posibilidad de

reducir la dosis. La absorción percutánea y rectal es mejorada al reducirse el carácter hidrofóbico del fármaco.

e) En formulaciones líquidas (inyectables y oftálmicos) es posible la preparación de una solución estable sin emplear solventes orgánicos, reduciendo así la irritabilidad local.

f) Se ha observado que es posible emplear la β -Ciclodextrina como desintegrante de características adecuadas o bien como excipiente para compresión directa. ^(56,57)

A los fármacos relativamente insolubles, se les puede mejorar la solubilidad así como la velocidad de disolución. Dependiendo de la constante de formación del complejo formado puede o no favorecerse la absorción. En el caso de fármacos lipofílicos, la forma complejada, en comparación de la no complejada presenta una mayor concentración del fármaco disuelto en el intestino, resultando una mayor biodisponibilidad, con un simultáneo incremento en la actividad terapéutica. Finalmente la irritación local inducida por el consumo de un fármaco puede ser reducida. ⁽⁴²⁾

1.1 AUMENTO EN LA SOLUBILIDAD Y LA BIODISPONIBILIDAD

Al formar un complejo de inclusión con un fármaco poco soluble, las moléculas de este son aisladas una de otra y dispersadas dentro de la matriz de oligosacáridos, la cual se desintegra fácilmente bajo condiciones fisiológicas. El complejo obtenido es más hidrofílico que el fármaco por sí mismo, esto facilita la humectación y la desintegración de la estructura cristalina, favoreciendo una disolución más rápida del principio activo. En consecuencia es posible que se alcancen altas concentraciones con principios activos poco solubles, ya que el medio de disolución no necesita desintegrar la estructura cristalina del fármaco sino solo la del complejo.

Un aumento en la solubilidad puede aumentar la biodisponibilidad de un principio activo administrado oralmente, solo si la velocidad de disolución es el paso determinante del nivel de absorción, en el caso de que la velocidad de absorción sea el paso limitante, la complejación con β -Ciclodextrina no favorecerá un aumento en la absorción. Si la velocidad de absorción permanece constante, al aumentar la solubilidad, los niveles plasmáticos se incrementarán proporcionalmente.

La concentración plasmática obtenida después de la administración del fármaco depende de la concentración en el fluido gastrointestinal, lo que a la vez está controlado por la velocidad de disolución, la solubilidad y la constante de equilibrio del complejo. Cuando el valor de la constante de equilibrio del complejo es pequeña, el grado de disociación es suficientemente alto como para asegurar una alta concentración de fármaco libre a nivel gastrointestinal, dando como resultado un rápido incremento en la concentración plasmática máxima. Al incrementar el valor de la constante, el grado de disociación decrece, por lo que la concentración de fármaco a nivel gastrointestinal es baja. Sin embargo se ha observado que en cualquier caso siempre existe un cambio en la respuesta biológica en comparación con el fármaco sin complejar ⁽³⁸⁾.

Lo anterior se ha observado principalmente con los antiinflamatorios no esteroidales, que son el grupo de medicamentos que más se han estudiado al respecto. Los fármacos como ibuprofén, ketoprofén y flurbiprofén, mostraron una mayor velocidad de disolución y una mayor biodisponibilidad cuando ésta se evaluó en conejos y perros. ⁽⁴³⁾

Algunos antibióticos como el Cloranfenicol al ser complejados con β -Ciclodextrina, presentaron una mayor velocidad de disolución, lo cual se atribuye a una mayor solubilidad del complejo, y la formación de una estructura amorfa que facilita la humectación. ^(44,45) Con estos cambios es posible sugerir un aumento en la biodisponibilidad.

En algunos estudios de biodisponibilidad realizados *in vitro* e *in vivo* empleando principios activos complejados y administrados en una base oleosa por vía tópica (ungüento) o rectal (supositorio), se observó una velocidad de liberación de los fármacos más rápida, y al cuantificarse en el fluido biológico o en un compartimento aceptor, la concentración encontrada fue mayor en comparación con el fármaco administrado en su forma libre. También se comprobó que cuando se adiciona la β -Ciclodextrina por separado, no existe cambio en el comportamiento del fármaco.

Los resultados sugieren que la complejación con β -Ciclodextrina es un medio efectivo para incrementar la biodisponibilidad, siendo con esto posible el empleo de una dosis menor, que traiga consigo menores efectos secundarios^(46, 47, 48)

1.2 EFECTO EN LA ESTABILIDAD FÍSICA Y QUÍMICA

Muchos fármacos que pueden tener gran potencial de aplicación, son descartados debido a su inestabilidad extrema, que disminuye su potencial terapéutico o dificulta su administración como forma farmacéutica estable. Algunos estudios se han dedicado a evaluar el efecto de la complejación con β -Ciclodextrina para resolver el problema de inestabilidad debida principalmente al efecto de la temperatura, volatilización, sublimación, oxidación e hidrólisis o por interacción con otros componentes de la formulación.

Se ha encontrado que después de la complejación se reduce considerablemente la velocidad de descomposición, incrementándose el valor de la constante de estabilidad y el tiempo de vida media, sin cambio en las características organolépticas de los fármacos.⁽⁵⁰⁾

51, 52, 53, 54)

1.3. REDUCCIÓN DE EFECTOS BIOLÓGICOS ADVERSOS

Debido a que la complejación con β -Ciclodextrina modifica las propiedades físicas y químicas del fármaco, es de esperar que los efectos biológicos también se modifiquen.

En los antiinflamatorios no esteroidales se ha reducido la irritabilidad gástrica, provocada por consumo prolongado y la baja solubilidad.⁽⁵⁰⁾

Se ha reducido la irritabilidad oftálmica debida al empleo de solventes orgánicos para disolver completamente el principio activo. También se ha inhibido el efecto hemolítico y el sabor amargo de algunos fármacos.^(51, 52)

1.4. MANUFACTURA DE TABLETAS

Una aplicación relativamente reciente que se le ha dado a la β -Ciclodextrina es su empleo como excipiente de tabletas principalmente fabricadas por compresión directa. Se ha aplicado principalmente para la fabricación de tabletas conteniendo diazepam, fenobarbitona, prednisolona, espironolactona y progesterona. Cada formulación con β -Ciclodextrina se comparó con formulaciones conteniendo lactosa spray-dried. Todas las tabletas mostraron adecuadas propiedades mecánicas de dureza y friabilidad. También se observó que la friabilidad de las tabletas decrece cuando la concentración de β -Ciclodextrina aumenta. La velocidad de disolución de las tabletas fabricadas con β -Ciclodextrina por compresión directa es considerablemente mayor que las tabletas con lactosa spray-dried. Adicionalmente la compactabilidad de la β -Ciclodextrina es mayor, necesitándose una fuerza menor para obtener una tableta con características adecuadas empleando bajas concentraciones de lubricante o desintegrante.

Los resultados de estos estudios muestran que la β -Ciclodextrina puede ser empleada como excipiente para compresión directa y obtener tabletas con propiedades

mecánicas adecuadas y una mayor velocidad de disolución, con la posibilidad de mejorar la biodisponibilidad.^(56, 57)

2.0. INDUSTRIA COSMÉTICA Y ALIMENTICIA

La aplicación de la β -Ciclodextrina en la industria cosmética y alimenticia está encaminada a la complejación de los saborizantes y esencias con el propósito de estandarizar su composición y mejorar la estabilidad al evitar la adsorción de agua. El empleo de β -Ciclodextrina ha mejorado la características de los alimentos en sabor, consistencia y estabilidad. Se ha facilitado el almacenamiento de esencias, al convertir el aceite en polvo, disminuyendo su pérdida por volubilidad. Es posible reducir la irritación ocular de un shampoo que sea debida a una fragancia, empleando su correspondiente complejo con β -Ciclodextrina. También es posible disminuir el mal olor bucal, adicionando β -Ciclodextrina a un dentífrico. Puede substituirse el empleo de almidón por β -Ciclodextrina en la fabricación de talcos, evitando el crecimiento de microorganismos y el empleo de conservadores, favorecido por el empleo de almidón, a la vez se incrementa la estabilidad del fármaco o el perfume empleado.¹

3.0. PESTICIDAS

Generalmente los insecticidas son altamente hidrofóbicos, y se ha observado que pueden aumentar su grado y velocidad de disolución cuando son complejados con β -Ciclodextrina. Consecuentemente se encuentran más disponibles a las especies vegetales siendo posible reducir las cantidades requeridas para alcanzar la actividad deseada lo que resulta benéfico en la protección del ambiente. Generalmente los insecticidas tienen un olor desagradable, pero el polvo del complejo que se obtiene es inodoro, sin perder su actividad.

