



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

FORMACION Y EVALUACION DEL COMPLEJO
KETOCONAZOL/HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ELVIRA ARREOLA GARDUÑO

DIRECTOR: M. en C. BEATRIZ ESPINOSA FRANCO

MEXICO, D.F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

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

ELVIRA ARREOLA GARDUÑO

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Formación y evaluación del complejo ketoconazol-Hidroxiopropil-beta-ciclodextrina.**

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

PRESIDENTE	Q.F.B. DOMITILA BURGOS JARA
VOCAL	M. en C. BEATRIZ ESPINOSA FRANCO
SECRETARIO	Q.F.B. MA. DE LOURDES CERVANTES MARTÍNEZ
SUPLENTE	Q.F.B. JUANA MARÍA DE LA PAZ LÓPEZ
SUPLENTE	Q.F.B. TOMÁS DELGADO CRUZ

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a, 08 de enero de 2002.

Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ
JEFE DE LA CARRERA

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

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

La mejor manera de predecir el futuro es crearlo.

Peter Drucker

Agradezco a todas las personas involucradas en la realización de éste trabajo.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	7
1.MATERIAS PRIMAS	10
1.1. KETOCONAZOL	10
1.1.1. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS	10
1.1.2. GENERALIDADES	11
1.1.3. INDICACIONES TERAPÉUTICAS	12
1.1.4. FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA	12
1.1.5. DOSIS Y VÍA DE ADMINSTRACIÓN	13
1.1.6. CONTRAINDICACIONES	14
1.1.7. REACCIONES SECUNDARIAS Y ADVERSAS	15
1.2. HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA	16
1.2.1. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS	16
1.2.2. CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES	17
1.2.3. TOXICIDAD	18
2. FORMACION DE COMPLEJOS CON HP-β-CD	19
2.1. FUNDAMENTACIÓN	19
2.2. REQUERIMIENTOS PARA FORMAR UN COMPLEJO	20
2.2.1. POLARIDAD Y GEOMETRÍA DE LA MOLÉCULA	21
2.2.2. MEDIOS DE PREPARACIÓN	22
2.2.3. FUERZAS DE INTERACCIÓN	23

2.3. MÉTODOS DE FORMACIÓN DE COMPLEJOS	25
2.3.1. MÉTODO DE COPRECIPITACIÓN	25
2.3.2. MÉTODO DE AMASADO	25
2.3.3. MÉTODO DE PREPARACIÓN EN FASE SÓLIDA	26
2.4. ESTABILIDAD DE UN COMPLEJO	26
2.4.1. SOLUBILIDAD	27
2.4.2. CONSTANTE DE ESTABILIDAD	30
2.5. MÉTODOS PARA EVALUAR LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS	31
2.5.1. ESPECTROSCOPIA DE LA REGIÓN ULTRAVIOLETA	31
2.5.2. MÉTODOS TÉRMICOS	32
2.5.3. ESPECTROSCOPIA DEL INFRARROJO	33
3. APLICACIÓN DE LAS CICLODEXTRINAS	34
3.1. APLICACIÓN EN EL ÁMBITO FARMACÉUTICO	34
3.1.1. INCREMENTO DE LA SOLUBILIDAD	35
3.1.2. EFECTO EN LA ESTABILIDAD FÍSICA Y QUÍMICA	36
3.1.3. DISMINUCIÓN DE LOS EFECTOS ADVERSOS	37
3.1.4. EN FORMULACIONES	37
3.2. EN LA INDUSTRIA COSMÉTICA	37
3.3. INDUSTRIA ALIMENTICIA Y BIOTECNOLÓGICA	38
3.4. INDUSTRIA AGROQUÍMICA	39

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
5. OBJETIVOS	41
5.1. OBJETIVOS PARTICULARES	41
6. HIPÓTESIS	42
7. MATERIAL	43
7.1. EQUIPOS E INSTRUMENTOS	43
7.2. REACTIVOS	43
8. METODOLOGÍA	45
9. RESULTADOS	53
10. CONCLUSIONES	83
11. RECOMENDACIONES	84
12. APÉNDICE I	85
13. APÉNDICE II	87
14. BIBLIOGRAFÍA	91

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Datos de solubilidad del ketoconazol en metanol.

TABLA 2. Análisis de varianza para la evaluación de la reproducibilidad en la determinación de solubilidad de ketoconazol en metanol.

TABLA 3. Datos de solubilidad para determinar la constante de Complejación.

TABLA 4. Análisis de varianza para la evaluación de la reproducibilidad en la determinación de la constante de complejación.

TABLA 5. Evaluación de la linealidad del sistema.

TABLA 6. Análisis de varianza para la linealidad del sistema.

TABLA 7. Evaluación de la precisión del sistema.

TABLA 8. Evaluación de la reproducibilidad del método.

TABLA 9. Análisis de varianza para evaluar la reproducibilidad del método.

TABLA 10. Uniformidad de contenido del complejo de inclusión ketoconazol / HP- β -CD.

TABLA 11. Datos de solubilidad del complejo de inclusión ketoconazol/ HP- β -CD.

TABLA 12. Análisis de varianza para la evaluación de la reproducibilidad de la solubilidad del complejo de inclusión ketoconazol/ HP- β -CD.

TABLA 13. Datos de solubilidad del ketoconazol a pH2, pH4 y pH 7.

TABLA 14. Datos de solubilidad del complejo de inclusión ketoconazol / HP- β -CD a pH2, pH4 y pH 7.

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Estructura química del ketoconazol
- FIGURA 2.** Estructura química de la HP- β -CD.
- FIGURA 3.** Representación del proceso de complejación.
- FIGURA 4.** Diagrama de solubilidad de fase típico.
- FIGURA 5.** Diagrama de solubilidad de fase de ketoconazol en metanol.
- FIGURA 6.** Espectros de UV obtenidos en la determinación de la constante de formación del complejo de inclusión ketoconazol / HP- β -CD.
- FIGURA 7.** Diagrama de solubilidad de fase para la determinación de la constante de complejación.
- FIGURA 8.** Espectros UV de las diferentes mezclas de ketoconazol / HP- β -CD.
- FIGURA 9.** Espectros IR de las diferentes mezclas de ketoconazol / HP- β -CD.
- FIGURA 10.** Termogramas de las diferentes mezclas de ketoconazol / HP- β -CD.
- FIGURA 11.** Espectro de UV del ketoconazol.
- FIGURA 12.** Espectro de UV de la HP- β -CD.
- FIGURA 13.** Espectro de UV del complejo formado por mezcla física.
- FIGURA 14.** Espectro de IR del ketoconazol
- FIGURA 15.** Espectro de IR de la HP- β -CD.
- FIGURA 16.** Espectro de IR del complejo formado por mezcla física.
- FIGURA 17.** Termograma del ketoconazol
- FIGURA 18.** Termograma de la HP- β -CD.

FIGURA 19. Termograma del complejo formado por mezcla física.

FIGURA 20. Diagrama de solubilidad de fase del complejo por mezcla física de ketoconazol e HP- β -CD.

FIGURA 21. Diagrama de solubilidad de fase comparativo entre ketoconazol y el complejo de inclusión.

FIGURA 22. Diagrama de solubilidad de fase del ketoconazol a pH 2, pH 4 y pH7.

FIGURA 23. Diagrama de solubilidad de fase del complejo de inclusión a pH 2, pH4 y pH7.

INTRODUCCIÓN

La investigación en el área farmacéutica se ha enfocado a mejorar las propiedades físicas, químicas y de biodisponibilidad, así como la estabilidad de los medicamentos ya existentes. Un ejemplo lo representan el uso de las ciclodextrinas en la industria farmacéutica debido a su gran potencial de aplicación, ayudando a resolver problemas de solubilidad.

Los fármacos administrados por las diferentes vías pueden ser complejados, con ello se modifican sus propiedades físicas y químicas. También se incrementa 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 así la posibilidad de reducir la dosis e incrementar la eficiencia terapéutica.

Las ciclodextrinas son moléculas constituidas por 6 unidades de D-glucosa (alfa-ciclodextrina), siete (beta-ciclodextrina) u ocho (gamma-ciclodextrina). Una ciclodextrina admite en su interior lipofílico una molécula no polar como huésped, el acomodo depende de la polaridad, así como del tamaño de la ciclodextrina que en particular se use. El exterior hidrófilo del complejo que resulta le confiere solubilidad en agua. Debido a estas características esta se pueden formar complejos de inclusión con diversas moléculas.

Casi todas las aplicaciones de las ciclodextrinas involucran la formación de complejos de inclusión ; estos son relativamente estables y pueden separarse en forma más o menos pura como sustancias cristalinas que se aprovechan directamente.

El ketoconazol es un antimicótico usado en infecciones sistémicas y posee baja solubilidad. En estos pacientes los efectos secundarios se ven acentuados ya que deben consumir el medicamento por tiempo prolongado para alcanzar su nivel de actividad. Debido a lo anterior se han realizado diversos estudios que han revelado que el ketoconazol presenta un elevado nivel de irritabilidad gástrica, aunado a su potencia antimicótica en dosis de 200 a 600mg/día.

El objetivo del presente trabajo es mejorar la solubilidad del ketoconazol, frente a micosis sistémicas que requieren consumir el medicamento por tiempo prolongado, mediante la formación de un complejo de inclusión de ketoconazol con HP- β -CD, en 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 de complejo y la constante de formación del mismo. De los resultados obtenidos se determinaron las cantidades para formar un complejo por mezcla física, elegido después de realizar un estudio comparativo entre diversos métodos. El producto obtenido y las materias primas se caracterizaron utilizando las técnicas espectroscopia de la región ultravioleta(UV), espectrofotometría infrarroja (IR) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Se realizó una comparación de la solubilidad entre el complejo y el fármaco sin complejar. Obteniéndose los valores de 268.4118mg/10mL para el complejo y 201.0440mg/10mL para el fármaco sin complejar; observándose un aumento en la solubilidad del ketoconazol. En los espectros de las técnicas utilizadas se observan cambios significativos.

Es posible, con los resultados obtenidos, que al aumentar la solubilidad se reduzca la irritabilidad gástrica del ketoconazol beneficiando a los pacientes que consumen este medicamento por períodos prolongados.

1. MATERIAS PRIMAS

1.1. KETOCONAZOL

1.1.1. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

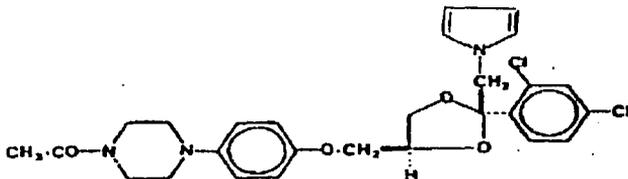


FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL KETOCONAZOL

- a) Nombre común : KETOCONAZOL
- b) Nombre químico : Cis-1-acetil-4-(4-((2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ilmetil)-1,3-dioxalan-4-il) metoxifenil)piperazina.
- c) Fórmula condensada : C₂₆H₂₈Cl₂N₄O₄
- d) Peso molecular : 531.4 g/mol.
- e) Punto de fusión : 146 °C.
- f) Apariencia : Polvo blanco o ligeramente amarillo, libre de materia extraña.
Soluble en cloroformo, metanol, ácido clorídrico diluido, casi insoluble en agua, ligeramente soluble en éter.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

g)Espectro UV: Medio ácido acuoso a 269 nm ; medio alcalino acuoso 287 nm ; metanol a 244nm.

h)Espectro de IR: Los principales picos se observan a en la bandas de 1507 ,1640,1258,1200,1221 cm^{-1} .

1.1.2. GENERALIDADES

El ketoconazol es un derivado imidazólico que interfiere en la formación del esteroide de la membrana plasmática del hongo. Es muy eficaz en la candidiasis mucocutánea crónica, dermatofitosis antimicótico y en las infecciones fúngicas sistémicas leves como la histoplasmosis y la blastomicosis. (1, 2)

Este antimicótico sintético inhibe el desarrollo de los hongos al bloquear la biosíntesis de los lípidos micóticos, en especial el ergosterol en las membranas celulares y tal vez por medio de otros mecanismos.

También se ha encontrado que se usa como antiandrógeno, inhibiendo la síntesis de glucocorticoides y andrógenos en glándulas suprarrenales, se demostró que inhibe la enzima del ovario humano, se ha usado en forma experimental para tratar el hirsutismo en mujeres y el carcinoma prostático en varones. Los varones tratados con ketoconazol a menudo desarrollan ginecomastia, reversible durante su administración, esta puede deberse al incremento demostrado de la porción estradiol: testosterona. (1, 3, 4)

1.1.3. INDICACIONES TERAPÉUTICAS.

Las tabletas están indicadas en infecciones de la piel, pelo y uñas inducidas por dermatófitos y/o levaduras, cuando éstas infecciones no pueden ser tratadas tópicamente por el sitio o extensión de la lesión o profundidad de la afección de la piel, o si han fallado en responder a la terapia tópica. Los óvulos están indicados en el tratamiento local de candidiasis vulvovaginal aguda o crónica. La crema está indicada para la aplicación tópica en el tratamiento de las infecciones ya mencionadas. (3)

1.1.4. FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA.

Es un antimicótico de amplio espectro que actúa eficazmente contra una amplia variedad de dermatófitos, levaduras (*Candida*, *Pityrosporum*, *Torulopsis*, *Cryptococcus*), hongos dimorfos, hongos diversos y eumicetos.

La disolución del Ketoconazol requiere de un medio ambiente ácido, se absorbe por todas las vías incluyendo la digestiva, y en el hombre se produce el pico de concentración plasmática alrededor de las 2 horas, después de la ingestión y con la dosis de 200mg, donde alcanzan niveles plasmáticos medios de 3.5 μ g/mL en la primera o segunda hora post-administración oral. (2,3,5)

La eliminación depende de la dosis, la vida media es de unos 90 minutos después de una dosis de 200mg; pero aumenta a casi 4 horas cuando se administran 800 mg. En la orina aparece una mínima cantidad de droga inalterada.

