

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**FORMACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PERMEACIÓN TRANSBUCCAL *IN VITRO* DE LOS
COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DEL CLORAMBUCCILO CON β -CICLODEXTRINAS**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.I. MARÍA GUADALUPE NAVA ARZALUZ



Ciencias
Químicas

TUTOR: DRA. ADRIANA GANEM RONDERO AÑO: 2005

m344293



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Gabriel Eduardo Cuevas González-Bravo

Vocal: Dra. Luz María Melgoza Contreras

Secretario: Dra. Silvia Pérez Casas

Primer Suplente: Dra. María Josefa Bernad Bernad

Segundo Suplente: Dra. Patricia Ramírez Noguera

Asesor: Dra. Adriana Ganem Rondero

Sustentante: María Guadalupe Nava Arzaluz

Sitio donde se desarrollo el tema: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: María Guadalupe Nava Arzaluz
FECHA: 19/05/05
FIRMA: Nava Arzaluz

A DIOS, A MI FAMILIA Y AMIGOS.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutora, Dra. Adriana Ganem Rondero, por la asesoría y apoyo que me brindó en la elaboración del trabajo.

A la sección de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y al técnico Rodolfo Robles, por su asistencia en las pruebas de microscopía electrónica de barrido.

A la Maestra Ana María Velásquez Sánchez por su ayuda en la realización de los espectros de absorción infrarroja de los complejos.

Al Ing. Draucin Jiménez por su ayuda en la fabricación de las celdas de permeación.

Al QFB Marco Tulio Morales por su invaluable cooperación al donar ciclodextrinas.

Agradezco el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca-crédito y del proyecto CONACYT J32593-M, así como al proyecto PAPIIT IN21400 y al COMECyT.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. ANTECEDENTES	4
3.1 CLORAMBUCILO	4
3.1.1 Cáncer	4
3.1.2 Agentes Alquilantes	8
3.1.3 Clorambucilo (CHL)	8
3.1.3.1 Mecanismo de acción del CHL	9
3.1.3.2 Metabolismo, excreción y toxicidad del CHL	9
3.1.3.3 Hidrólisis del CHL	11
3.1.3.4 Mecanismos para mejorar las propiedades del CHL.	11
3.2 ABSORCIÓN BUCAL DE FÁRMACOS	15
3.2.1 Características estructurales de la mucosa bucal.	16
3.2.2 Permeabilidad de la mucosa bucal.	21
3.2.3 Barrera de permeabilidad de la mucosa bucal.	21
3.2.4 Rutas de penetración de los fármacos a través de la mucosa bucal.	22
3.2.5 Promotores de absorción bucal.	24
3.3 CICLODEXTRINAS	26
3.3.1 Definición.	27
3.3.2 Producción de ciclodextrinas	27
3.3.3 Estructura y propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas	28
3.3.4 Ciclodextrinas modificadas.	30
3.3.5 Formación de complejos	34
3.3.5.1 Factores que afectan la formación de complejos	35
3.3.6 Usos de las ciclodextrinas	36
3.3.6.1 Área farmacéutica	37
3.3.6.2 Bioconversión y fermentación	38

CONTENIDO	PÁGINA
3.3.6.3 Contaminación ambiental	38
3.3.6.4 Catálisis	38
3.3.6.5 Química analítica.	40
3.3.6.6 Industria alimentaria.	40
3.3.6.7 Área cosmética	40
3.3.6.8 Agricultura	41
IV OBJETIVOS	42
4.1 OBJETIVO GENERAL	42
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
V MATERIALES Y MÉTODOS	43
5.1 MATERIALES	43
5.1.1 Reactivos	43
5.1.2 Equipos e instrumentos	43
5.1.3 Material biológico	44
5.2 MÉTODOS	45
5.2.1 Método de cuantificación para el clorambucilo.	45
5.2.1.1 Curvas de calibración por HPTLC	45
5.2.1.2 Curvas de calibración utilizadas para la cuantificación del clorambucilo en los estudios de permeación.	45
5.2.1.3 Curva de calibración en etanol.	46
5.2.2 Solubilidad del clorambucilo en diferentes concentraciones de ciclodextrinas.	46
5.2.3 Estabilidad química del clorambucilo.	46
5.2.4 Preparación de los complejos de inclusión en estado sólido	47
5.2.4.1 Método de co-precipitación	47
5.2.4.2 Método de liofilización	47
5.2.5 Eficiencia de encapsulamiento	47
5.2.6 Caracterización de los complejos en estado sólido	47
5.2.6.1 Caracterización de los complejos por calorimetría diferencial de barrido.	47