Se ha comprobado que la estabilidad de los complejos con insecticidas aumenta considerablemente pues su descomposición por oxidación, calentamiento o fotólisis es retrasada. Esto hace posible su combinación con otros componentes de la formulación con los que pueden ser incompatibles. Adicionalmente es posible manejarlos sin riesgo de contaminación durante la fabricación, controlando la liberación del pesticida. ⁽²⁰⁾

4.0. BIOTECNOLOGÍA

En los procesos microbiológicos y enzimáticos de interés farmacéutico (conversión de esteroides, producción de prednisona, etc. se ha observado que la presencia de β -Ciclodextrina favorece la presencia de una mayor cantidad de sustrato disuelto, con lo que hay un incremento de hasta 300 % en el rendimiento del proceso, obteniéndose un producto más homogéneo y de mejor calidad.

En los procesos de obtención de piel ha sido posible mejorar el empleo de antibióticos para prevenir la contaminación por hongos que antes de ser adicionados con β -Ciclodextrina tenían poco efecto debido a su baja solubilidad o inestabilidad, la cual se mejora con la inclusión.

Es adecuado decir que en los procesos biotecnológicos la β -Ciclodextrina actúa como un controlador del proceso, liberando la sustancia complejada a medida que aquella que queda libre se va agotando, esto hace posible que el proceso sea más efectivo y rentable. ⁽²⁰⁾

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han realizado diversos estudios que han revelado que el ácido acetilsalicílico presenta un elevado nivel de irritabilidad gástrica aunado a su potencia antiinflamatoria a dosis de 500 mg. Se ha postulado que dicha irritabilidad se incrementa con dosis elevadas que se emplean para alcanzar su nivel máximo de actividad antiinflamatoria.

De la misma forma, se ha encontrado que el ácido acetilsalicílico no solo puede ser empleado por su actividad antiinflamatoria, y su papel en la prevención del daño cardiovascular ha dado lugar a múltiples investigaciones. Diversas pruebas con pacientes con previo infarto o parálisis cardíaca, a los cuales se les administraron dosis de 350 mg diariamente, demostraron una reducción en el riesgo de muerte cardiovascular. En contraste con éste beneficio, 20% de los pacientes sometidos a dichos tratamientos presentaron náusea, vómito y un daño gástrico considerable. De ésta forma surge la necesidad de buscar una solución a dicho problema, consecuencia de una baja solubilidad y estabilidad del ácido acetilsalicílico.

La β -Ciclodextrina puede ser empleada para encapsular molecularmente compuestos hidrofóbicos y/o inestables. Los fármacos complejados son más fácilmente solubles, con lo cual se mejora su velocidad de disolución y su biodisponibilidad. En la forma de complejos con β -Ciclodextrina, los fármacos poco solubles en agua son absorbidos más rápidamente y alcanzan concentraciones sanguíneas más altas, con lo cual es posible reducir la dosis administrada.

La formación de un complejo de inclusión con el ácido acetilsalicílico y la β -Ciclodextrina, considerando las características que ésta molécula proporciona a los fármacos, tiene como finalidad el buscar una solución al problema de baja solubilidad del ácido acetilsalicílico para que en el futuro sea posible incrementar el uso del mismo en el tratamiento de pacientes con afección al miocardio, mejorando así la terapéutica de este tipo de padecimientos que actualmente trae consigo diversos efectos secundarios.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Mejorar la solubilidad del ácido acetilsalicílico mediante la formación de un complejo de inclusión con β -Ciclodextrina, empleando el método de formación del mismo por amasado.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Tipificar las propiedades físicas de la β -Ciclodextrina y del ácido acetilsalicílico, mediante las técnicas de IR, DSC, UV.
- Determinar las condiciones óptimas de formación del complejo así como la constante de formación del mismo mediante la técnica de solubilidad de fase.
- Evaluar la formación del complejo mediante las mismas técnicas descritas anteriormente, comparando los resultados con los datos de los componentes individuales.
- Evaluar la solubilidad del fármaco complejoado con respecto a la solubilidad del fármaco solo.

HIPÓTESIS

Considerando las propiedades fisicoquímicas y moleculares del ácido acetilsalicílico, es posible la formación de un complejo de inclusión con β -Ciclodextrina, generándose un incremento en su solubilidad en agua, con lo que posiblemente será disminuida la irritabilidad gástrica del mismo.

MATERIAL

- Ampolletas de vidrio transparente de 10 ml
- Pipetas volumétricas de 1, 3, 5, y 10 ml
- Vasos de precipitados de 50 y 100 ml
- Matrices volumétricos de 10, 25, 50, 100, 500 ml
- Termómetro de Inmersión total de -10 °C a 200°C
- Bureta de 25 ml
- Soporte universal
- Pinzas para bureta
- Filtros de membrana Millipore de 0.45 μ
- Tubos de ensaye
- Gradilla
- Jeringa de 10 ml
- Mortero
- Desecador

EQUIPO

- Espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer Lamda 2
- Balanza con lámpara de infrarrojo Sartorius 7093 01
- Balanza Analítica Sartorius 1602 MP
- Espectrómetro de infrarrojo
- Calorímetro Diferencial de Barrido Perkin Elmer DSC 7
- Baño de agua y control de velocidad
- Sistema de control de temperatura ELECSA
- Microbalanza Sartorius 4503
- Molino para sólidos

REACTIVOS

	PROVEEDOR
Cloruro de Potasio	J.T. Baker
Ácido Clorhídrico 1 N	Merck
Bromuro de potasio	J.T. Baker
Ácido Acetilsalicílico	BAYER Diagnósticos
β -Ciclodextrina	HELM de México
Solución buffer de pH 4	SIGMA
Solución buffer de pH 7	SIGMA

METODOLOGÍA

DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

El Ácido Acetilsalicílico empleado fue amablemente donado por Bayer Diagnósticos, con un certificado de análisis que reportó el 99 % de pureza, sin embargo para control interno se determinó la pureza por DSC.

Se pesó una cantidad de AAS en un rango de 1.5 a 2.5 mg por triplicado en portamuestras para sustancias no volátiles, y se realizó el calentamiento en un intervalo de 115 °C a 135 °C a una tasa de calentamiento de 1 °C /min. bajo atmósfera de nitrógeno con flujo de 20 ml / min. Se obtuvo la pureza de la muestra empleando el software acoplado al equipo correspondiente.

DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DEL AAS A pH 2

Se pesaron cantidades de 10, 20, 30, 35, 40, 60, 80, y 100 mg de AAS por triplicado, colocándose en ampollas de vidrio. Se adicionaron 10 ml de solución buffer de cloruros de pH 2 0.2 N a cada una y se sellaron.

Las 24 ampollas se colocaron en el sistema de agitación a 50 rpm en baño de agua a 25 °C durante tres días. Se filtró el contenido de cada ampolla a través de filtros de 0.45 µ. Del filtrado se tomó 1 ml aforándose a 10 ml, de ésta solución se tomaron 3 ml para diluir a 25 ml empleando solución buffer de cloruros de pH 2 0.2 N en todas las diluciones. Cada una de las muestras se leyó al ultravioleta en un rango de 340 a 230 nm empleando la solución buffer como blanco, en celdas de 1 cm de longitud de paso. El procedimiento anterior se realizó por triplicado.

DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE FORMACIÓN DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN

PREPARACIÓN DE UNA SOLUCIÓN SATURADA DE β -CD

Se pesaron 1.85 g de β -CD y se adicionaron 50 ml de solución buffer de cloruros de pH 2 0.2 N, se colocaron en el sonicador durante 5 min. y aforando posteriormente a 100 ml con solución buffer, colocándolas en el sonicador por 10 min. más para obtener una solución homogénea.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS EN AMPOLLETAS

En seis diferentes ampollas se colocaron 100 mg de AAS materia prima, se adicionaron 0.5, 2, 4, 6, 8, y 10 ml de solución saturada de β -Ciclodextrina respectivamente, aforándose al final a un volumen de 10 ml con solución buffer de pH 2, 0.2 N (lo anterior se realizó por triplicado). Las 18 ampollas resultantes se colocaron en el sistema de agitación a 50 rpm en un baño de agua a 25 °C durante tres días. Al término se filtró el contenido de cada ampollita por medio de filtros de 0.45 μ , tomándose 1 ml de filtrado y diluyendo a 10 ml; de esta solución se tomó una alícuota de 3 ml aforando a 25 ml con solución buffer de pH 2, 0.2 N en cada dilución.

Se leyeron cada una de las muestras al ultravioleta en un rango de 340 a 230 nm, empleando solución buffer de pH 2, 0.2 N como blanco.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ACETILSALICILICO EN SOLUCIÓN

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se preparó una curva estándar de ácido acetilsalicílico con concentraciones de 30, 60, 90, 120 y 160 $\mu\text{g/ml}$ por triplicado empleando solución buffer de cloruros de pH 2, 0.2 N como solvente. Las soluciones se leyeron al ultravioleta en un intervalo de 340 a 230 nm en celdas de 1 cm.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se preparó por sextuplicado, una solución de 60 $\mu\text{g/ml}$ de ácido acetilsalicílico estándar en solución buffer de cloruros de pH 2, 0.2 N, leyendo las muestras en un rango de 340 a 230 nm en celdas de 1 cm de longitud de paso, empleando solución buffer de pH 2 como blanco de referencia.

REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

Se realizó el procedimiento anterior participando dos analistas en dos días diferentes.

PREPARACIÓN DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN ÁCIDO ACETILSALICÍLICO Y β -CICLODEXTRINA POR AMASADO.

Se colocaron en un mortero 150 g de β -CD y se adicionó la cantidad necesaria de solución buffer de pH 2 para formar una masa (25 ml.). Posteriormente se agregaron 25g de ácido acetilsalicílico suspendidos en 20 ml de solución buffer, mezclando constantemente. Se continuó amasando durante 3 horas más, adicionándose solución buffer cuantas veces fue necesario para conservar la consistencia pastosa.

Se dejó secar completamente la mezcla a 60 °C, y se pulverizó nuevamente por molienda en un mortero.

CARACTERIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS Y DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN ANÁLISIS POR ULTRAVIOLETA

Para el ácido acetilsalicílico como materia prima se preparó por triplicado una solución a concentración de 60 mcg/ml. en solución buffer de pH 2, 0.2 N. De la misma forma se prepararon las soluciones para un estándar USP. Todas las muestras se leyeron al ultravioleta en un intervalo de 340 a 230 nm, empleando solución buffer como blanco de referencia, en celdas de 1 cm de longitud de paso.

Para la β -Ciclodextrina se preparó por triplicado una solución a concentración de 1.85 g en 100 ml. Se leyeron cada una de las soluciones al ultravioleta en un rango de 340 a 230 nm, empleando la solución buffer como blanco, en celdas de 1 cm de longitud de paso.

Para la mezcla preparada por amasado se preparó por sextuplicado una solución de concentración equivalente a 60 mcg/ml de ácido acetilsalicílico. Se pesó la cantidad equivalente a 25 mg de principio activo (175 mg de mezcla), se disolvieron en 50 ml solución buffer de pH 2, las muestras se agitaron por 10 minutos y se filtraron a través de papel filtro Watman # 5, de esta solución se realizó la dilución adecuada para obtener la concentración indicada (60 mcg/ml).

CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

Se pesó de 1.5 a 2.5 mg de AAS en portamuestras de aluminio, y se evaluó la conducta térmica en un rango de 50 ° a 300 °C a una tasa de calentamiento de 10 °C/min. bajo atmósfera de nitrógeno a un flujo de 20 ml/min. Se realizó el enfriamiento bajo las mismas condiciones. Al llegar a la temperatura de 50 °C, se realizó un segundo calentamiento a las condiciones ya señaladas.

Para la β -CD se pesaron entre 1.5 y 2.0 mg en portamuestras de aluminio y se realizó el calentamiento en un intervalo de 50 °C a 250 °C a una tasa de calentamiento de 10 °C/min. bajo atmósfera de nitrógeno a un flujo de 20 ml/min.

En el caso de la mezcla de complejación por amasado se pesó la cantidad equivalente a 1.0 mg de ácido acetilsalicílico, se determinó la conducta térmica de 50 °C a 250 °C a una tasa de calentamiento de 10 °C/min. bajo atmósfera de nitrógeno a un flujo de 20 ml/min.

ANÁLISIS POR INFRARROJO

Se realizaron los espectros de infrarrojo del AAS y de la β -CD en pastillas de bromuro de potasio a una concentración del 1%

Igualmente la pasta seca obtenida del procedimiento de complejación fue analizada en pastillas de bromuro de potasio a una concentración del 1 %.

EVALUACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EN EL COMPLEJO

Se pesaron diferentes cantidades de la mezcla de complejación, equivalente a 10, 20, 30, 35, 45, 60, 80 y 100 mg de ácido acetilsalicílico, por triplicado, las cuales se colocaron en ampollas de vidrio. Se adicionaron 10 ml de solución buffer de cloruro de pH 2 0.2 N a cada una y se sellaron. Las ampollas se colocaron en el sistema de agitación a 50 rpm en un baño de agua a 25 °C durante 3 días. Se filtró el contenido de cada ampolla a través de filtros de 0.45 μ . Del filtrado se tomó 1 ml aforándose a 10 ml, solución de la que se tomaron 3 ml para diluir a 25 ml empleando solución buffer de cloruro de pH 2 0.2 N en todas las diluciones, para obtener una concentración final de 60 mcg/ml. Cada una de las muestras se leyó al ultravioleta en un rango de 340 a 230 nm empleando la solución buffer como blanco, en celdas de 1 cm de longitud de paso.

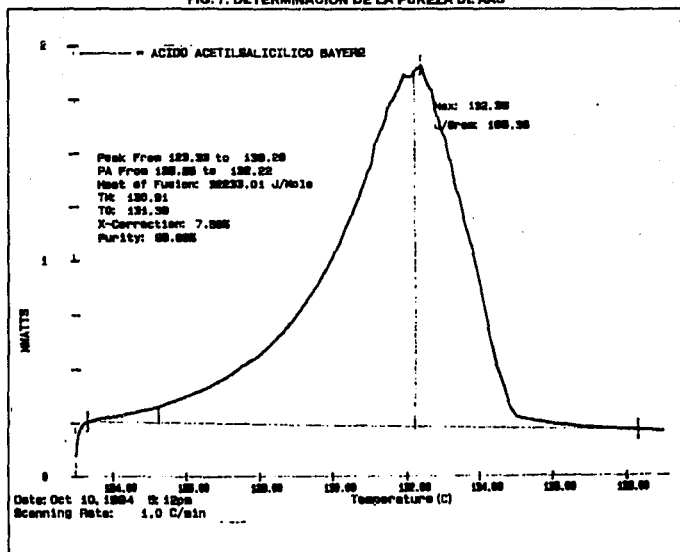
El procedimiento anterior se realizó en tres ocasiones diferentes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

La pureza fue obtenida por DSC, el termograma representativo de muestra en la figura 7. La pureza obtenida fue de 98.88 %.

FIG. 7. DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DE AAS



DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO A pH 2

En la tabla 3 se reportan los datos obtenidos en el análisis para determinar la solubilidad del ácido acetilsalicílico a pH 2 expresados en mg/10 ml de solución, considerando las diluciones realizadas para su análisis por UV.

Se obtuvieron los valores promedio y la desviación estándar para cada triplicado. Con la totalidad de los datos se realizó un análisis de la varianza (tabla 4) para evaluar la reproducibilidad de la determinación en las diferentes replicas con un nivel de confianza del 95 %. No se observó diferencia estadística significativa por lo que se concluye que la reproducibilidad es adecuada.

Con los valores promedio se trazó el gráfico de solubilidad de fase, los mg. recuperados en solución vs los mg. adicionados por cada vial. El valor de solubilidad (S_0) se obtuvo por definición extrapolando el punto donde se forma la meseta al eje Y, que correspondió a 37.70 mg/10 ml de solución buffer de pH 2. Este valor será empleado en la ecuación correspondiente para determinar la constante de complejación. (Fig. 8)

TABLA 3. SOLUBILIDAD DEL ÁCIDO ACETILSALICILICO A pH 2

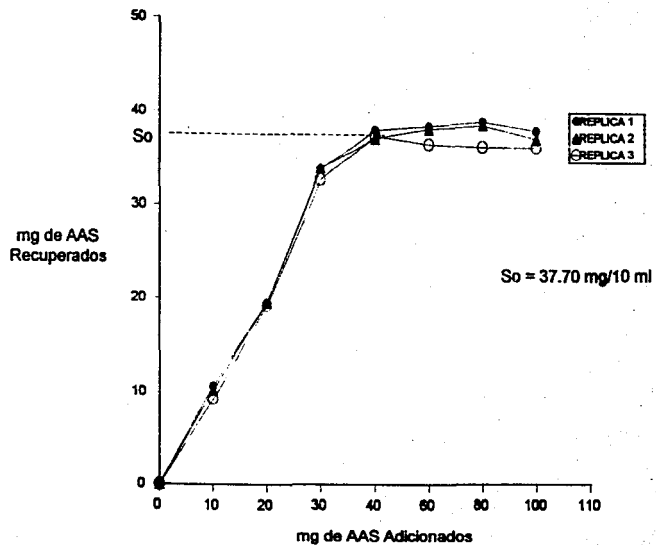
Mg de AAS Adicionados	10	20	30	35	40	50	60	100
Mg de AAS Recuperados en solución								
REPLICA								
1	9.137	18.454	27.363	32.950	36.915	36.972	36.106	34.935
	9.405	19.192	28.992	33.040	37.175	37.941	36.106	36.361
	8.960	18.912	28.140	31.500	37.329	35.826	35.661	36.425
MEDIA	9.1670	19.099	28.165	32.496	37.140	36.246	35.958	35.907
DESV. STD	0.2240	0.1616	0.8148	0.8645	0.2069	0.6310	0.2569	0.8420
2	10.308	19.625	25.950	33.943	36.895	37.710	38.525	37.697
	10.512	19.421	29.629	34.300	36.705	38.118	38.525	34.862
	9.761	19.052	28.875	32.937	37.112	38.346	38.346	34.862
MEDIA	10.193	19.366	28.097	33.726	36.904	37.829	38.193	36.773
DESV. STD	0.3890	0.2904	1.5630	0.7067	0.2036	0.7072	0.4283	0.3510
3	10.690	19.103	29.157	34.375	38.258	38.080	38.155	40.328
	10.690	19.446	29.323	33.460	36.755	39.441	39.441	34.432
	10.486	19.714	29.848	33.090	37.722	38.125	38.605	38.092
MEDIA	10.622	19.425	29.422	33.841	37.722	38.125	38.805	37.617
DESV. STD	0.1177	0.3062	0.36607	0.6614	0.6855	0.7781	0.5915	2.4303