Después de la absorción del ketoconazol por el tubo digestivo es convertido en varios metabolitos inactivos. Los principales caminos metabólicos identificados son oxidación y degradación de los anillos imidazólico y piridínico, dealquilación oxidativa e hidroxilación aromática. Aproximadamente el 13% de la dosis se excreta por la orina, y del 2% al 4% no presenta cambios. La principal ruta de excreción es la biliar.

La unión *in vitro* a proteínas es de 99% principalmente a albúmina. Una insignificante proporción de ketoconazol llega al líquido cerebroespinal. Ketoconazol es un agente básico y por ello requiere de un medio ácido para su disolución y absorción.

1.1.5. DÓISIS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN.

Los adultos en infecciones de la piel, gastrointestinales e infecciones sistémicas, deben tomar 200 mg una vez al día con los alimentos. Cuando la respuesta obtenida con esta dosis no sea la adecuada, esta deberá incrementarse a 400 mg una vez al día. (6)

Para los niños de menos de 15 kg la dosis será de 20 mg , tres veces al día con los alimentos. Los niños entre 15 y 30 kg , 100 mg una vez al día con los alimentos. Niños de más de 30 kg, se aplica la dosis para adultos. La duración del tratamiento para infección en uñas va desde 6 a 12 meses y para infecciones del cabello de 1 a 2 meses. (6)

1.1.6. CONTRAINDICACIONES.

No debe de ser administrado a pacientes con enfermedad hepática aguda o crónica o con hipersensibilidad conocida a los componentes de la fórmula.

Está contraindicada la administración de ketoconazol con los siguientes medicamentos: terfenadina, astemizol, cisaprida, triazolam, midazolam oral, quinidina.

Disminución de la acidez gástrica:

La absorción se ve perjudicada cuando se disminuye la acidez gástrica. En pacientes que también reciben medicamentos que neutralizan la acidez gástrica estos deben de ser administrados por lo menos 2 horas antes de la toma del ketoconazol. En pacientes con aclorhidria, VIH y supresores de la secreción ácida es aconsejable administrar el ketoconazol con bebidas de cola. (7)

Es importante advertir al paciente en tratamiento crónico con ketoconazol, de síntomas de daño hepático como fatiga anormal, fiebre, orina oscura, heces pálidas o ictericia. Los factores que incrementan el riesgo de hepatitis son: mujeres de más de 50 años, antecedentes de daño hepático, intolerancia

conocida al medicamento, tratamiento a largo plazo y uso concomitante de medicamentos que afectan al hígado. (7)

Una evaluación sobre el riesgo/beneficio deberá realizarse antes de utilizar ketoconazol en enfermedades que no ponen en peligro la vida y que requieren tratamientos por periodos prolongados.

1.1.7. REACCIONES SECUNDARIAS Y ADVERSAS.

Las reacciones adversas más frecuentes reportadas en asociación con el uso de ketoconazol fueron de origen gastrointestinal, como dispepsia, náusea, dolor abdominal y diarrea. Reacciones adversas reportadas menos frecuentes incluyen cefalea, incremento reversible de las enzimas hepáticas, trastornos menstruales, vértigo , fotofobia, parestesia y reacciones alérgicas. Reacciones adversas reportadas con muy baja frecuencia son: trombocitopenia, alopecia, impotencia e incremento reversible de la presión intercraneal.

Con dosis mayores que la dosis terapéutica recomendada de 200 a 400mg diarios se han reportado casos aislados de ginecomastia y oligospermia reversibles. Con dosis de 200 mg una vez al día, se puede observar una disminución transitoria de los niveles de testosterona en plasma que se normalizan dentro de las 24 horas después de la administración de ketoconazol. En tratamientos a largo plazo a esta dosis, los niveles de testosterona no son significativamente distintos de los controles. (6,8)

1.2. HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA.

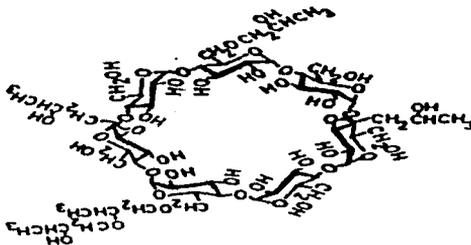


Figura 2. estructura química de la HP- β -CD

1.2.1. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS.

a) Nombre químico : 2- Hidroxipropil-beta-ciclodextrina

b) Fórmula condensada : C₄₅H₇₇O₃₆

c) Peso molecular : 1193 g/mol.

d) Obtención : La β -ciclodextrina se hidroxila para formar la HP- β -CD. La sustitución puede ser en las posiciones 1, 2 ó 3.

e) Apariencia : Es un polvo amorfo blanco .

f) Solubilidad : Más de 500mg/mL en agua a temperatura ambiente; en proporción de más del 75% v/v puede ser usado. Soluble en etanol en una solución 50-60% de etanol (al 95%). La solubilidad en metanol y etanol se ve favorecida al formar complejos con algunos fármacos.

g) Dosis máxima : No es tóxica después de una administración oral, en dosis menores a 500mg/Kg ; y por vía intravenosa en soluciones al 5% durante 4 días.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2.2. CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES DE LA HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA

La HP- β -CD es un derivado de la ciclodextrina y recientemente ha sido incorporado a las formulaciones usadas por animales y humanos. Este compuesto presenta pocas reacciones adversas reportadas. Al formar complejos con la HP- β -CD se incrementa la solubilidad del fármaco linealmente. Puede formar complejos con fármacos de peso molecular alto, debido a los grupos sustituidos. Las propiedades que proporcione al formar un complejo dependerán del fármaco del que se trate. 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. La HP- β -CD posee cavidades en las cuales dado el peso molecular del ketoconazol este puede entrar y formar el complejo. Dadas las interacciones y la polaridad de ambos estos es posible. (9, 10)

1.2.3. TOXICIDAD

Administrado por vía parenteral a humanos en dosis de 0.5g/kg/día IV como solución en agua al 5% y por vía oral se administró a 4 sujetos (3 hombres y 1 mujer) una dosis de 100mg en tableta sublingual. Después de la administración no se observaron efectos adversos significativos por ninguna de las vías de administración. (10, 11)

En estudios de toxicidad crónica sistémicos y subcutáneos la HP- β -CD se observaron alteraciones después de la administración de 200mg/kg en algunas ratas y monos. Al administrar las dosis de 15g/kg y 10g/kg respectivamente a los animales del experimento, la dosis no fue letal para los monos. (11)

La HP- β -CD no es tóxica después de una administración oral, parenteral e intravenosa para diferentes especies. La solución de HP- β -CD no irrita los ojos de los conejos al aplicarse sobre estos, no irrita la piel de los humanos, ni afecta el cerebro al ser inyectado en los animales estudiados.

La dosis máxima administrada de HP- β -CD en humanos fue de 500mg/kg, en forma continua en una solución acuosa al 5% para un individuo en 4 días de tratamiento. No se reportaron efectos adversos durante estos cuatro días, ni después que se siguió con la observación. (11, 12)

2. FORMACIÓN DE COMPLEJOS CON HP- β -CD

2.1. FUNDAMENTACIÓN

Un complejo surge a partir de dos especies unidas mediante un enlace no covalente y presenta una estequiometría sustrato ligando definida. Donde el sustrato es la especie que interactúa y cuyas propiedades físicas o químicas serán observadas experimentalmente, siendo el ligando la molécula que interactúa con el sustrato y cuya concentración será la variable independiente en el proceso experimental de formación del complejo. Así mismo el sustrato va a ser incluido en la cavidad de la molécula del ligando sin afectar la estructura de éste. Una característica importante del ligando es la capacidad para formar una estructura con espacios libres cuyas dimensiones permitirán la inclusión de otra molécula. (8, 12)

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. Dadas las características de la hidroxipropil- β -ciclodextrina, ésta puede interactuar con una gran cantidad de moléculas. Casi todas las aplicaciones de las ciclodextrinas involucran la formación de complejos de inclusión; estos son relativamente estables y pueden separarse en forma más o menos pura como sustancias cristalinas, que se aprovechan directamente, por ejemplo: complejos de fármacos y saborizantes.

2.2. REQUERIMIENTOS PARA FORMAR UN COMPLEJO

Existen una serie de factores técnicos que van a limitar la formación de complejos. Los requisitos principales se deben cumplir son los relacionados a las propiedades del fármaco, los cuales van a determinar la estabilidad y demás propiedades del complejo formado.

Estos requisitos son :

- a) Solubilidad del fármaco: debe ser menor a 10mg/mL
- b) El punto de fusión debe ser menor de 250°C
- c) La estructura debe estar formada por no más de 5 anillos condensados

También se debe de considerar la geometría de la molécula, ya que estas características químicas son un factor decisivo para determinar que tipo de moléculas pueden penetrar en la cavidad de la HP-β-CD, la molécula que va a penetrar debe ser compatible con las dimensiones de su cavidad. Es posible la formación de complejos con moléculas significativamente más grandes que la cavidad de la ciclodextrina, sólo que únicamente grupos penetran en ella.

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 la molécula también son determinantes. (13)

2.2.1. POLARIDAD Y GEOMETRÍA DE LA MOLÉCULA

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, es difícil formar el complejo o sólo se forma parcialmente. De lo anterior se deduce que sólo las moléculas con una polaridad menor que el agua se pueden complejar satisfactoriamente con ciclodextrinas. Una ciclodextrina admite en su interior lipófilico una molécula no polar como huésped ; obviamente la bondad del acomodo de la molécula huésped depende de su tamaño y polaridad, así como del tamaño de la ciclodextrina particular que se use.

Una medida de 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 estables por lo que 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 en ocasiones se favorece la formación de los complejos. El exterior hidrofílico del complejo le confiere solubilidad en agua. Estas características son las que le permiten a las ciclodextrinas formar complejos de inclusión, que son la base del encapsulamiento molecular. (14)

2.2.2. MEDIOS DE PREPARACIÓN.

Para preparar complejos en ocasiones, no es necesaria la presencia de solventes para formar un complejo, basta mezclar los polvos de la sustancia a incluir con la HP- β -CD. 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 sólo débilmente complejadas; siendo las parcialmente solubles las preferidas para la complejación. (11, 15)

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 usar solventes de bajo peso molecular, tales como metanol, etilenglicol, glicerina, etc., la gran mayoría de los solventes orgánicos no pueden ser empleadas pues existe la posibilidad de que se formen complejos estables con las ciclodextrinas, como piridina y tolueno. En algunos casos los residuos de solvente no pueden ser removidos pues forman parte integral del producto apareciendo como un complejo entre el solvente y la ciclodextrina. Esto generalmente ocurre con el etanol del 0.01% al 2% del solvente puede formar complejo. Las moléculas muy poco solubles en agua, no se pueden complejar a ninguna concentración o ningún tiempo, sin el empleo de un solvente orgánico. La presencia de solventes deshidratantes 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 en muchos casos es lenta y después del secado se forman hojuelas duras que es necesario pulverizar mecánicamente. (16)

Un factor muy importante a considerar es el pH del medio, ya que de éste dependerá el grado de ionización de una molécula, lo que se ve reflejado al formarse un complejo con máxima estabilidad. Para algunos principios activos se ha observado que la constante de máxima estabilidad de los complejos se encuentra cerca al valor de pka. 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. (10, 17)

2.2.3. FUERZAS DE INTERACCIÓN.

Se cree que los complejos anfitrión-huésped se forman gracias a las interacciones hidrofóbicas y dipolo-dipolo, así como a la acción de las fuerzas de Van der Waals y enlaces de hidrógeno. Por eso, es necesario saber cuales son las fuerzas de interacción presentes, ya que se requieren para que establezcan o den la posibilidad que la interacción persista. En este proceso se requiere favorecer con energía a las moléculas, dadas las características hidrofóbicas de la cavidad de la HP- β -CD. Dependiendo de las características del sustrato, son las fuerzas involucradas, resultado de diversos efectos tales como :

- 1) Que moléculas de sustrato sustituyan a las del agua, para favorecer energéticamente la interacción apolar-apolar.

- 2) Fuerzas de Van der Waals entre el ligando y el sustrato.
- 3) Establecimiento de puentes de hidrógeno.
- 4) Contribución de la energía liberada en la relajación del anillo de la HP- β -CD.

Estos factores pueden involucrarse dependiendo del medio de preparación. La estabilidad de un complejo aumenta proporcionalmente a la basicidad del sustrato, ya que las cavidades de la HP- β -CD actúan como base de Lewis.

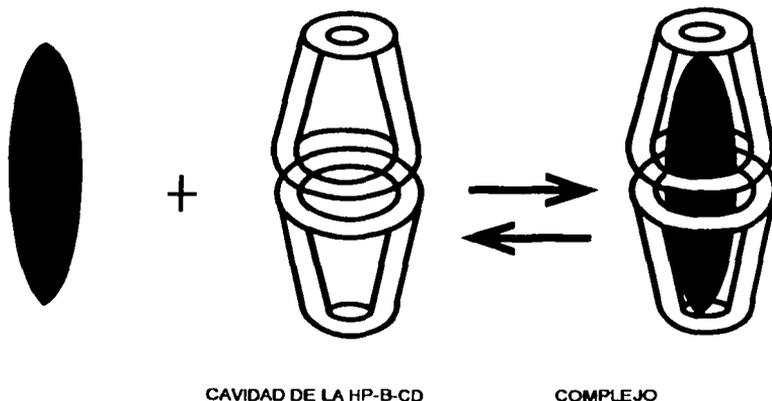


FIGURA 3. Representación del proceso de complejación

2.3. MÉTODOS DE FORMACIÓN DE COMPLEJOS.

La formación de complejos de inclusión puede realizarse en fase sólida, en solución y por otros métodos.