TABLA 4. ANOVA PARA LA SOLUBILIDAD DE AAS A pH 2

Factor	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Varianza	F	P-valor
DÍA	25.95	2	12.97	0.1329	3,23
TOTAL	6759.75	71	95.21		
ERROR	6733.80	69	97.59		

FIG. 8

SOLUBILIDAD DEL ACIDO ACETILSALICILICO A pH 2



DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE ESTABILIDAD DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN

En la figura 9 se muestran los espectros de ultravioleta obtenidos en la determinación de la constante de complejación, puede observarse claramente la modificación del espectro con respecto al correspondiente a la materia prima del ácido acetilsalicílico (fig. 12), lo cual se toma como una evidencia de que desde la concentración más baja de β -Ciclodextrina ocurre la formación de un complejo de inclusión en estado líquido.

Posteriormente se reportan los resultados que se obtuvieron en el análisis para la determinación de la constante de estabilidad. (Tabla 5)

Se calculó el valor promedio y la desviación estándar para el triplicado de datos en cada concentración de β -Ciclodextrina empleada. Los valores se reportan en $\text{Mol} \times 10^{-2}$.

Al igual que en el estudio anterior los datos se analizaron por ANOVA (tabla 6). La Fobs fue de 0.0424 y la F crit de 3.390, existiendo reproducibilidad entre días, lo que garantizó que el valor reportado es confiable y exacto a un nivel de confianza del 95 %.

Con los valores promedio se trazó el gráfico correspondiente, (Fig. 10) empleando la concentración de ácido acetilsalicílico en solución vs. la concentración de β -Ciclodextrina adicionada a cada ampollita. De este se calculó el valor de la constante de estabilidad, considerando la pendiente de la recta y la solubilidad del ácido acetilsalicílico en el medio empleado, que se determinó previamente. Se empleó la fórmula: $K = m / S_0 (1-m)$, con la que se obtiene un valor para K_{eq} del complejo de inclusión de ácido acetilsalicílico y β -Ciclodextrina de 147.097 Mol^{-1} a 25°C y pH 2. El tipo de diagrama obtenido representa un comportamiento típico para una relación estequiométrica 1:1, de composición constante y solubilidad no limitada. Dado que la constante de solubilidad determina la solubilidad del complejo, es de esperar que al obtener un valor relativamente bajo, el complejo puede

mantenerse estable en medio ácido, pero a la vez disociarse fácilmente en medio biológico, aumentando de esta forma la biodisponibilidad del fármaco, considerando que para éste, la solubilidad es el factor limitante de la absorción.

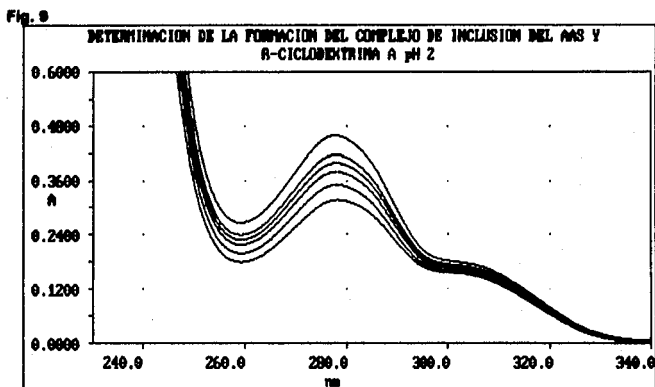


TABLA 5. SOLUBILIDAD DE FASE PARA DETERMINAR LA CONSTANTE DE COMPLEJACIÓN

Concentración de B-CD adicionada (Mol x 10 ⁻³)	0.79	3.171	6.340	9.518	11.10	15.80
REPLICA	Concentración de AAS en solución (Mol x 10 ⁻²)					
1	2.6802 2.7470 2.7682	2.9496 2.9479 2.9428	2.9759 3.1938 3.2014	3.5060 3.4448 3.4609	3.5067 3.5278 3.5253	3.8704 3.8725 3.8797
MEDIA	2.7528	2.9467	3.1237	3.4207	3.5199	3.8608
DESV. STD	0.0590	0.0038	0.0128	0.0661	0.0115	0.0421
2	2.6978 2.6893 2.6898	2.9199 2.9115 2.8928	3.1472 3.0437 3.1412	3.4303 3.4668 3.3481	3.5558 3.5585 3.5532	3.5948 3.5948 3.8551
MEDIA	2.6856	2.9080	3.1107	3.4150	3.3391	3.7333
DESV. STD	0.0143	0.0138	0.0681	0.0498	0.0081	0.1390
3	2.7801 2.6834 2.7334	2.9369 2.9810 2.9545	3.1624 3.1997 3.1624	3.3668 3.4210 3.5262	3.5838 3.5694 3.5821	3.8890 3.9314 3.9611
MEDIA	2.7323	2.9568	3.1748	3.4390	3.5784	3.9271
DESV. STD	0.0483	0.0227	0.0215	0.0610	0.0078	0.0362

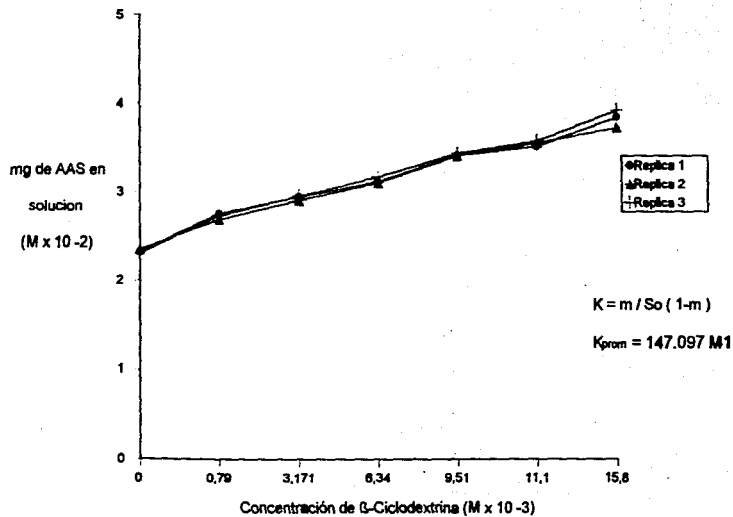
Nota: La cantidad adicionada de AAS fué de 100 mg/ampolleta.

TABLA 6. ANOVA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE COMPLEJACIÓN

FUENTE DE VARIACIÓN	suma de cuadrados	grados de libertad	cuadrados medios	F ₀	F _{tab}
DÍA	0.01	2	0.01	0.0424	3.390
TOTAL	8.38	53	0.16		
ERROR	8.37	51	0.16		

FIG. 10.

DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE COMPLEJACIÓN DE AAS Y β -CD



VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Se validó el método analítico empleado para asegurar que la respuesta medida era únicamente debida a la molécula del ácido acetilsalicílico y no a interferencias del sistema o el método. Los resultados de los parámetros evaluados y su análisis se muestran a continuación.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Criterios de aceptación:

- A) La relación entre la concentración y la propiedad medida debe ser altamente significativa. ($F_{cal\ reg} \geq F_{crit\ reg}$ y $t_{cal\ lin} \leq F_{crit\ lin}$)
- B) La ordenada al origen de la relación lineal simple concentración-propiedad medida debe ser estadísticamente igual a cero.
- C) El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.98
- D) C.V. debe $\leq 3\%$

Tabla 7. Evaluación de la linealidad del sistema

CONCENTRACIÓN mcg/ml	REPLICAS		
	1	2	3
	ABSORBANCIA		
30	0.1919	0.1949	0.1947
60	0.3901	0.3995	0.3944
90	0.5761	0.5877	0.5928
120	0.7873	0.7924	0.7969
180	1.0308	1.0480	1.0554

Tabla 8. Anova para la linealidad del sistema

Fuente de variación	Fcal	Fcrit
Regresión	21857.01	6.41
Falta de ajuste	1.3024	4.83

Los valores estadísticos obtenidos fueron los siguientes:

Ordenada al origen = 0.001

Intervalo de Confianza para la ordenada al origen = 0.001 ± 0.0088

$t_{obs} = -0.2239$ $t_{crit} = 2.1604$

$r = 0.9996$

$r^2 = 0.9994$

C.V. = 1.2933

Como puede observarse los valores experimentales se encuentran dentro de los criterios de aceptación por lo que se concluye que el sistema se comporta linealmente.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Criterio de aceptación:

- A) El coeficiente de variación debe ser menor o igual al 3 %
- B) La media del porcentaje recuperado debe estar entre 97 y 101 %

Tabla 9. Evaluación de la precisión del sistema

La concentración de la solución de referencia fue de 60 mg/l ml

ABSORBANCIA	% RECUPERADO
0.3909	99.298
0.3985	101.690
0.3944	100.392
0.3838	97.693
0.3874	98.610
0.3879	98.991
Media	99.447
C.V:	1.4074

Los valores del porcentaje de recobro y el coeficiente de variación están dentro de los criterios de aceptación, por lo que se concluye que el sistema es preciso.

REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

Criterio de aceptación:

A) El coeficiente de variación total debe ser menor o igual al 3 %

Tabla 10. Evaluación de la reproducibilidad del método

% RECUPERADO POR EL ANALISTA		
DÍA	1	2
1	97.633	97.621
	98.610	97.720
	98.991	97.058
2	99.018	99.806
	99.603	99.756
	99.620	101.231

Coefficiente de Variación = 1.2299

Los valores obtenidos se encuentran dentro de los límites de aceptación, por lo que el método es reproducible.

Para conocer la fuente de variación se realiza el análisis de la varianza.

Criterio de aceptación:

- A) Si $F_{cal} \text{ analista} \leq F_{critica} \text{ analista}$, el método es reproducible por los analistas.
b) Si $F_{cal} \text{ día} \leq F_{critica} \text{ día}$, el método es reproducible en diferentes días por un mismo analista.

Tabla 11. Anova para la determinación de la reproducibilidad del método

Fuente de variación	F cal.	Fcriti.
Analista	0.033	18.5
Día	16.814	4.46

De acuerdo a los datos obtenidos, no existe reproducibilidad en diferentes días por uno de los analistas, por lo que se calcula la variación en el método analítico.

Repetibilidad = 0.7312

Reproducibilidad Día/Analista = 1.6787

Reproducibilidad Interanalista = 1.6787

Estos resultados sugieren que el error global es muy pequeño, por lo que cualquier diferencia entre dos grupos de datos se hace significativa. Sin embargo el coeficiente de variación total es menor al 3 %, cumpliendo con el criterio básico de aceptación.⁽⁸¹⁾

PREPARACIÓN DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO Y β -CICLODEXTRINA

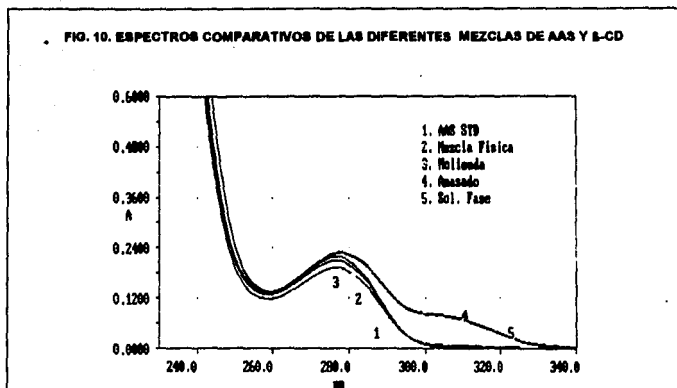
Para elegir el método de preparación del complejo fue necesario realizar un estudio previo comparativo, a fin de que se observaran los cambios en el comportamiento de la molécula del fármaco cuando se preparara el complejo por otro método y lo observado en el análisis de solubilidad de fase en donde era segura la formación del complejo.

De la gráfica de la figura 10 se obtuvieron las cantidades necesarias tanto de ácido acetilsalicílico Y β -Ciclodextrina para preparar el complejo por amasado, molienda, y mezclado, empleando la ecuación $S_t = S + SL$ con la siguiente secuencia:

1. La solubilidad máxima alcanzada en presencia de β -CD es de 3.75×10^{-2} Mol
2. La solubilidad del fármaco sin complejar a pH 2 es de 2.09×10^{-2} Mol
3. Realizando la substracción de 2 en 1 se obtiene la cantidad complejada que es de 1.66×10^{-2} Mol, los cuales convertidos a masa son 2.99 g de AAS y 17.99 g de β -CD

Con esto se corroboró la estequiometría 1:1. De esta forma se prepararon las diferentes mezclas de complejación en una cantidad pequeña (2 g.) y se analizaron por UV, en solución buffer de pH 2, 0.2 N como medio de disolución a concentración de 60 μ g/ml, leyéndose las soluciones en un rango de 230 a 340 nm en celdas de 1 cm. de longitud de paso. Los espectros obtenidos se muestran en la figura 11.

FIG. 10. ESPECTROS COMPARATIVOS DE LAS DIFERENTES MEZCLAS DE AAS Y β -CD



Es claro que solo cuando la mezcla de AAS y β -CD es sometida al proceso de amasado, es posible observar un cambio en las características del espectro, indicativo de una complejación; con base en esto se eligió el método por amasado como el mejor para preparar el complejo.

CARACTERIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS Y DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN

Los resultados del análisis por sextuplicado se muestran en la tabla 12. El promedio fue de 60.073 mg/ml que representa un recobro del 100.07 % , con un coeficiente de variación del 1.2574, con lo cual se puede afirmar que el contenido de ácido acetilsalicílico en el complejo es uniforme.

TABLA 12. UNIFORMIDAD DEL CONTENIDO DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN

ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN
0.3894	59.476
0.3807	58.143
0.3916	59.608
0.3980	60.785
0.4008	61.213
0.3995	61.014
MEDIA	60.073
C.V	1.2574

A continuación se muestran los espectros de ultravioleta e infrarrojo, así como los termogramas obtenidos por DSC para cada una de las especies analizadas.

El espectro de UV del ácido acetilsalicílico en buffer de pH 2 (Fig. 12) muestra un máximo de absorbancia a 276 nm, el cual coincide con lo reportado en la bibliografía.

La β -Ciclodextrina no absorbe en el intervalo de análisis, por lo que no interfiere en la determinación de ácido acetilsalicílico en el complejo.(Fig. 13)

En lo que respecta al espectro de la mezcla de complejación por amasado es clara la modificación de éste (Fig. 14), apareciendo una nueva señal de absorción cercana a los 315 nm, lo cual sugiere que los grupos funcionales de la molécula de ácido acetilsalicílico se encuentran en un arreglo diferente, o que están intercalando con la molécula de β -

Ciclodextrina, lo cual es indicativo de la formación de un complejo de inclusión entre ambas especies.

En el análisis por DSC, el ácido acetilsalicílico presenta dos endotermas, la primera a 140.39°C, debida a la fusión, y otra a 250 °C por la descomposición.(Fig. 15) En un segundo calentamiento no se observó ninguna endoterma, por lo que se descarta alguna transición polimórfica de la molécula.

La β -Ciclodextrina presenta una endoterma de descomposición a 178.31 °C, este comportamiento no es constante, pues puede presentarse hasta después de los 200 °C. (Fig. 16)

En la mezcla de complejación por amasado (Fig. 17) la endoterma de fusión del ácido acetilsalicílico desaparece, mientras que la endoterma de descomposición de β -Ciclodextrina permanece. Un comportamiento de éste tipo representa la mejor evidencia de que la complejación se ha realizado, pues cualquier fenómeno que le ocurre a la molécula desaparece debido a su inclusión en la cavidad de la β -Ciclodextrina

En los espectros de infrarrojo, el ácido acetilsalicílico (Fig. 18) muestra sus bandas características a una frecuencia de 1755.9 cm^{-1} debida al grupo éster, y a 1682.6 cm^{-1} que se asigna a la señal del grupo carboxilo. También se observan la señal característica de los ácidos carboxílicos cerca de los 3000 cm^{-1} , sin embargo solo se consideró el área de la huella digital para observar las modificaciones en el espectro que se originen después de la complejación.