2.3.1. MÉTODO DE COPRECIPITACIÓN (PREPARACIÓN EN SOLUCIÓN)

Este método se utiliza para formar complejos en solución, es importante destacar que el solvente que se utiliza puede formar el complejo solvente- ciclodextrina. La mezcla sustrato - HP-β-CD (1 :1) se disuelve en etanol al 50% el solvente se evapora y se deja secar a una temperatura de 50°C durante 24 horas. Con este método no deben emplearse altas concentraciones de fármaco y de HP-β-CD dado que es posible la precipitación de los cristales puros. (9, 10)

2.3.2. MÉTODO AMASADO

Este método es usado cuando el fármaco es poco soluble en agua. 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 (19)

Una solución acuosa de etanol al 50% se adiciona a la mezcla de sustrato/HP-β-CD (1 :1) hasta que se obtenga un producto en crema y sea homogénea. Esta mezcla se transfiere a un mortero y se amasa por 15 minutos después se seca en una estufa a 50°C y se obtiene el proceso completo. (9)

La pasta que se forma por este proceso se amasa mecánicamente por un periodo de 2 a 4 horas, después se deja secar para ser pulverizada nuevamente y obtener un polvo. Con este método se tiene la ventaja de recuperar alrededor del 98% de sustancia complejada.

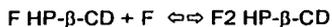
2.3.3. MÉTODO DE PREPARACIÓN EN FASE SÓLIDA (MEZCLA FÍSICA)

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 HP- β -CD con algunos fármacos realizando únicamente un proceso de molienda en seco o simplemente un mezclado físico. (9) Estos procedimientos son muy similares; se mezclan las cantidades estequiométricas establecidas y se realiza (dependiendo del proceso que desea seguir) un proceso de mezclado por volteo, vibración, etc, o molienda de la mezcla en un molino Braun, que es el equipo adecuado. (15)

2.4. ESTABILIDAD

En el caso de los complejos formados con HP- β -CD, cualquier efecto que se origine en un principio activo a consecuencia de su formación depende directamente de la constante de estabilidad. A su vez esta se encuentra en función de las especies en solución y la relación estequiométrica que establezcan entre sí. (20)

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 :



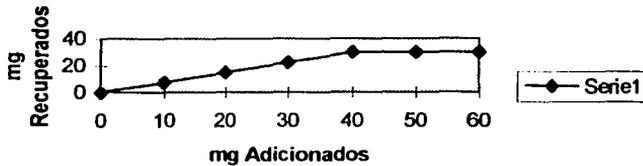
Donde F=indica a los fármacos

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

Al reportar el valor de la constante de estabilidad y para que este no sea ambiguo, debe indicarse la temperatura y el pH, ya que este valor se ve afectado por ambos factores. (20, 21)

2.4.1.SOLUBILIDAD

El método de solubilidad es una de las técnicas existentes para determinar la constante de estabilidad de un complejo. Si 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 este, es utilizado como criterio de identificación y pureza.

Diagrama de solubilidad de fase típico**FIGURA 4.** Diagrama de solubilidad de fase

Para determinar experimentalmente esta solubilidad, se colocan sucesivas y crecientes cantidades de fármaco en diferentes ampollitas de vidrio a las que se les adiciona un volumen constante de solvente en el cual es solo ligeramente soluble; se llevan los sistemas a equilibrio por agitación prolongada y a temperatura constante. Se analizan las soluciones sobrenadantes y se calcula el contenido total de soluto. Se traza un diagrama de solubilidad de fase, representando la cantidad de fármaco encontrado en solución por unidad de volumen en función de la cantidad de fármaco añadido. La gráfica implica que a lo largo del segmento ascendente todo el fármaco se encuentra disuelto, siendo la pendiente igual a uno ($m=1$). 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. La extrapolación al eje Y determina la solubilidad máxima del fármaco. Es importante determinar con exactitud este valor, ya que se emplea en la determinación del valor de la constante. (16, 20)

El procedimiento experimental para calcular el valor de la constante consiste en determinar la solubilidad molar total del fármaco en función de la concentración molar total de HP- β -CD a una temperatura y fuerza iónica constante. Estos se realiza preparando varias ampollas que contengan una cantidad igual de fármaco en considerable exceso a su solubilidad, se les adiciona un volumen fijo de solvente el cual contiene diferentes concentraciones de HP- β -CD 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 ó 2 semanas. Después se analiza la fase en solución para determinar la concentración total del fármaco sin importar el estado molecular en que el fármaco se encuentre. (20)

Cuando se grafica la premisa básica (cantidad de sustrato adicionada vs. Cantidad de sustrato recuperada) si se observa un incremento en la solubilidad, se debe a que se formó un complejo soluble. La presencia de fármaco adicionado en exceso durante todo el estudio, asegura que el potencial químico, la actividad del fármaco libre en solución y la concentración es una constante. Si esto se cumple se observa un comportamiento lineal de 1er orden en función de la concentración molar total de ciclodextrina. En algunos fármacos se observa desviación del comportamiento lineal cuando la solubilidad del fármaco se incrementa más rápidamente que la concentración de la ciclodextrina o viceversa. En este caso la estequiometría sustrato ligando no es constante. (20, 21)

Un incremento lineal se observa cuando a medida que aumenta la concentración de la ciclodextrina, aumenta la solubilidad del fármaco hasta un límite. (20)

2.4.2.CONSTANTE DE ESTABILIDAD

Tomando en consideración el tipo de diagrama obtenido en el estudio de solubilidad de fase, se asume que se formó un complejo con estequiometría (1 :1); las expresiones para el balance de masa (considerando las especies presentes durante la experimentación) son :

a)Para el fármaco

$$St=S +SL$$

b)Para la HP-β-CD

$$Lt= L + SL$$

St= concentración total del fármaco

S= concentración del fármaco libre

Lt= concentración total de la HP-β-CD

SL= Concentración del fármaco complejoado

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 determinada sin la presencia de la HP-β-CD, es sustraída de la concentración total del fármaco (**St**) y se divide entre la concentración total de la HP-β-CD (**Lt**). Al interpretar un diagrama de solubilidad debe de 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 del complejo.

Para calcular a la pendiente, se utiliza la siguiente ecuación:

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

Donde Y_2 es la concentración máxima, Y_1 la concentración del fármaco en una solución saturada sin presencia de HP-β-CD que es igual al valor obtenido por el intercepto, X_2 como la concentración total de la HP-β-CD y X_1 como cero.

Expresando en función de la constante de equilibrio :

$$K_{eq} = \frac{m}{S(1-m)}$$

Donde m es el valor de la pendiente ; S es la concentración de fármaco libre y K_{eq} es la constante de equilibrio.

2.5.MÉTODOS PARA EVALUAR LA FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS

Frecuentemente es posible encontrarse ante compuestos que no se pueden complejar o que lo pueden hacer en solución pero no en estado sólido. Dado que es posible que el producto obtenido en el proceso de preparación en solución, sea solamente una mezcla finamente dispersada del sustrato e HP-β-CD, o en otros casos una mezcla de sustrato no complejoado e HP-β-CD hidratada sin complejar ; es necesario determinar la cantidad de sustrato complejoado en el producto obtenido, basándose en los cambios que se presenten en las propiedades de la sustancia complejada. Dentro de los cambios más fácilmente observables son los que ocurren en los espectros de UV, así como de sus propiedades cromatográficas y de reactividad. Estos cambios se toman como indicativos de una complejación. (20,22)

2.5.1. ESPECTROSCOPIA DE LA REGIÓN ULTRAVIOLETA

La región de UV es de 200-400nm; se determina el espectro de absorción midiendo la absorbancia o transmitancia de una solución en función de la longitud de onda o frecuencia de luz. Donde $a = A/bc$.

*A= absorbancia C= concentración en g/l, a=absortividad en l/g x cm-1, b=longitud de la cubeta en cm

En cuanto al análisis por UV, se infiere una complejación cuando existen cambios en la longitud de onda o en el coeficiente de extinción, de los valores obtenidos. Para la determinación del contenido de sustrato es aconsejable que el complejo se disuelva en etanol al 50% y diluirlo posteriormente en etanol puro.

Por esta técnica la cantidad de sustrato que es cuantificado puede estar total o parcialmente complejoado 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 ensanchamiento de la banda de absorción, así como un cambio considerable en la intensidad de la absorción con aumento de la concentración de HP- β -CD. (20, 23)

2.5.2. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

Una sustancia presenta un comportamiento térmico específico. Los cambios de fase se realizan por absorción o liberación de calor a temperaturas precisas y características de la sustancia estudiada.

Las técnicas termoanálíticas son recursos útiles para evaluar la verdadera complejación, debido a que estas técnicas se basan 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 la técnica DSC se ha observado que después de realizar los termogramas característicos de diferentes compuestos, existe la completa desaparición de los picos asignados a la evaporación, fusión, descomposición, etc., permaneciendo únicamente las características de la HP- β -CD . Este comportamiento es atribuido a una verdadera complejación. (20,24)

2.5.3. ESPECTROFOTOMETRIA INFRARROJA

La espectrofotometría infrarroja es la técnica empleada para caracterizar sustancias orgánicas sólidas y líquidas, se utiliza para asegurar la formación de complejos, complementando a otras técnicas. Dado que las bandas de la HP- β -CD sólo cambian ligeramente cuando se forma un complejo. Sin embargo cuando ya se ha evaluado la complejación por alguna otra técnica, el cambio en la intensidad y en 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. (20, 22, 23)

3. APLICACIONES GENERALES DE LA HP- β -CD

Casi todas las aplicaciones de las ciclodextrinas involucran la formación de complejos de inclusión ; estos son relativamente estables y pueden separarse en forma más o menos pura como sustancias cristalinas que se aprovechan directamente. El empleo de las ciclodextrinas en la industria farmacéutica se debe a su gran potencial de aplicación, ayudando a resolver problemas difíciles a bajo costo.

3.1. APLICACIÓN EN EL ÁMBITO FARMACÉUTICO.

Los fármacos administrados por las diferentes vías pueden ser complejados, modificándose sus propiedades físicas y químicas.

Los complejos en el área farmacéutica pueden ser utilizados para :

- Enmascarar o eliminar sabores y olores desagradables, disminuyendo a su vez la incompatibilidad fármaco-excipientes.
- Favorecer la estabilidad física y química de principios activos que son fácilmente oxidables o hidrolizables, o que se descomponen en presencia de la luz.
- 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 así la posibilidad de reducir la dosis.
- Reducir la hidrofobicidad del fármaco.

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 incremento en la actividad terapéutica. Finalmente la irritación local inducida por el consumo de un fármaco puede ser reducida. (16, 25, 26)

3.1.1. INCREMENTO DE LA SOLUBILIDAD.

Al formar un complejo con un fármaco poco soluble, las moléculas de este son aisladas una de otra, desintegrándose 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, incrementándose la posibilidad de 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 sólo 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. Si la velocidad de absorción permanece constante, al aumentar la solubilidad, los niveles plasmáticos se incrementarán proporcionalmente.

La concentración plasmática obtenida de la administración del fármaco depende de la concentración en el fluido gastrointestinal, lo que a su 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 tan elevado como para asegurar una alta concentración del 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 del 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. También se comprobó que cuando se adiciona la HP-β-CD por separado no existe cambio en el comportamiento del fármaco. (11, 13, 18, 25)

Los resultados sugieren que la complejación con HP-β-CD es un medio efectivo para incrementar la biodisponibilidad, siendo con esto posible el empleo de una dosis menor, que traiga consigo menores efectos secundarios.(17,18)

3.1.2. EFECTO EN LA ESTABILIDAD FÍSICA Y QUÍMICA.

Los efectos en la estabilidad física y química reportados son: 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 la características organolépticas de los fármacos. (26, 27)

3.1.3. DISMINUCIÓN DE LOS EFECTOS ADVERSOS

La complejación cambia las propiedades físicas y químicas de un fármaco, debido a ello es de esperarse que los efectos adversos se vean disminuidos. El complejo es menos tóxico que el fármaco sólo, en algunos fármacos el efecto adverso más común es la irritación gástrica, que se ve disminuida al complejarse. Específicamente la HP- β -CD, es de las ciclodextrinas con menor toxicidad. (12, 27)

3.1.4. EN FORMULACIONES

En los últimos años se ha empleado como excipiente en la fabricación de tabletas de compresión directa. (28) También es muy factible utilizar la HP- β -CD en formulaciones de inyectables ya que al aplicarse por vía parenteral o intravenosa no presenta efectos nefrotóxico a diferencia de β -CD que es muy tóxica. Favorece la disponibilidad al formar un complejo, ya que se vuelve más soluble. (30) Los complejos formados con la HP- β -CD se usan en sprays nasales, preparaciones transdérmicas, supositorios y óvulos. (27, 28, 29)

3.2. INDUSTRIA COSMÉTICA

En esta área encontramos una variedad de aplicaciones, ya que se pueden utilizar desde la formulación de fragancias, hasta en cremas o champús. La aplicación está encaminada a complejar esencias con la finalidad de estandarizar y mejorar la estabilidad al evitar la adsorción de agua. (28)

En la elaboración de cosméticos puede sustituirse el empleo de almidón por la HP- β -CD, evitando el crecimiento de microorganismos y el empleo de conservadores, incrementando a su vez la estabilidad del producto.

3.3. INDUSTRIA ALIMENTICIA Y BIOTECNOLÓGICA

En el área alimenticia está enfocada a la complejación de saborizantes. En los procesos microbiológicos y enzimáticos de interés farmacéutico, se ha observado que la presencia de la HP- β -CD, favorece la solubilidad del sustrato, por lo que se incrementa el rendimiento del proceso, obteniendo productos de mejor calidad.

Una de las aplicaciones de la HP- β -CD en el ámbito biotecnológico es en la obtención de pieles; aquí se han empleado antibióticos para prevenir la contaminación, que antes de ser adicionados con HP- β -CD tenían poco efecto ya que eran poco solubles e inestables, lo cual se ve favorecido al formar complejos de inclusión.

En los procesos biotecnológicos la HP- β -CD actúa como 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 redituable. (28, 30,

31)

3.4. INDUSTRIA AGROQUÍMICA

La HP- β -CD es usada en formulaciones herbicidas, fungicidas e insecticidas biodegradables. La función de la HP- β -CD es estabilizar o efectuar la liberación de ingredientes activos. Al emplear la liberación controlada, las cantidades empleadas se pueden reducir.