El espectro de la β -Ciclodextrina (Fig. 19) presenta señales alrededor de los 3400 cm^{-1} características de los polímeros, así mismo a 2928 cm^{-1} asignada a los grupos hidroxilo primarios y secundarios.

En la mezcla de complejación (Fig 20) se observa claramente que la señal debida al grupo éster se encuentra considerablemente disminuida, sucediendo lo mismo para la señal

del grupo ácido carboxílico aunque de forma menos pronunciada. Otro cambio importante es el aumento en la frecuencia a la cual se registran las señales, ahora presentándose a 1771.4 cm^{-1} para el grupo éster y a 1719 cm^{-1} para el grupo ácido, este aumento en la frecuencia se propone que es debido a la formación de puentes de hidrógeno entre la molécula de ácido acetilsalicílico y los grupos hidroxilo de la β -Ciclodextrina. ⁽⁸⁸⁾ Lo anterior es propuesto en base a lo reportado por Nakai Y. ⁽⁸⁹⁾, en un estudio en el cual evaluaron el cambio en las características del espectro de IR con respecto al tiempo de molienda, observando que después de 15 minutos la frecuencia y la intensidad de las señales no presentaba cambio adicional. Las frecuencias reportadas fueron 1772 cm^{-1} y 1715 cm^{-1} para cada uno de los grupos funcionales mencionados. Estos mismos resultados se observaron cuando se analizó el complejo de inclusión formado por coprecipitación.

Considerando que el grupo éster es el que se encuentra dentro de la cavidad, dado que su señal está disminuida considerablemente, es posible que esto le confiera una mayor estabilidad, siendo más resistente a la hidrólisis.

Las pruebas efectuadas para caracterizar el complejo, permiten constatar que es posible su formación, el cual es estable en estado sólido, con lo que se hace factible la manipulación del mismo para ser formulado posteriormente.

FIG. 12. ESPECTRO DE UV DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

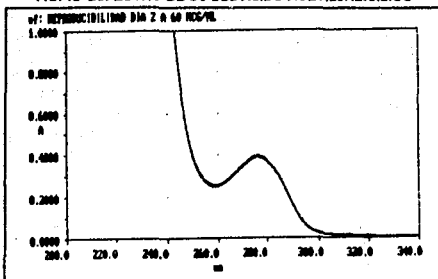


FIG. 13. ESPECTRO DE UV DE β -CICLODEXTRINA

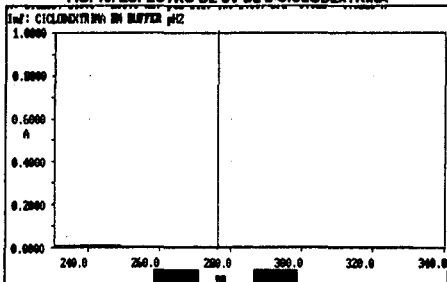


FIG. 14. ESPECTRO DE UV DE LA MEZCLA DE COMPLEJACIÓN POR AMABADO

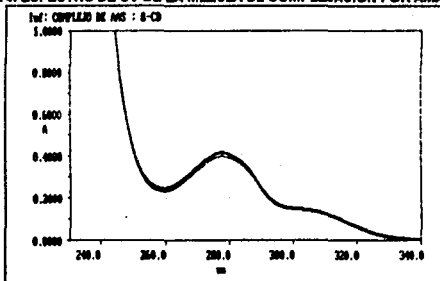


FIG. 15. TERMOGRAMA DSC DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

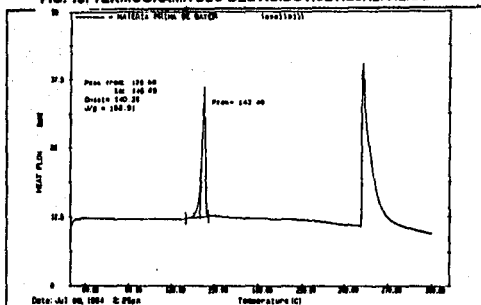


FIG. 16. TERMOGRAMA DSC DE β-CICLODEXTRINA

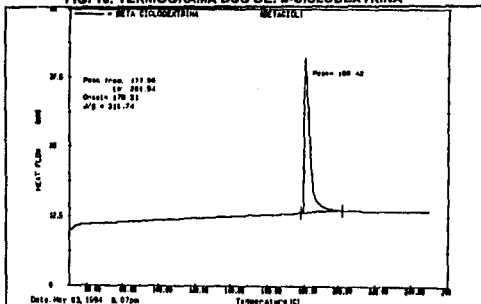


FIG. 17. TERMOGRAMA DSC DE LA MEZCLA DE COMPLEJACIÓN POR AMASADO

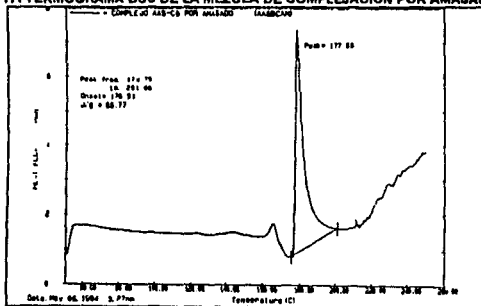


FIG. 18. ESPECTRO DE IR DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

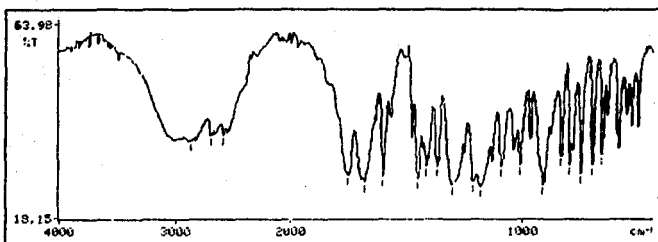


FIG. 19. ESPECTRO DE IR DE β -CICLODEXTRINA

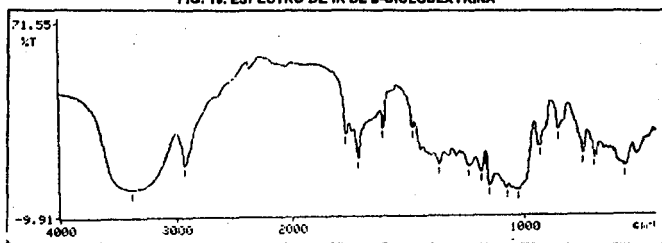
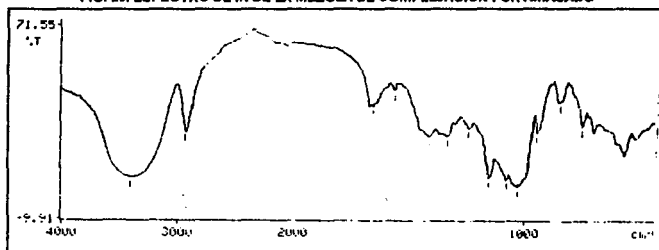


FIG. 20. ESPECTRO DE IR DE LA MEZCLA DE COMPLEJACIÓN POR AMASADO



EVALUACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN DE AAS Y β -CD

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13, con los valores promedio y la desviación estándar, que se encuentra dentro de los límites especificados. Al igual que para los datos anteriores se realizó el análisis de los datos por ANOVA para evaluar la reproducibilidad en la determinación de la solubilidad. (Tabla 14) Se obtuvo una Fobs de 0.0058, y una Fcrit de 3.23, considerándose por lo tanto el proceso es reproducible entre días.

Con los datos promedio se construyó el diagrama de solubilidad de fase correspondiente, (Fig. 21) graficando la cantidad de AAS recuperado en solución en función de la cantidad de AAS equivalente adicionado en forma de complejo. De la meseta formada debida a la saturación, se extrapó al eje Y para conocer la solubilidad del AAS en forma de complejo. El valor obtenido fue de 49.082 mg/10 mostrando un aumento en la solubilidad comparada con la del fármaco sin la presencia de β -Ciclodextrina, lo cual está de acuerdo con el valor de la constante obtenido, indicando que se forma un complejo estable en medio sólido, pero a la vez con una solubilidad aceptable, se espera que con el efecto logrado en la solubilidad se logre disminuir la irritabilidad gástrica del ácido acetilsalicílico y simultáneamente la biodisponibilidad del fármaco se vea incrementada.

Para observar más claramente lo anterior se construyó un gráfico comparativo con la totalidad de los datos tanto del fármaco complejado como sin complejar. (Fig. 22)

En este gráfico puede observarse un comportamiento similar en la parte ascendente, comprobándose el fundamento de la técnica, la cual se basa en el supuesto de que la solubilidad del fármaco en un solvente dado es una constante, (representada por la parte lineal de los gráficos) y que cualquier aumento en la solubilidad será efecto de la formación de un complejo de inclusión, sin que se afecte la naturaleza misma del fármaco, pues la interacción es solo parcial.

TABLA 13. SOLUBILIDAD DEL COMPLEJO DE AAS Y β -CICLODEXTRINA

EQUILIBRIOS ADICIONADOS	10	20	30	35	40	50	60	100
REPLICA	MG RECUPERADOS							
1	9.8583 10.265 10.743	20.173 21.057 19.984	31.474 32.695 32.072	34.778 34.477 35.802	42.747 44.151 43.083	48.751 49.240 49.408	48.338 52.798 49.430	49.331 49.816 49.732
MEDIA DESV. STD.	10.289 0.3810	20.398 0.4738	32.080 0.4987	35.091 0.5671	43.327 0.4988	49.133 0.2783	49.855 2.081	49.628 0.2116
2	10.703 10.588 11.328	20.135 19.236 20.217	31.240 30.250 30.741	34.554 35.157 33.841	43.994 44.670 40.563	48.796 48.811 48.933	49.964 49.708 49.406	49.810 49.702 49.447
MEDIA DESV. STD.	10.872 0.3243	19.881 0.4485	30.744 0.4041	34.517 0.5370	42.999 1.4911	48.846 0.613	49.692 0.2286	49.653 0.1821
3	9.9916 10.392 11.015	21.565 20.343 19.284	31.063 30.329 29.831	33.580 35.828 29.831	45.230 45.878 44.074	49.404 48.793 48.328	48.332 49.809 49.901	49.583 48.674 50.170
MEDIA DESV. STD.	10.468 0.4213	20.392 0.9379	30.418 0.5188	35.329 1.2751	44.994 0.6828	48.841 0.4406	49.344 0.7236	49.475 0.6148

TABLA 14. ANOVA PARA LA EVALUACIÓN DE LA REPRODUCIBILIDAD EN LA DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN

TIPO DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F _{calc}	F _{tabla}
DÍA	1.91	2	0.95	0.0058	3.23
TOTAL	11424.52	71	160.91		
ERROR	11422.61	69	165.55		

FIG. 21

SOLUBILIDAD DEL COMPLEJO DE INCLUSION DEL AAS Y β -CICLODEXTRINA

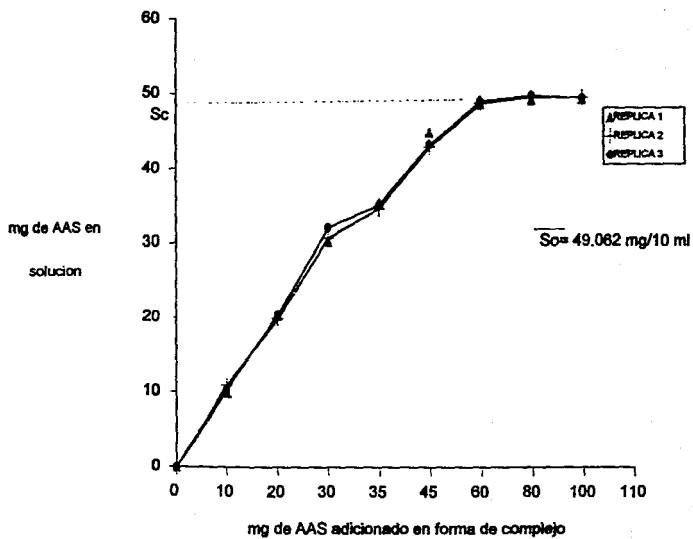
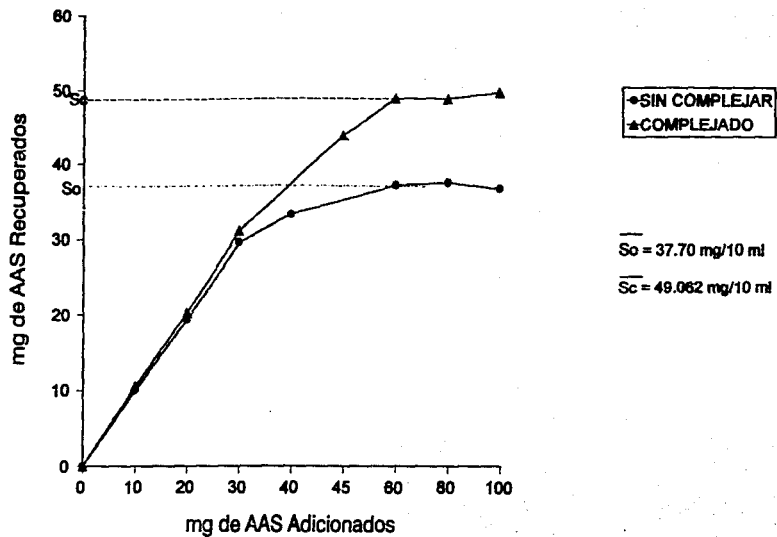


FIG. 22.

SOLUBILIDAD COMPARATIVA DEL ACIDO ACETILSALICILICO



CONCLUSIONES

1. La técnica de solubilidad de fase permitió determinar adecuadamente las condiciones de preparación de complejos, siendo una parte fundamental que debe hacerse realizada adecuadamente, es decir controlando cuidadosamente las condiciones a las cuales se va a realizar la determinación (temperatura, pH, tiempo y velocidad de agitación) a fin de obtener información exacta y reproducible acerca del comportamiento de las especies involucradas. Esta permite optimizar el procedimiento de complejación al poder calcular, a partir del gráfico obtenido, correctamente las cantidades necesarias de fármaco y β -Ciclodextrina sin tener que emplear una cantidad mayor, lo cual aumenta el costo del proceso.
2. Empleando el método de complejación por amasado es posible obtener un complejo de inclusión estable en estado sólido.
3. Las técnicas analíticas empleadas (UV, IR y DSC) permitieron comprobar la formación del complejo de inclusión de ácido acetilsalicílico: β -Ciclodextrina, ya que la información obtenida a través de las mismas se apoya conjuntamente, llevando por diversos principios a la ratificación de la formación del complejo.
4. La formación del complejo de inclusión tiene como consecuencia un aumento del 32% en la solubilidad del ácido acetilsalicílico, lo cual permitirá seguramente reducir la dosis empleada, reducir la irritabilidad gástrica y modificar importantemente la biodisponibilidad del fármaco, haciendo por ende posible la prescripción del mismo a pacientes con afección cardíaca o daño vascular quienes requieren de una dosis menor y un consumo frecuente del fármaco estudiado.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar la estabilidad de las formas complejada y no complejada para conocer si el proceso de complejación ayuda a mejorar la estabilidad aunado al aumento en la solubilidad del fármaco.
2. Efectuar estudios comparativos de perfiles de disolución en tabletas elaboradas con el fármaco complejado y sin complejar con el fin de evaluar la cinética de liberación del fármaco complejado y determinar el efecto de la complejación en la forma farmacéutica.
3. Realizar estudios in vivo para evaluar la biodisponibilidad de ambas presentaciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jiménez H. Alfredo, Stubbs H. *Rapidity and Duration of platelet suppression by enteric-coated Aspirin in healthy young men.* The Am. J. Cardiology. 69 (15) 258-262 (1992.)
2. Joann E. Manson, Stamfer M. *A prospective study of aspirin use and primary prevention of cardiovascular disease in women.* JAMA. 266 (4) 521-526 (1991).
3. Singh R., Nema R., Metha P. *The effect of the diet and aspirin on patient outcome after myocardial infarction.* Nutrition. 7 (2) 125-129 (1991).
4. Remington. *Farmacía.* V II. 17ª ed. Medica Panamericana S.A. Argentina. (1987).
5. Drill. *Farmacología Médica.* 2ª de. Prensa Médica Mexicana. 597-620. México. (1987).
6. Florey. *Analytical Profiles of Drug Substances.* V. 8. Academic Press Inc. England. (1979).
7. Litter M. *Farmacología Experimental y Clínica.* 7ª ed. El Ateneo. Argentina. (1986).
8. Goodman-Gilman. *Basas Farmacológicas de la terapéutica.* 8ª ed. Panamericana. México D.F. (1991).
9. Bowman W., Rand M., *Farmacología.* 2ª ed. Interamericana. México, D.F. (1980).
10. The SALT. Collaborative Group. *Swedish Aspirin Low-dose Trial as secondary prophylaxis after cerebrovascular ischaemic events.* The Lancet. 338 (8779) 1345-1349 (1991)
11. Farell B., Godwing J. *The United Kingdom Tresslend Ischaemic attack. Aspirin Trial. Final Results.* J. Neur. Psy. 54 (12) 1044-1054 (1991).
12. Taylor R., Frances A. *Effects of low-dose of aspirin on restenosis after coronary angioplasty.* The Am. J. Card. 66 (20) 874-878. (1991).