Los insecticidas por lo general son altamente hidrofóbicos, y se ha observado que pueden aumentar su grado y velocidad de disolución cuando son complejadas con HP- β -CD. El olor desagradable de los insecticidas se elimina al complejarse con la HP- β -CD, sin perderse su actividad. Se ha comprobado que la estabilidad, de los complejos que se forman entre la HP- β -CD y los insecticidas, aumenta considerablemente; dado que su descomposición por oxidación, calentamiento o fotólisis se ve retrasada. (12, 31, 32)

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ketoconazol es un antimicótico usado en infecciones sistémicas y posee baja solubilidad ; debido a ello el tratamiento dura algunos meses. Por lo anterior, se han realizado diversos estudios revelan que el ketoconazol presenta un elevado nivel de irritabilidad gástrica, aunado a su potencia antimicótica en dosis de 200 a 600mg/día. Dicha irritabilidad se incrementa ya que la dosis es administrada durante un tiempo prolongado que se emplea para alcanzar su nivel de actividad.

La HP- β -CD es la molécula ideal para formar un complejo con el ketoconazol debido a sus características fisicoquímicas - punto de fusión, geometría y estructura de la molécula, polaridad, solubilidad del fármaco y peso molecular-.

Por lo anterior y de acuerdo a las características del ketoconazol se tratará de formar el complejo con HP- β -CD por diferentes métodos , para incrementar la solubilidad del fármaco.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Formar el complejo de inclusión de ketoconazol con HP- β -CD, empleando diferentes métodos para ello y caracterizarlos utilizando las técnicas UV, IR y DSC, para incrementar la solubilidad del ketoconazol.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Tipificar las propiedades físicas del ketoconazol y de la HP- β -CD usando las técnicas UV, IR y DSC.
- Preparar complejos utilizando los métodos de amasado, mezcla física y coprecipitado, determinado las condiciones óptimas de formación del complejo.
- Realizar las pruebas de identificación a los complejos mediante las técnicas analíticas mencionados y elegir el complejo en el que se ve favorecida la solubilidad.
- Evaluar la solubilidad del fármaco complejoado con respecto a la solubilidad del fármaco sólo.

6. HIPÓTESIS

De acuerdo con las características de peso molecular, solubilidad, geometría de la molécula y punto de fusión del ketoconazol y las propiedades de la HP- β -CD se espera que se forme el complejo por el método de mezcla física incrementando del 20% al 30% la solubilidad del ketoconazol.

7. MATERIAL

- Ampolletas de vidrio transparente de 10mL marca vitro
- Pipetas volumétricas de 1mL y 5mL de las marcas Pyrex y Kimax
- Bureta de 25mL Pyrex
- Pinzas para bureta
- Soporte universal
- Tubos para centrifuga
- Gradillas
- Mortero con pistilo
- Vasos de precipitados de 100,250 y 500mL Kimax
- Matracas volumétricos de 10 y 100 mL Kimax y Pyrex
- Vidrio de reloj
- Agitadores de vidrio

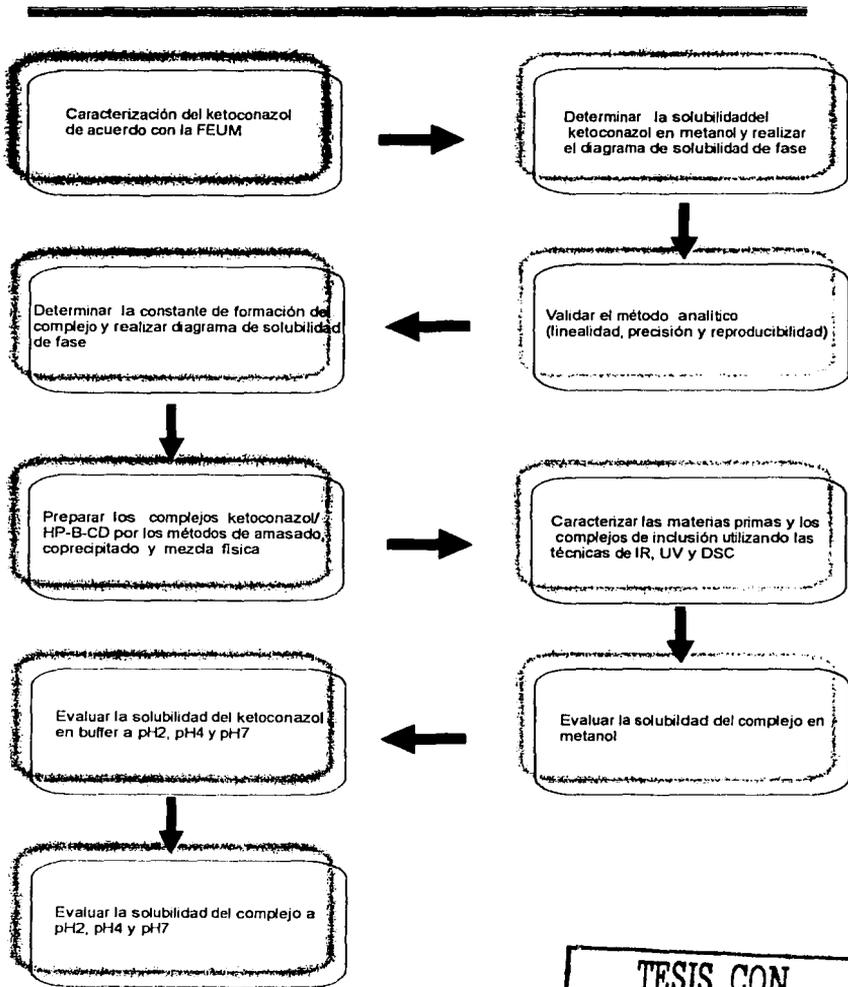
7.1. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Espectrofoóometro UV/VIS Perkin Elmer Lambda 2
- Espectrofotómetro de infrarrojo marca Perkin Elmer
- Calorímetro diferencial de Barrido Perkin Elmer DSC 7
- Disolutor de liberación prolongada ELECSA
- Balanza analítica OHAUS
- Balanza Analítica Sartorius 1602MP

7.2. REACTIVOS

REACTIVOS	PROVEEDOR	GRADO
Ketoconazol	Nutrer	pureza 100.05%
Metanol	J.T. Baker	reactivo
HP- β -CD	HELM de México	pureza 98.4%
Etanol	J.T. Baker	reactivo
Acido clorhídrico	J.T. Baker	reactivo
Agua destilada	Planta piloto de la FES-Zaragoza	

8. METODOLOGÍA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.1. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DEL KETOCONAZOL EN METANOL

Se pesaron cantidades de 50,100,150,200,250 y 300 mg de ketoconazol por triplicado colocándose en ampolletas de vidrio. Se adicionaron 10mL metanol a cada una y se sellaron.

Las 18 ampolletas se colocaron en el sistema de agitación (disolutor ELECSA de liberación prolongada) a 50 rpm durante 36 horas a 25°C. Se centrifugó el contenido de cada ampolleta a 2000 rpm durante 5 minutos. Del sobrenadante se tomó 1 mL aforándose a 10mL. , de está solución se tomó 1mL y se aforó nuevamente a 10 mL. Finalmente se tomó un 1 mL para diluir a 10mL empleando metanol en todas las diluciones, obteniendo una concentración de 5,10,15,20,25 μ g. Cada muestra se leyó en el rango del ultravioleta de 200 a 300nm empleando metanol como blanco, en celdas de 1cm de longitud de paso. El procedimiento se realizó por triplicado.

8.2. DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE FORMACIÓN DEL COMPLEJO PREPARACIÓN DE UNA SOLUCIÓN SATURADA DE HP- β -CD

Se pesaron 10g de HP- β -CD y se adicionaron 50 mL de metanol y se colocó al sonicador durante 10 minutos y se aforó a 100mL con metanol, se colocó por más tiempo en el sonicador para obtener una solución homogénea.

8.2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS EN AMPOLLETAS

En seis distintas ampolletas se colocaron 300mg de Ketoconazol materia prima, se adicionaron 1, 2.5, 4, 5, 6.5 y 10 mL de la solución saturada de HP- β -CD aforándose al final al volumen de 10 mL con metanol, se realizó por triplicado.

Las 18 ampolletas se colocaron bajo las mismas condiciones a 50 rpm, durante 36 horas a 25°C. Al término del procedimiento se centrifugaron las muestras por 5 minutos a 2000 rpm ; del sobrenadante se tomó 1 mL y se aforó a 10mL . De la solución se tomó 1mL y se aforó a 10mL. Finalmente se tomó 1mL y se diluyó a 10mL con metanol .

Las muestras fueron leídas en el UV en un rango de 200 a 300nm, tomando como blanco metanol.

8.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

8.3.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Se preparó una curva estándar partiendo de una solución Stock de Ketoconazol a concentraciones de 60, 80, 100,120 y 140 $\mu\text{g} / \text{mL}$ por triplicado empleando metanol como solvente. Las soluciones se leyeron al ultravioleta en el rango de 200 y 300nm en celdas de cm^{-1} .

8.3.2. PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se preparó por sextuplicado una solución de 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de ketoconazol en metanol, leyendo las muestras en un rango de 200 a 300 nm en celdas de 1cm de longitud, empleando metanol como blanco de referencia.

8.3.3. REPRODUCIBILIDAD

Se realizó el procedimiento anterior con la participación de dos analistas, en dos días diferentes.

8.4. PREPARACIÓN DEL COMPLEJO KETOCONAZOL / HP- β -CD POR EL MÉTODO DE COPRECIPITADO

Se preparó una mezcla (1:1) con 1g de ketoconazol y 1 g de HP- β -CD , se disolvió en 5mL de etanol al 50% . Posteriormente se evaporó el solvente a 50°C durante 12 horas y se maceró en un mortero por 15 minutos.

8.5. PREPARACIÓN DEL COMPLEJO KETOCONAZOL / HP- β -CD POR EL MÉTODO DE AMASADO

Se mezcló 1g de ketoconazol con 1 g de HP- β -CD, se le adicionó una cantidad de 5mL de una solución de etanol al 50%, se mezcló hasta obtener una crema homogénea. La mezcla fue transferida a un mortero y se amaso durante 15 minutos, se secó en la estufa a 50°C y se maceró durante 10 minutos el sólido obtenido.

8.6. PREPARACIÓN DEL COMPLEJO KETOCONAZOL / HP- β -CD POR EL MÉTODO DE MEZCLA FÍSICA

Se colocaron en un motero 9 g de ketoconazol y 81 g de HP- β -CD. Se maceraron durante 1 hora, después, se pasaron por malla No. 80 y 100. El producto obtenido se mezcla durante 15 minutos .

8.7. CARACTERIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS Y DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN

8.7.1. ANÁLISIS POR UV

Para el ketoconazol como materia se preparó por triplicado una solución a concentración de 20 μ g/mL, en metanol. De la misma forma se prepararon las soluciones para un estándar USP. Todas las muestras se leyeron al ultravioleta de 200 a 300nm, empleando metanol como blanco de referencia, en celdas de 1cm de longitud de paso.

Para la HP- β -CD se preparó por triplicado una solución a concentración de 0.1g/mL . Se leyeron las soluciones al ultravioleta en un rango de 200 a 300nm, empleando metanol como blanco en celdas de 1cm de longitud de paso.

Para la mezcla física (1:4) se preparó por sextuplicado una solución de concentración equivalente a 20 μ g/mL de ketoconazol. Se pesó la cantidad equivalente a 200mg de ketoconazol, se disolvieron en 10mL de metanol y se agitaron por 15 minutos y se centrifugaron por 5 minutos a 2000 rpm, de esta solución se realizó la dilución adecuada para obtener la concentración indicada (20 μ g/mL).

8.7.2. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

****Se pesó de 1.0 a 2.5 mg de Ketoconazol en un crisol 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 20mL/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 HP-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 20mL/min.

En el caso del complejo formado por mezcla física en proporción 1 :4 se peso la cantidad equivalente a 1.0 mg de ketoconazol, se determinó su comportamiento térmico de 50°C a 250°C a una tasa de calentamiento de 10°C/min bajo atmósfera de nitrógeno a un flujo de 20mL/min.

8.7.3. ANÁLISIS POR INFRARROJO

Se realizaron los espectros de infrarrojo del ketoconazol y de la HP-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%.

****Se realizó en el laboratorio de calorimetría.**

8.8. EVALUACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DEL COMPLEJO EN METANOL.

Se pesaron cantidades de mezcla del complejo equivalente a 50,100,150,200,250 y 300 mg de ketoconazol por triplicado y se colocaron en ampollas de vidrio de 10mL y se adicionaron 10 mL de metanol a cada ampollita y se sellaron. Las ampollitas se colocaron en el sistema de agitación a 50 rpm , 25°C durante 36 horas. Se centrifugó el contenido de cada ampollita; del sobrenadante se tomó 1mL y se aforó a 10mL, de la solución se tomó 1mL y se aforó a 10mL. Finalmente de la solución se tomó 1mL y se aforó a 10mL con metanol, el cual se empleo como solvente en todas las diluciones. Cada muestra fue leída al UV en un rango de 200 a 300 nm empleando metanol como blanco en celdas de 1cm de longitud . Se realizó el procedimiento por triplicado.

8.9. EVALUACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DEL KETOCONAZOL EN SOLUCIÓN BUFFER pH2, pH4 y pH7

Se pesaron 200 mg de ketoconazol por triplicado, se colocaron en ampollas de vidrio de 10mL, se adicionaron 10mL de buffer pH2,pH4 y pH7 (tres muestras por cada pH) y se sellaron. Las ampollitas se colocaron en el sistema de agitación a 50 rpm , 37°C durante 6 horas. Se centrifugó el contenido de cada ampollita; del sobrenadante se tomó 1mL y se aforó a 10mL, de la solución se tomó 1mL y se aforó a 10mL. Finalmente de la solución se tomó 1mL y se aforó a 10mL con agua destilada la cual se empleo como solvente en todas las diluciones. Cada muestra fue leída al UV en un rango de 200 a 300 nm empleando como blanco agua destilada en celdas de 1cm de longitud .