13. Nyman I., Larson H. *Prevention of serious Cardiac events by low-dose aspirin in patients with silent myocardial ischaemia.* The Lancet. 340 (8818) 497-504 (1992)
14. Collaborative Group. *Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin or neither among 1787 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS 2.* The Lancet. 337 (8307) 349-360 (1988).
15. Graham D., Smith L. *Aspirin and the Stomach.* Annals of Internal Medicine, 104 (3) 390-398 (1986).
16. Kevin J., Ivey M. *Mechanism of nonsteroidal antiinflammatory drug-induced gastritis damage.* The Am. J. Med. 84 (2A) 41-45 (1988).
17. Kauffman G. *Aspirin-Induces gastric mucosal injury: Lessons learned from animal models.* Gastroenterology. 96 (2) 611-614 (1989).
18. Szejtli J. *Cyclodextrin Technology.* Kluwer Press. Dordrecht. (1988).
19. Jones S.P. *Cyclodextrin in the pharmaceutical sciences. Part II. Preparation, structure and properties of cyclodextrin and cyclodextrin inclusion compounds.* Acta Pharm. Tech. 30 (3) 213-223 (1984)
20. Ducheme D. *The current state of β -Cyclodextrin in pharmaceuticals.* Acta Pharm. Tech. 36 (1) 1-6 (1990).
21. Rubinstein M.H. *Pharmaceutical Technology*, John Wiley and Sons. England. (1989).
22. Marques C., Hadgraft J. *Studies of Cyclodextrin Inclusion complexes. II. Molecular Modelling and H-NMR evidence for the salbutamol- β -Cyclodextrin complex.* Int. J. Pharm. 63. 267-274 (1990).
23. Otero-Espinar F., Angiano I. *Interaction of Naproxen with β -Cyclodextrin in solution and in the solid state.* Int. J. Pharm. 79. 179-187 (1992).
24. Backesfield T. *Interaction of NSA with cyclodextrin and hydroxypropyl cyclodextrin derivatives.* Int. J. Pharm. 74. 85-93 (1991).

25. Orienti Isabella, Fini A. *Inclusion complexes between non steroidal antiinflammatory drugs and β -Cyclodextrin*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 37 (2) 110-112 (1991).
26. Kurosumi M., Nagai T. *Inclusion compounds of non steroidal antiinflammatory and other slightly water soluble drugs with α - and β -Cyclodextrins in powdered form*, Chem. Pharm. Bull. 23 (12) 3062-3068 (1975).
27. Bentinetti G., Mura P. *Solubilization and Interaction of naproxen with cyclodextrin in aqueous solution and in the solid state*, Farmaco. 44 (2) 195-213 (1988)
28. Nakai. Y. *Study of the interaction of clobazepam with cyclodextrins in solution and in the solid state*, Chem. Pharm. Bull. 38 (3) 728-732 (1990).
29. Marques C., Hadgraft J. *Studies of cyclodextrin inclusion complexes. 1. The Salbutamol-Cyclodextrin complex as studied by phase solubility and DSC*, Int. J. Pharm. 63 259-266 (1990).
30. Lin S. *Indometacin and Cyclodextrin complexes*, Int. J. Pharm. 63 211-219 (1991).
31. Torricelli C., Martini A. *Stability studies on steroidal drug/ β -Cyclodextrin in ground mixture*, Int. J. Pharm. 75 147-153 (1992).
32. Celebi N., Erden N. *Interaction of Naproxen and β -Cyclodextrin in ground mixture*, Int. J. Pharm. 78 183-187 (1992).
33. Szejtli J. *Cyclodextrin in drug formulations. Part I*, Phar. Technol. 8 34-42 (1991).
34. Rahman A. , Saleh I. *Inclusion complexation between Trimethyl- β -Cyclodextrin and Clobazepam or Flurintrazepam during Sealed Heating*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 39 (2) 82-86 (1993).
35. Connors K. A. *Binding Constants*. John Wiley and Sons. USA. (1988).
36. Connors K. *Curso de análisis farmacéutico*. Reventé S.A. 358-372. España. (1981).
37. Nim Y. , York P. *Spiroolactone- cyclodextrin Complexes: phase solubility and ultrafiltration studies*, Int. J. Pharm. 73 9-15 (1991).

38. DePonti R, Torricelli C. *Use of polarographic Method, a UV method and the phase Solubility technique to determine the stability constant in aqueous solution of a β -Cyclodextrin complex with a new Immunomodulating agent.* Eur. J. Pharm. Biopharm. 31 (2) 108-109 (1991).
39. Vromans H., Anko C. *Mechanism of dissolution of drug.Cyclodextrin complexes: a pragmatic approach.* Acta Pharm. Technol. 35 (4) 250-255 (1989).
40. Valsami N. *Binding studies of ions with cyclodextrin using ion-selective electrodes.* J. Pharm. Sci. 79 (12) 1087-1094 (1990).
41. Nishijo J. *Inclusion complex of β -Anilinnaphthalene 1.sulfonate with β -Cyclodextrin.* J. Pharm. Sci. 80 (1) 58-62 (1991).
42. Szejtli J. *Cyclodextrin in drug formulations. Part II.* Phar. Technol. 9 24-38 (1991).
43. Nambu N. *Bioavailability of powdered inclusion compounds of nonsteroidal antiinflammatory drugs with β -Cyclodextrin of rabbits and dogs.* Chem. Pharm. Bull. 26 (10) 2952-2956 (1978).
44. Nazzi G. *Formation of Inclusion complex between the non-steroidal anti-inflammatory drug (RS)-2-(4-Isobutylphenyl)-1-propionhydroxamic acid and β -Cyclodextrin.* Acta Pharm. Technol. 34 (1) 17-21 (1988).
45. Aly A., Rahman A. *Evaluation of Chloramphenicol- β -Cyclodextrin Inclusion complex.* Eur. J. Pharm. Biopharm. 37 (1) 34-37 (1991).
46. Vila-Jato J.L. *Spironolactone / β -Cyclodextrin complex oral bioavailability in humans.* Acta Pharm Technol. 32 (2) 82-85 (1988).
47. Glomont F. *Improvement in availability and stability of dermocorticoid by Inclusion in β -Cyclodextrin.* Int. J. Pharm. 46 49-55 (1988).
48. Otero-Espinar F. *Oral bioavailability of naproxen- β -Cyclodextrin inclusion compound.* Int. J. Pharm. 75 37-44 (1991).

49. Szeman J. *Improvement of stability of Prostacyclin-Methylester by β -Cyclodextrin.* Acta Pharm. Technol. 33 (1) 27-30 (1987).
50. Fuloka J. *Biopharmaceutical study of inclusion complex. 1. Pharmaceutical advantages of cyclodextrin complex by benzocyclan fumarate.* Chem. Pharm. Bull. 31 (7) 2418-2423 (1983).
51. Nakai Y. *The dispersed states of medicinal molecules in ground mixtures with α or β -Cyclodextrin.* Chem. Pharm. Bull. 32 (2) 681-691 (1984).
52. Uekama K. *Improvement of some pharmaceutical properties of Clofibrate by Cyclodextrin Complexation.* Acta Pharm. Helv. 58 (2) 338-342 (1983).
53. Vikmon M. *Stabilization of Mydleton with β -Cyclodextrin.* Acta Pharm. Technol. 32 (1) 29-32 (1986).
54. Takahashi Y. *Stabilization of AD-1590 a non-steroidal agent in suppository bases by β -Cyclodextrin complexation.* Chem. Pharm. Bull. 34 (4) 1770-1774 (1986).
55. Otero-Espinar F. *Reduction of the ulcerogenicity of naproxen complexation with β -Cyclodextrin.* Int. J. Pharm. 70 35-41 (1991).
56. Eishaboury M.H. *Physical properties and dissolution profiles of tablets directly compressed with β -Cyclodextrin.* Int. J. Pharm. 63 95-100 (1990).
57. Shangraw R. *Characterization of the tableting properties of β -Cyclodextrin and the effects of processing variables on inclusion complex formation, compactability and dissolution.* Drug. Dev. Ind. Pharm. 18 (17) 1831-1851 (1991).
58. Yonobushi N, Nakajima S. *Effects of grinding on physical and chemical properties of crystalline medicinals with microcrystalline cellulose. III. Infrared spectra of medicinals in ground mixtures.* Chem. Pharm. Bull. 26 (1) 3419-3425 (1978).
59. Yonobishi N., Nakajima S. *Effects of grinding on the physical and chemical properties of crystalline medicinals with microcrystalline cellulose. IV.*

Comparison of the IR spectra of medicinals in the solid state and in solution.

Chem. Pharm. Bull., 28 (2) 652-656 (1980)

60. Choudhury S., Mitra K. *Kinetics of aspirin hydrolysis and stabilization in the presence of 2-hydroxypropyl- β -Cyclodextrin.* Pharmaceutical Research, 10 (1) 156-159 (1993).