8.10. EVALUACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DEL COMPLEJO EN SOLUCIÓN BUFFER A pH2, pH4 y pH7.

Se pesaron cantidades de mezcla del complejo equivalente a 200 mg de ketoconazol por triplicado, se colocaron en ampollas de vidrio de 10mL, se adicionaron 10mL de buffer pH2, pH4 y pH7 (tres muestras por cada pH) y se sellaron. Las ampollas se colocaron en el sistema de agitación (disolutor de liberación prolongada ELECSA) a 50 rpm, 37°C durante 6 horas. Se centrifugó el contenido de cada ampolla; del sobrenadante se tomó 1mL y se aforó a 10mL, de la solución se tomó 1mL y se aforó a 10mL. Finalmente de la solución se tomó 1mL y se aforó a 10mL con agua destilada la cual se empleó como solvente en todas las diluciones. Cada muestra fue leída al UV en un rango de 200 a 300 nm empleando como blanco agua destilada en celdas de 1cm de longitud.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. CARACTERIZACIÓN DEL KETOCONAZOL

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
DESCRIPCIÓN	Polvo blanco o ligeramente amarillo	Cumple
SOLUBILIDAD	Muy soluble en cloruro de metileno, soluble en metanol; ligeramente soluble en alcohol, casi insoluble en agua.	Cumple
IDENTIFICACIÓN	Reacción positiva(+)	Cumple
PUNTO DE FUSIÓN	148°C-152°C	150°C
ASPECTO DE LA SOLUCIÓN	Clara e incolora	Cumple
ROTACIÓN ESPECÍFICA	+1° a -1°	+1
PÉRDIDA POR SECADO (80°C/4H)	Máximo 0.5%	0.014%
RESIDUOS A LA IGNICIÓN	Máximo 0.1%	0.023%
METALES PESADOS	Máximo 20 ppm	Menor a 20 ppm
SUSTANCIAS RELACIONADAS	Maximo 0.05%	Menor a 0.05%
VALORACIÓN	99.0%--102.0%	100.36%

9.2. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DEL KETOCONAZOL EN METANOL

En la tabla 1 se reportan los datos obtenidos en el análisis para determinar la solubilidad del ketoconazol en metanol expresado en mg/10mL de solución considerando las diluciones realizadas para su análisis por UV.

Se obtuvieron los valores de las medias y la desviación estándar para cada tres muestras. No se observó diferencia estadísticamente significativa por lo que se concluye que es reproducible.

Con las medias se realizó un gráfico de solubilidad de fase, graficando los mg recuperados en solución (Y) vs los mg adicionados a cada ampollita(X). El valor de la solubilidad se obtuvo extrapolando el punto donde se forma la meseta al eje Y que correspondió a 201.0440 mg/10mL de solución de metanol. Este valor se empleará en la ecuación correspondiente para determinar el valor de la constante de complejación.

TABLA 1. Datos de solubilidad de ketoconazol en metanol

Mg adicionados	50	100	150	200	250	300	
Réplica		Miligramos	Recuperados	en solución			
1	50.7857	99.0000	150.4285	199.2860	204.4285	201.2142	
	50.7857	99.0000	149.1428	199.9290	200.5714	199.2857	
	50.1428	99.6428	149.1428	199.2860	200.5714	200.5714	
	Media	50.5714	99.2142	149.5713	199.5000	201.8571	200.3571
	Desv. Std.	0.3711	0.3711	0.7422	0.3711	2.2268	0.9819
2	49.5000	100.2857	149.7800	198.6430	200.5714	201.2142	
	50.4285	102.2142	151.7142	199.9290	201.2142	202.5000	
	50.7857	101.5714	153.0000	199.2140	199.2857	200.5714	
	Media	50.2380	101.3571	151.4980	199.2620	200.3571	201.4285
	Desv. Std.	0.6636	0.9819	1.6208	0.6441	0.9819	0.9820
3	50.4285	98.3571	149.7857	200.5710	201.2142	199.2857	
	50.1428	99.6428	151.7142	200.5710	202.5000	201.8571	
	48.8571	100.9285	150.4285	201.2140	200.5714	199.2857	
	Media	49.8094	99.6428	150.6428	200.7860	201.4285	200.1428
	Desv. Std.	0.8370	1.2856	0.9819	0.3711	0.9820	1.4845
C.V.	0.7608	1.1133	0.6411	0.4102	0.3839	0.3433	

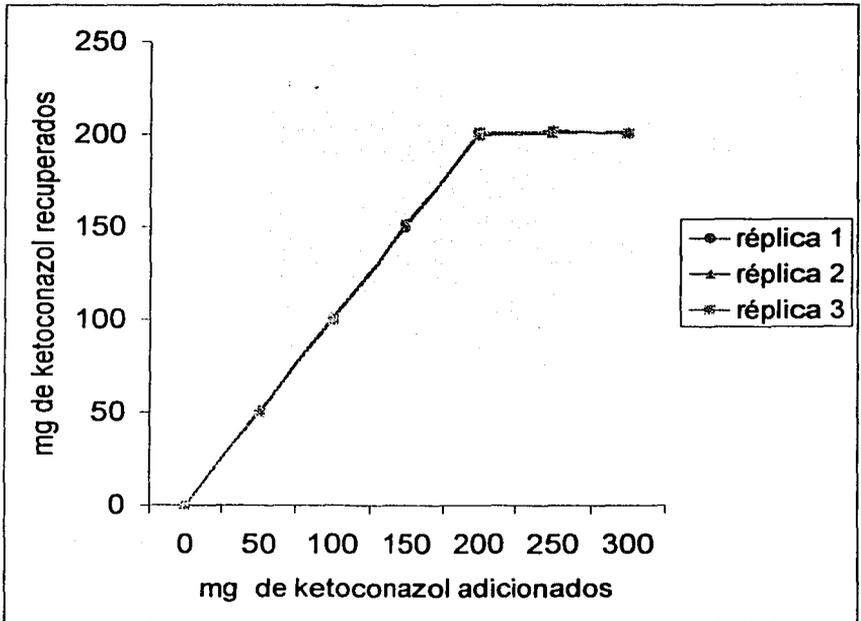


FIGURA 5. Diagrama de solubilidad de fase de ketoconazol en metanol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9.3. DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE ESTABILIDAD DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN.

En los espectros del UV que se obtuvieron al determinar la constante de complejación (Figura 6), puede observarse claramente la modificación del espectro con respecto al correspondiente en la materia prima de ketoconazol (Figura 9), lo cual se toma como evidencia de que en presencia de HP-β-CD ocurre la formación de un complejo por mezcla física.

Los resultados obtenidos en el análisis para la determinación de la constante de estabilidad se muestran en la TABLA 2.

Para cada triplicado se calculó el valor promedio y la desviación estándar, los valores se reportan en Mol x10⁻⁴.

El método es reproducible ya que el valor del coeficiente de variación (C.V.) es menor al 3%

Con los valores promedio se trazó el gráfico para la solubilidad empleando la concentración de ketoconazol en solución (Y) v.s. la concentración de HP-β-CD (X) adicionada a cada ampollita. De este diagrama se calculó el valor de la constante de estabilidad considerando la pendiente de la recta y la solubilidad de ketoconazol en el medio empleado, que se determinó previamente. La fórmula $K = m / S_o(1-m)$ es la fórmula que se emplea para obtener un valor para K_{eq} del complejo ketoconazol/HP-β-CD de 28.0216 M a 25°C en metanol.

El tipo de diagrama obtenido representa un comportamiento donde la solubilidad no está limitada. El complejo puede mantenerse estable en el medio ácido y también se ve favorecido en medio básico, aumentando de esta forma la biodisponibilidad del fármaco, considerando, que la solubilidad es el factor que limita la absorción.

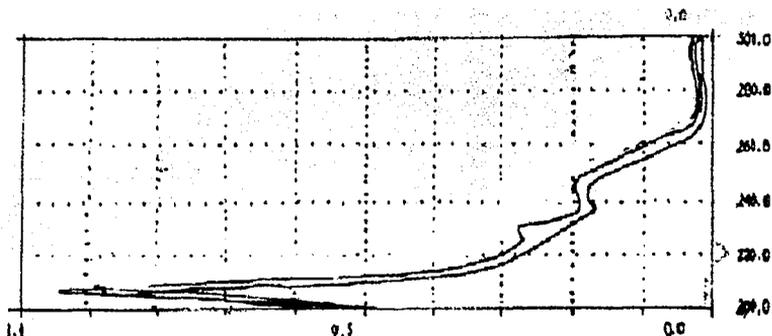


FIGURA 6. espectros de uv obtenidos en la determinación de la constante de formación del complejo de inclusión KETOCONAZOL/ HP- β -CD.

TABLA 2. datos de solubilidad para determinar la constante de complejación.

Concentración de la HP- β -CD adicionada (mol x 10 ⁻⁴)	8.3752	20.9380	33.5083	41.8760	54.4388	83.7520
Réplica		Concentración	Ketoconazol	(Mol X10 ⁻⁴)		
1	3.7621	3.8237	4.2001	4.2023	4.2950	4.7501
	3.8101	3.9117	4.0012	4.1481	4.4812	4.6314
	3.7921	3.8000	3.9904	4.0305	4.3050	4.6907
Media	3.7880	3.8448	4.0627	4.1263	4.3595	4.6904
Desv. Std.	0.0242	0.0588	0.1180	0.0878	0.1047	0.0593
2	3.6001	3.8246	3.9991	4.1317	4.4317	4.5963
	3.6034	3.8150	4.1209	4.1514	4.3514	4.6102
	3.5901	3.8104	4.2100	4.1412	4.4312	4.7992
Media	3.5986	3.8166	4.1090	4.1414	4.4046	4.6676
Desv. Std.	0.0069	0.0072	0.1058	0.0098	0.0462	0.1133
3	3.7821	3.8650	4.0329	4.1932	4.4932	4.4120
	3.6583	3.9111	4.1352	4.1105	4.4105	4.7321
	3.6210	3.8927	4.1173	4.0502	4.3502	4.5993
Media	3.6864	3.8895	4.0948	4.1175	4.4175	4.5792
Desv. Std.	0.0843	0.0232	0.0546	0.0718	0.0717	0.1608
C.V.	2.5679	0.9547	0.5801	0.2927	0.6390	1.2643

Nota: La cantidad adicionada de ketoconazol fue de 300mg/ampolleta.

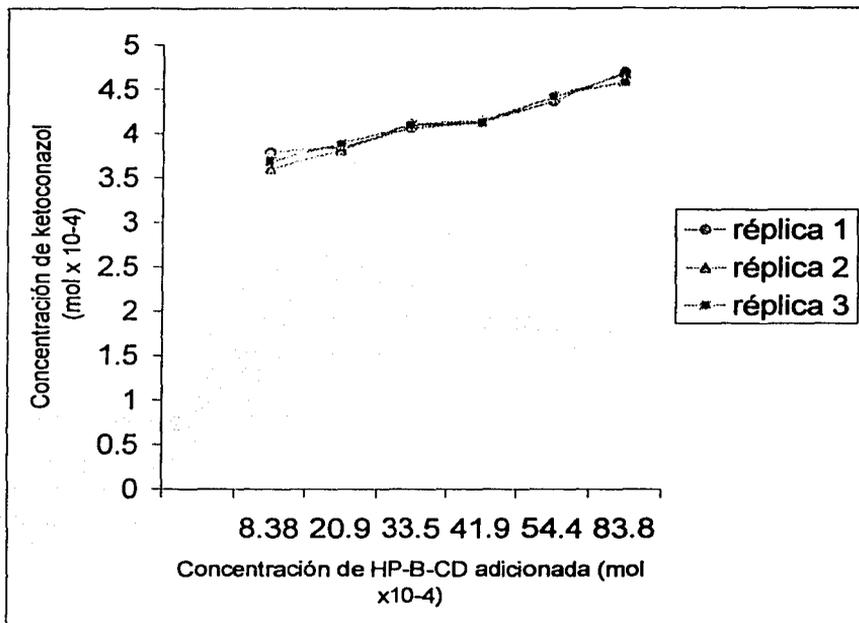


FIGURA 7. Diagrama de solubilidad de fase para la determinación de la constante de complejación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La validación del método empleado, se llevó a cabo, para asegurar que la respuesta medida era únicamente debida a la molécula del ketoconazol y no de las interferencias del sistema o del método.

9.4.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Criterios de aceptación

1. Coeficiente de determinación debe ser mayor o igual a 0.98
2. pendiente debe tender a 1
3. El coeficiente de variación debe ser menor o igual a 3%
4. La ordenada al origen de la relación lineal debe ser estadísticamente igual a cero

TABLA 3. Evaluación de la linealidad del sistema

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
60	0.168	0.173	0.169
80	0.224	0.222	0.223
100	0.280	0.279	0.282
120	0.332	0.336	0.334
140	0.389	0.391	0.393

TABLA 4. Análisis de varianza para la linealidad del sistema

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M.C.	Fcalc	Ftab
Regresión	1	0.0917	0.0917	23553.9663	6.41
Error de regresión	13	5.063x10-5	3.895x10-6		

Los resultados estadísticos obtenidos para la linealidad son:

Coefficiente de determinación: 0.9994

Pendiente: 0.9972

Ordenada al origen: 0.0031

CV :0.0018

tcalc: 0.0085, ttab 12,0,0.975 : 2.1604

Intervalo de confianza: -0.0001 a 0.0036

Los valores experimentales cumplen con los criterios de aceptación, por lo tanto, el sistema se comporta linealmente.

9.4.2. PRECISI3N DEL SISTEMA

Criterio de aceptaci3n:

1. El coeficiente de variaci3n debe ser menor o igual 3%
2. La media del % recuperado debe estar entre 97 y 103%

TABLA 5. Evaluaci3n de la presi3n del sistema

Absorbancia	%Recuperado
0.283	101.0714
0.279	99.6428
0.285	101.7857
0.278	99.6428
0.277	98.9285
0.281	100.3571
Media	100.2380
C.V.	1.0489

Nota: La concentraci3n de la soluci3n de referencia 100 μ g/10mL.

Los valores de % recobro y coeficiente de variaci3n est3n en el rango de los criterios de aceptaci3n, por lo tanto, el sistema se considera preciso.

9.4.3. REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

Criterio de aceptación

1. El coeficiente de variación debe ser menor o igual al 3%

TABLA 6. Evaluación de la reproducibilidad del método.

	%Recuperado	por el analista
Día	1	2
1	101.0714	100.1416
	99.6428	99.2413
	101.7857	101.1211
2	99.6428	101.0783
	98.9285	99.8776
	100.3571	99.4321

Coeficiente de variación: 0.8689

Los valores obtenidos se encuentran en el rango de aceptación, por lo que el método es reproducible.

Se realizó un análisis de varianza para conocer la fuente de variación y el criterio de aceptación es el siguiente:

1. Si la F_{calc} es menor o igual que la F_{tab} el método es reproducible por los analistas.
2. Si la F_{calc} es menor o igual que la F_{tab} el método es reproducible en diferentes días por un mismo analista.

TABLA 7. Análisis de varianza para evaluar la reproducibilidad del método

FUENTE	G.L.	S.C.	M.C.	F _{calc}	F _{tab}
Día	1	1.1331	1.1331	1.1388	7.5700
Analista	1	0.0240	0.0240	0.0241	7.5700
Día/Analista	1	0.9949	0.9949	1.2025	7.5700
Error	8	6.6194	0.8247		

De acuerdo con los datos, no existe diferencia significativa entre diferentes días, ni entre analistas por lo que el método es reproducible en diferentes días y por diferentes analistas.

9.5. PREPARACIÓN DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN

Para determinar el método óptimo de preparación del complejo fue necesaria la realización de un estudio comparativo, para observar el comportamiento del fármaco al formar complejos por los diferentes métodos y observar el análisis de solubilidad de fase realizado para determinar la formación del complejo.

Con lo anterior se conocen las cantidades apropiadas de cada materia prima para llevar a cabo la preparación del complejo en la proporción adecuada, por los métodos mezcla física, coprecipitado y amasado.

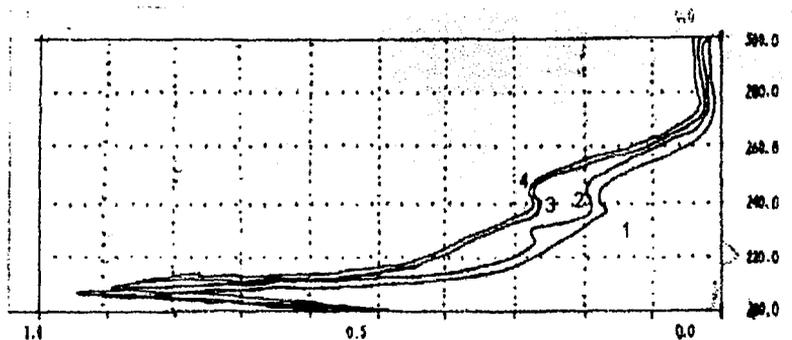


FIGURA 8. Espectros de UV de las diferentes mezclas de KETOCONAZOL / HP- β -CD.

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| 1. Ketoconazol | 2. Método de mezcla física |
| 3. Método de coprecipitado | 4. Método de amasado. |

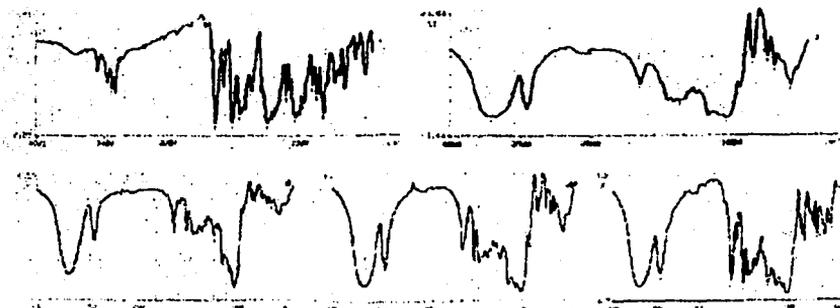


FIGURA 9. Espectro de IR de las diferentes mezclas de ketoconazol / HP- β -CD.

1. Coprecipitado; 2. HP- β -CD; 3. ketoconazol; 4. Mezcla física; 5. Amasado.

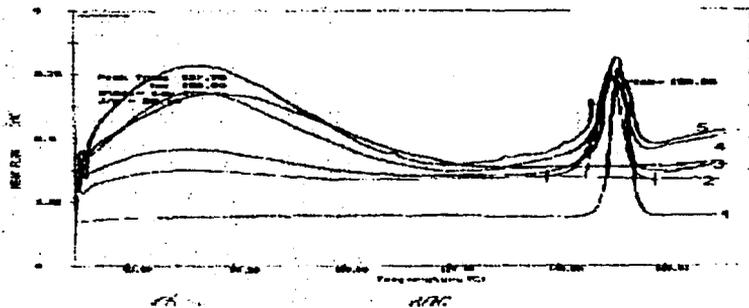


FIGURA 10. Termogramas de las diferentes mezclas de ketoconazol / HP- β -CD.

1. Ketoconazol; 2. Amasado; 3. HP- β -CD; 4. Coprecipitado; 5. Mezcla física

9.6. SOLUBILIDAD DEL KETOCONAZOL EN PRESENCIA DE HP-β-CD

La solubilidad máxima alcanzada del ketoconazol en presencia de la HP-β-CD es de $4.85 \times 10^{-4} M$.

La solubilidad máxima del fármaco sin complejar es de 201.0440 mg/10mL, y la solubilidad máxima del fármaco complejado es de 268.41 198 mg/10mL.

Las muestras preparadas por los diversos métodos se analizaron por UV en una concentración de 200 μg/10mL en metanol. Leyéndose en un rango de 200 a 300nm en celdas de 1cm de longitud de paso.

Los resultados (Figura 8) son los espectros comparativos de las diferentes mezclas de ketoconazol e HP-β-CD.

Cuando se sometió a ambos componentes a un proceso de mezcla física, se observó un cambio en las características del espectro, lo que es indicativo de complejación.

Con base en los cambios mostrados en las características del espectro se eligió el método de mezcla física (rendimiento del 98%) como el mejor para preparar el complejo.

9.7. CARACTERIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS Y DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN KETOCONAZOL/ HP- β -CD.

Los resultados son los espectros de UV, IR y termogramas por DSC para cada especie analizada.

Se observaron diferencias marcadas en cuanto a la absorbancia que muestran las materias primas solas comparadas con el complejo.

Para el análisis por UV en metanol se observa un máximo de absorbancia a 244.3 nm , lo que coincide con lo reportado en la bibliografía.

Por su parte la HP- β -CD no absorbe en ese rango, por lo que no interfiere en la determinación del ketoconazol en el complejo.

El espectro del complejo formado por mezcla física muestra una clara modificación (Figura 13), apareciendo una nueva señal de absorción cercana a los 229 nm, indicativo de la formación de un complejo de inclusión entre ambas especies.

En los espectros de IR el ketoconazol (Figura 14), muestra bandas características a una frecuencia de 1510.4 cm^{-1} debido a la presencia de un anillo aromático, 1647.1 cm^{-1} asignado a un doble enlace carbono-carbono y una amida y a 1243 cm^{-1} enlaces C-O. Esta área se considera para compararse con los resultados obtenidos del complejo, ya que se considera el área de la huella digital (bandas características del fármaco).

El espectro de la HP- β -CD (Figura 15) presenta señales alrededor de los 3420 cm^{-1} característica de los polímeros , en la banda alrededor del 2900 cm^{-1} asignada a los grupos hidroxilo primarios y secundarios, finalmente a los 1420 cm^{-1} región asignada a los alquilos.

El complejo (Figura 16) se observa una marcada disminución en la banda característica de los anillos aromáticos, así como en la señal característica de los polímeros y finalmente en la región de los enlaces C-O. Estos cambios son atribuidos a que se intercalaron las moléculas de la HP- β -CD y el ketoconazol, formando enlaces.

Dado que los grupos funcionales principales se vieron modificados, ya que se encuentran en una cavidad de la HP- β -CD, es posible que este hecho le confiera una mayor estabilidad a la molécula del ketoconazol.

Las pruebas que se realizaron para caracterizar al complejo, nos permiten constatar que es posible que se forme un complejo estable en fase sólida, lo que nos facilita la manipulación para realizar la formulación pertinente.

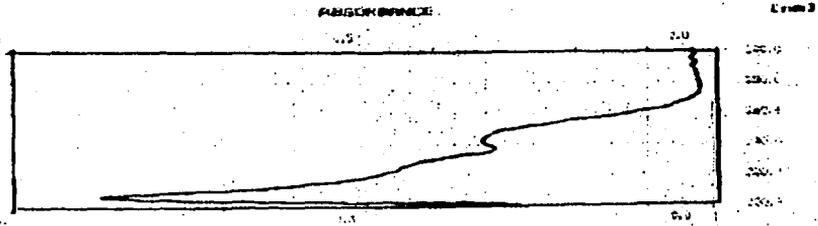


FIGURA 11. Espectro de UV de ketoconazol.



FIGURA 12. Espectro de UV de HP- β -CD.

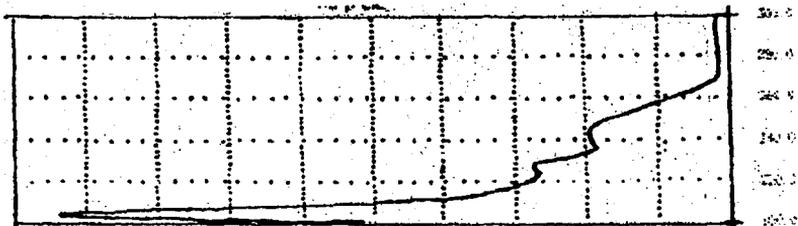


FIGURA 13. Espectro de UV del complejo por mezcla física

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

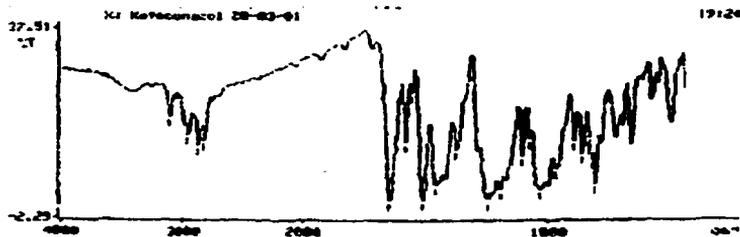


FIGURA 14. Espectro IR de Ketoconazol



FIGURA 15. Espectro IR de HP- β -CD

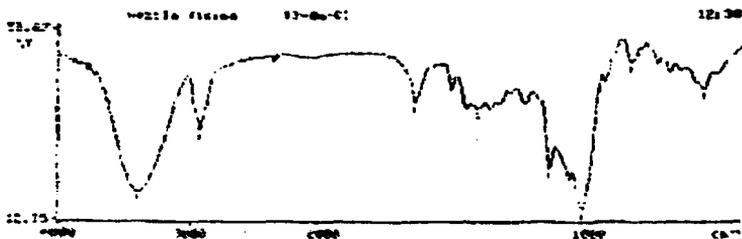


FIGURA 16. Espectro IR del complejo por mezcla física

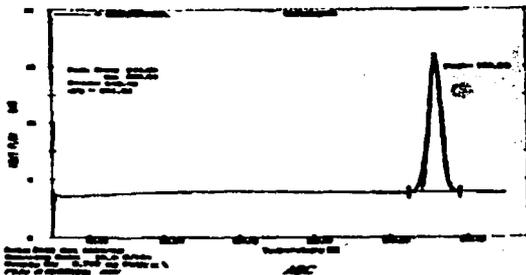


FIGURA 17. Termograma de ketoconazol

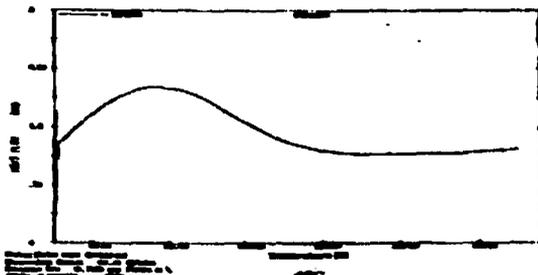


FIGURA 18. Termograma de HP- β -CD



FIGURA 19. Termograma del complejo por mezcla física

9.8. EVALUACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN KETOCONAZOL/ HP- β -CD EN METANOL

Los resultados (Tabla 9), tienen los valores promedio, la desviación estándar y finalmente los coeficientes de variación entre las réplicas, lo que está dentro de los límites de la especificación.

Se realizó un análisis por ANDEVA para evaluar la reproducibilidad en la determinación de la solubilidad, los resultados obtenidos fueron una F_{calc} de 0.0044 y una F_{tab} de 0.3680 ; dado que la F_{tab} es mayor que la F_{calc} se determinó que si existe la reproducibilidad entre días en la determinación de la solubilidad.

Se construyó un diagrama de solubilidad de fase con los datos de las medias obtenidas de las réplicas, graficándose la cantidad de Ketoconazol adicionada en su equivalente en forma de complejo (X) contra la cantidad de ketoconazol recuperada (Y), Figura 20. De la gráfica anterior se calculó el valor de la solubilidad máxima del fármaco, extrapolando de la meseta formada debida a la saturación al eje Y, el valor es de 268.4119 mg/mL observándose un aumento en la solubilidad comparado con el fármaco sólo, es decir, en ausencia de la HP- β -CD. El valor obtenido de la constante, refiere que el complejo es estable en fase sólida y posee una mayor solubilidad.

TABLA 9. Datos de solubilidad del complejo de inclusión KETOCONAZOL/ HP- β -CD.

Mg equivalente	50	100	150	200	250	300
Réplica		Miligramos	recuperados	en solución		
1	49.5000	99.6428	149.7857	199.6534	223.4285	258.4285
	48.2142	98.6542	149.7857	198.4723	226.6428	256.5000
	48.8571	100.2587	149.5960	195.6754	225.3571	259.0714
Media	48,8571	99.5253	149.3891	197.9373	225.1387	257.9976
Desv. Std.	0.6429	0.8218	0.6868	2.0429	1.6178	1.3381
2	48.1428	99.5683	148.8214	200.5714	230.1428	262.2857
	48.1428	101.3654	149.2071	200.6357	227.1428	263.5714
	46.8571	100.4328	149.2714	200.5071	227.5714	260.3571
Media	47.7142	100.4528	149.0999	200.5714	228.2818	262.0680
Desv. Std.	0.7422	0.8987	0.2433	0.0643	1.6225	1.6178
3	49.0037	101.5714	147.8571	196.3542	224.3571	262.2857
	48.3589	100.2857	149.8500	193.2456	226.2857	261.0000
	49.0232	99.6428	147.2142	194.3657	230.1428	261.6428
Media	48.7952	100.4999	148.3028	194.6551	225.3193	261.6423
Desv. Std.	0.3780	0.9819	1.3743	1.5743	2.9459	0.6428
C.V.	1.3264	0.5487	0.3777	1.4991	0.7800	0.8562

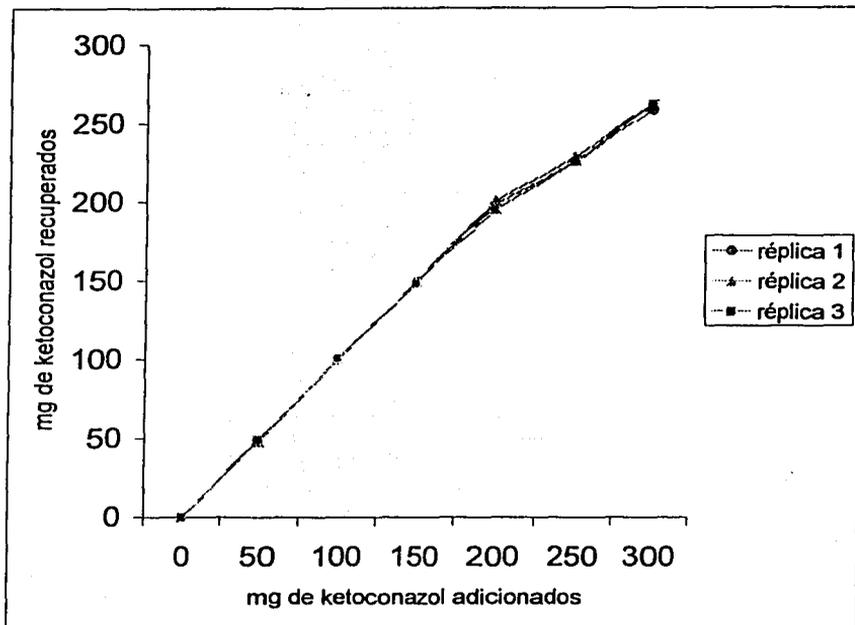


FIGURA 20. Diagrama de solubilidad de fase del complejo por mezcla física de KETOCONAZOL / HP- β -CD .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

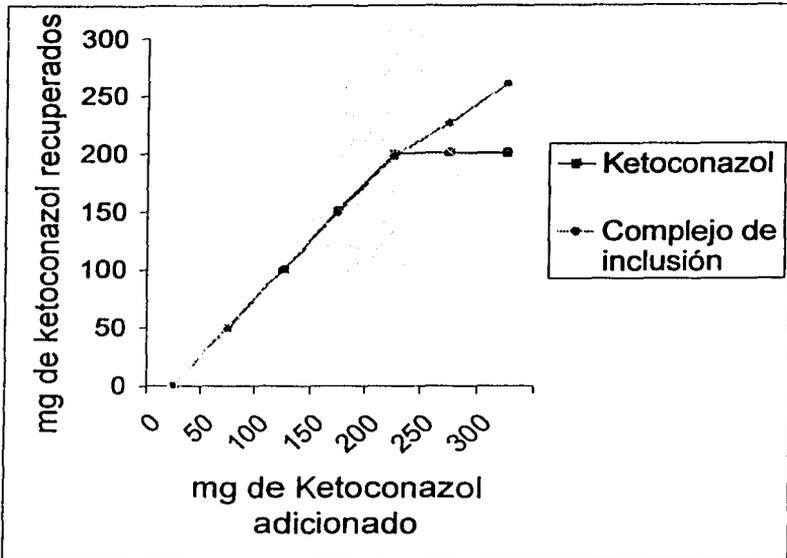


FIGURA 21. Diagrama de solubilidad de fase comparativo entre el ketoconazol y el complejo de inclusión.

En el diagrama se muestra un comportamiento constante para A, mientras en C, sigue aumentando sin llegar al punto de saturación.

El comportamiento se fundamenta en el supuesto, la solubilidad del fármaco en un solvente dado es una constante y que cualquier aumento en la solubilidad será efecto de la formación de un complejo de inclusión, sin afectar la naturaleza misma del fármaco, ya que interaccionan parcialmente.

9.9. EVALUACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DEL KETOCONAZOL Y DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN EN SOLUCIÓN BUFFER A pH 2, pH 4 y pH 7

Se evaluó la solubilidad del ketoconazol y del complejo a diferentes valores de pH durante 6 horas para observar los resultados y compararlos. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas.

TABLA 10. Datos de solubilidad del ketoconazol a pH2, pH4 y pH7

mg recuperado ketoconazol	HORA 1	HORA 2	HORA 3	HORA 4	HORA 5	HORA 6	
pH2	168.8765	173.8812	178.0071	183.9040	193.4081	192.7899	
	166.8969	173.0131	178.9173	181.0918	192.1520	192.8387	
	167.1032	173.2442	178.5312	183.7377	194.1520	193.0453	
	Media	166.9588	173.0461	178.4852	182.9111	193.3671	192.2246
	Desv. Std.	0.1254	0.1837	0.4568	1.5778	0.8061	1.2070
C.V.	0.0751	0.3112	0.2828	0.8626	0.4168	0.6182	
pH4	4.9510	8.1428	12.9020	14.3816	18.8857	23.5561	
	4.7112	8.1826	12.4224	14.4142	18.3489	22.5887	
	4.7112	8.1663	12.8983	14.1221	19.5887	22.3163	
	Media	4.7911	8.1639	12.7394	14.3059	18.9411	22.8203
	Desv. Std.	0.1384	0.0200	0.2745	0.1600	0.6017	0.6515
C.V.	2.0896	0.2450	2.1552	1.1428	2.9806	2.0850	
pH7	9.6704	15.8693	16.5969	16.5887	18.3653	18.6051	
	9.8306	15.6214	16.6295	16.6380	18.0928	18.8653	
	9.9346	15.6051	16.6214	16.7620	18.0193	18.6987	
	Media	9.8118	15.6986	16.6159	16.6629	18.1591	18.7230
	Desv. Std.	0.8940	0.1480	0.0169	0.0892	0.1822	0.1317
C.V.	1.3564	0.9431	0.1021	0.5358	1.0038	0.7039	

Nota: Se adicionaron 200mg de ketoconazol por tubo.

TABLA 11. Datos de solubilidad del complejo de inclusión KETOCONAZOL / HP- β -CD A pH2, pH4 Y pH 7.

Mg recurepado Ketoconazol	HORA 1	HORA 2	HORA 3	HORA 4	HORA 5	HORA 6
pH2	161.9173	166.8765	178.0071	183.8193	190.1754	195.6367
	160.8530	166.8969	178.9173	183.3397	190.3806	195.6693
	161.8561	167.1032	178.5312	183.0.346	189.9812	196.1205
Media	161.5421	166.9588	178.4852	183.3978	190.1790	195.8115
Desv. Std.	0.5976	0.1254	0.4568	0.3955	0.1997	0.2750
C.V.	0.3699	0.0751	0.2828	0.2281	0.1173	0.1658
pH4	42.3846	48.8561	50.8479	58.5591	66.2867	73.8812
	42.6326	48.3520	50.0590	59.0331	66.0714	73.0131
	43.1091	49.0397	50.8397	58.8910	65.9813	73.2442
Media	42.7087	48.7492	50.2488	58.8277	66.1131	73.0461
Desv. Std	0.3682	0.3560	0.5224	0.2432	0.1569	0.1837
C.V.	0.8621	0.7304	1.0608	0.4519	0.2796	0.3112
pH7	32.3357	39.8918	45.9304	50.1693	54.0149	62.7328
	31.9953	39.9312	46.1316	51.8941	55.8312	63.0132
	32.1213	39.0402	45.9898	51.9316	54.9991	63.2143
Media	32.1507	39.9544	45.0172	51.3316	54.9484	62.9867
Desv. Std	0.1721	0.0768	0.1033	1.0668	0.9092	0.2418
C.V.	0.3431	0.1508	0.2026	1.9613	1.7845	0.4743

Nota: Se adicionó el equivalente a 200mg de ketoconazol a cada tubo.

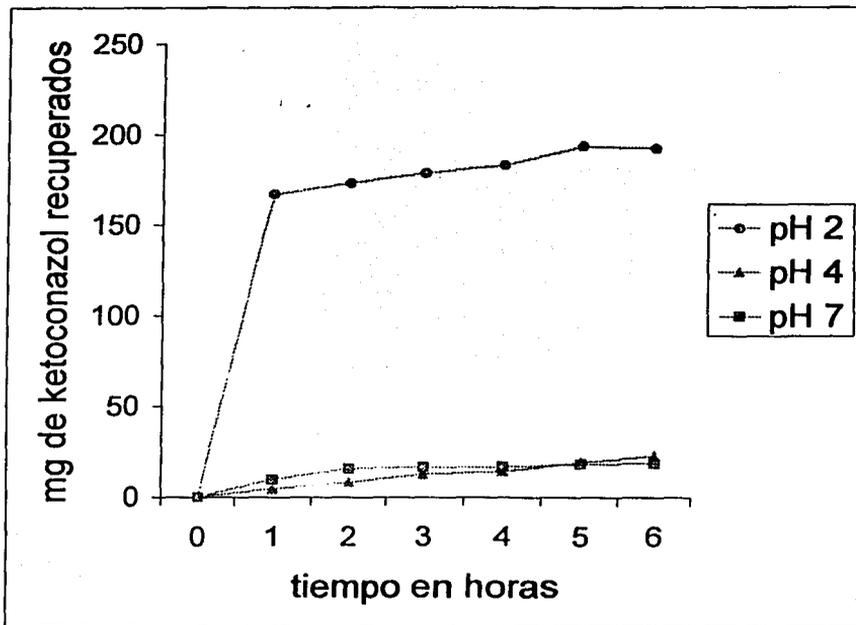


FIGURA 22. Diagrama de solubilidad de fase de ketoconazol a pH 2, pH 4 y pH7.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

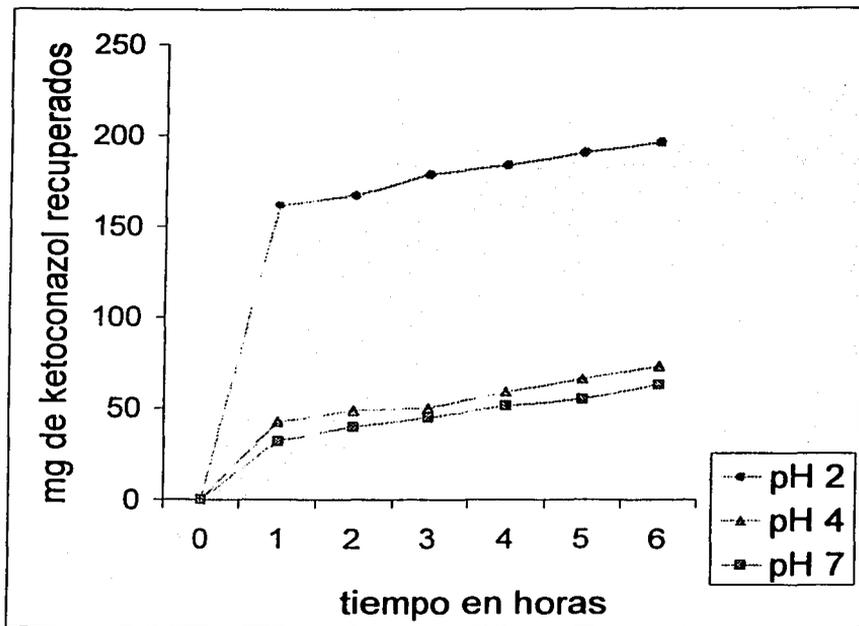


FIGURA 23. Diagrama de solubilidad de fase del complejo de inclusión KETOCONAZOL / HP- β -CD A pH 2, pH 4 y pH 7.

Los resultados obtenidos a pH 2, pH 4 y pH 7 muestran que al formar el complejo la solubilidad se ve incrementada en medio ácido, la cantidad de fármaco adicionado fue constante y lo que se trató de ver es si conforme avanzaba el tiempo se encontraba mayor cantidad de fármaco disuelto.

Se pudo observar que hasta las 6 horas las cantidades de fármaco disuelto hallado no se iban incrementando considerablemente, por lo que no se continuo con el muestreo, ya que inicialmente se sabía que en esos valores de pH el fármaco es ligeramente soluble.

En el complejo la cantidad de fármaco disuelto fue mayor para pH2, pH4 y pH 7, por lo que si se ve favorecida la solubilidad a estos valores de pH.

10. CONCLUSIONES

1. Con la técnica de solubilidad de fase se determinaron las condiciones (temperatura, velocidad de agitación, tiempo de agitación) y cantidades para la preparación del complejo.
2. Empleando el método de complejación de mezcla física, en proporción 1:4, es posible obtener un complejo de inclusión de ketoconazol /HP-β-CD estable en fase sólida, lo que favorece su manejo.
3. Las técnicas de UV, DSC e IR permitieron comprobar la formación del complejo de inclusión de ketoconazol /HP-β-CD a través de los cambios mostrados en los espectros y termogramas correspondientes.
4. El complejo formado incrementó la solubilidad del ketoconazol en un 33%, ya que la solubilidad del ketoconazol es de 201.04 mg/10mL y la solubilidad del complejo es de 268.41 mg/10mL. Permitiendo la posibilidad de disminuir la irritabilidad gástrica y el tiempo de tratamiento.
5. Se observó que a pH 2, pH 4 y pH 7 se obtiene una mayor solubilidad del fármaco complejado comparado con la solubilidad del fármaco sólo, mostrándose un incremento de mayor consideración a pH 4 y pH 7 .

11. RECOMENDACIONES

1. Realizar un estudio de estabilidad del complejo y de la molécula sin complejar para conocer si el proceso de complejación favorece la estabilidad aunado a un incremento de la solubilidad del fármaco.
2. Elaborar tabletas de la forma complejada y no complejada para poder llevar a cabo un estudio comparativo de perfiles de disolución con el fin de evaluar la cinética de liberación del fármaco complejado y determinar cual fue el efecto al usar el complejo en la forma farmacéutica.
3. Proponer una formulación para el complejo del ketoconazol y realizar los estudios pertinentes.
4. Estudiar la posibilidad de una formulación para un inyectable.
5. Evaluar la biodisponibilidad del ketoconazol sólo y su forma complejada, en estudios in vivo.

12. APÉNDICE I

12.1. ABREVIATURAS

HP- β -CD : Hidroxipropil-beta-ciclodextrina.

DSC: Diferencial Scanning Calorimetry (Calorimetría diferencial de barrido).

IR : Infrarrojo

UV : Ultravioleta

Andeva : Análisis de varianza

Fteo : Valor crítico teórico del estadígrafo de contraste F de Fisher

Fcalc : Valor experimental del estadígrafo de contraste F de Fisher

C.V. : Coeficiente de variación

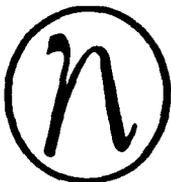
Desv. Std. : Desviación estándar

G.L. : Grados de libertad

S.C. : Suma de cuadrados

M.C. : Media de cuadrados

12.2. CERTIFICADO DE ANÁLISIS DEL KETOCONAZOL

**NUTRER S.A. DE C.V.**

Calle 4 No. 25-C
 Fracc. Alce Blanco
 53370 Naucalpan, Edo. de México
 Tel.: 5358.1810 Fax: 5358.9420
 Atención a clientes: ☎01800.500.6400
 e-mail: uaschmann@nutrer.com.mx

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

INSUMO : KETOCONAZOL

LOTE : KZL-03/2000

FECHA DE ANÁLISIS: 05.OCTUBRE 2000 FECHA DE CADUCIDAD: MARZO 2005

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
DESCRIPCIÓN	Polvo blanco o ligeramente amarillo	Cumple
SOLUBILIDAD	Muy soluble en cloruro de metileno; soluble en metanol; ligeramente soluble en alcohol; casi insoluble en agua	Cumple
IDENTIFICACIÓN	Reacción positiva	Cumple
TEMPERATURA DE FUSIÓN	148°C - 152°C	150°C
ASPECTO DE LA SOLUCIÓN	Clara e incolora	Cumple
ROTACIÓN ESPECÍFICA	+1° A -1°	+1°
PERDIDA POR SECADO (80°C/4H)	Máximo 0.5%	0.014%
RESIDUOS DE LA IGNICIÓN	Máximo 0.1%	0.023%
METALES PESADOS	Máximo 20ppm	Menor 20ppm
SUSTANCIAS RELACIONADAS	Máximo 0.05%	Menor a 0.05%
Valoración	98.0% - 102.0%	100.35%

Los datos contenidos en este certificado son copia fiel del proporcionado por el fabricante


 QFB Marco Tulio Morales Delgado
 Ced. Prof.: 994799
 Aut. Resp. ARM-219-98

13. APÉNDICE II

LINEALIDAD DEL SISTEMA

- Calcular r_1, r_2, m y b . Si m es diferente de 1 y b diferente de cero calcular la siguiente.
- Cálculo de la ϵ_i Sumatoria de $(y_i - \hat{y}_i)$
- Ajuste el modelo de regresión por el método de mínimos cuadrados:

$$y = m x + b + \epsilon_i$$

$$y = m x + b$$

*Graficar cantidad adicionada (X) contra cantidad recuperada (Y).

- Evaluación estadística de la ordenada al origen en el método :

$$H_0: B_0 = 0$$

$$H_a: B_0 \neq 0$$

- Estadígrafo de contraste: t de "student":

$$T_{\text{calc}} = \frac{b - B_0}{S_{y/x} \sqrt{1/n + (x^2/(n-1)S_x^2)}} \quad \text{g.l.} = n-2$$

- Criterio de aceptación:

$$t_{\text{calc}} < t_{\text{tab } 1-(\alpha/2)} \quad \alpha = 0.05$$

- Intervalo de confianza:

$$m \pm t(1-(\alpha/2)) \left((n-2) S_{y/x} / (n-1) S_x \right)$$

- Cálculo de ANDEVA para la regresión lineal:

H₀: y no depende de X

H_a: y si depende de X

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media de cuadrados	Fcalc
Regresión	g.l.= 1	SCR	MCR=SCR/gl	MCR/MCER
Error	g.l.e.=n-2	SCER	MCER= SCER/gle	

$$SCR = m(\sum xy) + b(\sum x) - (\sum y)^2/n$$

$$SCER = (\sum y^2) - m(\sum xy) - b(\sum y)$$

- Criterio de aceptación:

$$F_{calc} < F_{tab 1-\alpha/2} \quad \alpha = 0.05$$

- Coeficiente de variación :

$$C.V. = \left(\frac{S_y/x}{X} \right) \times 100$$

PRECISIÓN

- Calcular el coeficiente de variación

$$CV = S/X \times 100$$

REPRODUCIBILIDAD

• ANDEVA

a) Ho: No hay efecto del analista

Ha: Si hay efecto del analista

b) Ho: No hay efecto del día

Ha: Si hay efecto del día

c) Ho: No hay efecto de la interacción analista / día

Ha: Si hay efecto de la interacción analista / día

Fuente de error	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fcalc
Analista	$(a-1) \rightarrow x$	SCA	SCA / x	MCA/MCAD
Día	$(b-1) \rightarrow y$	SCD	SCD / y	MCD/MCAD
Analista/Día	$(a-1)(b-1) \rightarrow z$	SCAD	SCAD / z	MCAD/MCE
Error exp.	$ab(c-1) \rightarrow w$	SCE	SCE / w	

$$SCA = (\sum y_{2i.../bc}) - (y_{2...}/abc)$$

$$SCD = (\sum y_{2..j/ac}) - (y_{2...}/abc)$$

$$SCAD = (\sum y_{2ij..}/c) - (\sum y_{2i.../bc}) - (\sum y_{2i..j}/ac) + (y_{2...}/abc)$$

$$SCE = (\sum y_{2ijk}) - (\sum y_{2ij..}/c)$$

- Criterio de aceptación con $\alpha = 0.05$

$$F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}} (1 - \alpha / 2)$$

$$F_A < F_{\text{tab}} (1 - \alpha / 2), \text{ g.l. } x / y$$

$$F_D < F_{\text{tab}} (1 - \alpha / 2), \text{ g.l. } y / x$$

$$F_{AD} < F_{\text{tab}} (1 - \alpha / 2), \text{ g.l. } z / w$$

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Remington. Farmacia. V II.17ªed. Medicina Panamericana S.A. Argentina. (1987).
2. Goodman and Gillman. Bases farmacológicas de la terapéutica.8ªed. Panamericana. México.D.F.(1991).
3. Drill. Farmacología Médica.2ªed. Prensa Medica Panamericana. México.(1987). 597-620.
4. Bowman W., Rand M.Farmacología .2ª ed.Interamericana . México. (1980).
5. Litter M. Farmacología Experimental y Clínica. 7ªed. El Ateneo Argentina.(1986).
6. Wesley G. Clark. Farmacología Médica. Ed. Mosby. España.(1993)
7. Katzung B. G. Farmacología Básica y Clínica. 4ª ed. El Manual Moderno. México (1993). 781-785.
8. Avendaño L. C. Introducción a la Química Farmacéutica.Interamericana. España. (1993).
9. Ozdemir N.,Orduş. Improvement of Dissolution Properties of Furosemide by Complexation with β -Cyclodextrin. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* (1998).24(1)19-25
10. Loftsson T., Guomundsdottir T. K., Fiorikdóttir H. The influence of water-soluble polymers and pH on Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin complexation of drugs. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* (1996)25(5)401-405
11. Duchene D.,Wovessidjewe D. Pharmaceutical uses of Cyclodextrins and derivatives. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* (1990).16(17)2487-2499.

12. Ducheme D. The current state of β -Cyclodextrin in pharmaceuticals. *Acta Pharm Tech.* (1990)36(1) 1-6.
13. Szejtli J. Cyclodextrin in drug formulatiuons. Part I. *Pharm. Technol.* (1991) 834-42.
14. Lin S. Indometacin and Cyclodextrin complexes. *Int. J. Pharm.* (1991). 63 211-219.
15. Bentineti G., Mura P. Solubilization and interaction of naproxen with cyclodextrin in aqueous solution and in the solid state. *Fármaco.* (1988).4(2)195-213.
16. Nazzi G. Formation of inclusion complex between the non-steroidal anti-inflammatory drug (RS)-2-(4-isobutylphenyl-1-propiohidroxamic acid and β -Cyclodextrin. *Acta Pharm. Technol.* (1988)34(1)17-21.
17. Palmieri G.F., Wehrlé P., Sante M. Interactions Between Lonidamine and β -or Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* (1998). 24(7)653-660.
18. Szejtli J. Cyclodextrin in drug formulations. Part II. *Pharm., Technol.* (1991),9 24-36.
19. Linares M. S., Bertorello de M.M., Longhi M.R. Effect of Hydroxyproyl- β -Cyclodextrin on the solubility of an Antibacterial Isoxazoly-naphtoquinone. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* (2000). 26(9)1003-1006.
20. Connors K. Curso de Análisis Farmacéutico. Reverté. S.A. España. (1981).358-372.

21. Henwood S.Q., Villiers M.M. Solubility and dissolution properties of generic Rifampicin raw material. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* (2000), 26(1)403-408.
22. Marqués C., Hadgraft J. Studies of cyclodextrin inclusion complexes. 1. The Salbutamol-Cyclodextrin complex as studied by phase solubility and DSC. *Int. J. Pharm.* (1990), 63259-266.
23. Avendano Pedregal C. Métodos espectroscópicos en el análisis farmacéutico. Ed. Médica Panamericana. México. (1990). 923-933.
24. Venkataram S., Khohlokwane M., Walliss H.. Differential scanning calorimetry as a Quick Scanning technique for solid state stability studies. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* (1995), 21(7)847-855.
25. Otero-Espinar F. Oral bioavailability of naproxen- β -Cyclodextrin inclusion compound. *Int. J. Pharm.* (1991)(75) 37-44 . Jones S.P. Cyclodextrin in the pharmaceutical sciences. Part II. *Acta. Pharm Tech.* (1984), 30(3)213-223.
26. Shangraw R. Characterization of the yableting properties of β -Cyclodextrin and the effects of processing variables on inclusion complex formation, compactability and dissolution. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* (1991)18 (17) 1831-1851 .
27. Fromming K-H., Szejtli J. Cyclodextrins in pharmacy. Klumer Academic Publisher. Netherlands. (1994).
28. Rajewski R. A., Stella j. V. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 2. *In vivo* Drug Delivery. *Journal Pharm. Sciences.* (1996)85(11)1142-1168 .
29. Ducheme D. The current state of β -Cyclodextrin in pharmaceutics. *Acta Pharm Tech.* (1990)36(1) 1-6.

30. Szejtli J. Medicinal Applications of Cyclodextrins. *Medicinal Research Reviews*. (1994)14(3) 353-386 .
31. Liu F., Kildsig D. O., Mitra A. Complexation of acyl-o- β -Cyclodextrin derivatives with steroids-effects of chain length and substitution Degree. *Drug Dev. Ind. Pharm.* (1992) 8(15) 1599-1612.
32. Jones S. P. Cyclodextrin in the pharmaceutical sciences. Part II. *Acta. Pharm. Tech.* (1984).30 (3) 213-223.
33. Nakai Y. Study of the interaction of clobazam with cyclodextrins in solution and solid state. *Chem. Pharm. Bull.* (1990).38(3)728-732.
34. Glomont F. Improvement in availability and stability of dermocorticoid by inclusion in β -Cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* (1988)46 49-55.
35. Shangraw R. Characterization of the yableting properties of β -Cyclodextrin and the effects of processing variables on inclusion complex formation, compactability and dissolution. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* (1991)18 (17) 1831-1851 .
36. Pradeau D. Análisis Químicos Farmacéutico de Medicamentos. 1ªed. Limusa . México. (1998)
37. Hostetler J. S., Hanson Linda H., Stevens David A., Effect of Cyclodextrin on the Pharmacology of Antifungal Oral Azoles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* (1992)36(2) 477-480.
38. Shangavi N. M. ,Choudhari K.B. Inclusion complexation of lorazepam with β -cyclodextrin. *Drug Dev. Ind. Pharm.* (1993)19(6) 701-712 .

39. Chin T.W.F., Loeb M., Fong I. W. *Effectos on Beverage (Coca-cola) on Absortion of Ketoconazole. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* (1995)39(8)1671-1675 (.
40. Marqués de Cantú M.J. *Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas.* Mac. Graw-Hill. México. 1996.