CONTENIDO	PÁGINA
5.2.6.2 Caracterización de los complejos por Espectroscopia Infrarroja	48
5.2.6.3 Caracterización de los complejos por microscopía electrónica de barrido.	48
5.2.7 Estudios de permeación del CHL a través de mucosa bucal de cerdo.	48
5.2.7.1 Obtención de la mucosa bucal	48
5.2.7.2 Efecto de las ciclodextrinas sobre la barrera de permeabilidad de la mucosa bucal de cerdo.	48
5.2.7.2.1 Efecto de las β -ciclodextrinas sobre la barrera de permeabilidad de la mucosa bucal por medio de Espectroscopia Infrarroja	48
5.2.7.2.2 Efecto de las β -ciclodextrinas sobre la barrera de permeabilidad de la mucosa bucal por medio de Calorimetría diferencial de barrido	49
5.2.7.3 Permeación del clorambucilo y de sus complejos de inclusión a través de mucosa bucal <i>in vitro</i> .	49
5.2.7.4 Extracción del clorambucilo retenido en la mucosa bucal durante el estudio de permeación.	51
5.2.7.4.1 Determinación del porcentaje de recuperación para la extracción del clorambucilo retenido en la mucosa bucal.	51
5.2.7.4.2 Determinación del clorambucilo retenido en la mucosa bucal durante los estudios de permeación.	51
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
6.1 SOLUBILIDAD DEL CLORAMBUCILO EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CICLODEXTINA	52
6.2 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD QUÍMICA DEL CHL	58
6.3 OBTENCIÓN DEL COMPLEJO EN ESTADO SÓLIDO	64
6.3.1 Eficiencia de la formación de complejo en estado sólido	65

CONTENIDO	PÁGINA
6.3.2 Caracterización de los complejos de inclusión obtenidos por co-precipitación y Liofilización	67
6.3.2.1 Caracterización por calorimetría diferencial de barrido.	67
6.3.2.2 Caracterización por espectroscopia Infrarroja.	73
6.3.2.3 Caracterización por microscopia electrónica de barrido	79
6.4 EFECTO DE LAS CICLODEXTRINAS SOBRE LA BARRERA DE PERMEABILIDAD DE LA MUCOSA BUCAL.	84
6.4.1 Efecto de las ciclodextrinas sobre la barrera de permeabilidad de la mucosa bucal por medio de calorimetría diferencial de barrido.	84
6.4.2 Efecto de las ciclodextrinas sobre la barrera de permeabilidad de la mucosa bucal por medio de espectroscopia infrarroja	89
6.5 PERMEACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL CLORAMBUCILO Y SUS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS A TRAVÉS DE MUCOSA BUCAL DE CERDO.	94
6.5.1 Efecto de la ciclodextrina sobre el flujo de clorambucilo	95
6.5.2 Efecto del método de preparación del complejo sobre el flujo de clorambucilo	98
6.5.3 Efecto del pre-tratamiento con CDs sobre la permeación de CHL	103
6.5.4 Cantidad retenida en la mucosa bucal porcina después de la permeación de CHL.	105
VII CONCLUSIONES	107
VIII REFERENCIAS	110
IX ANEXOS	121
9.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN	121
9.1.1 Curvas de calibración obtenidas por HPTLC, para la cuantificación de CHL en las pruebas de solubilidad, estabilidad y eficiencia de encapsulamiento.	121

CONTENIDO	PÁGINA
9.1.1.1 Curva de calibración de CHL en regulador de fosfatos pH 7.4	121
9.1.1.2 Curvas de calibración de CHL en regulador de fosfatos pH 7.4 con diferentes concentraciones de DM- β -CD	122
9.1.1.3 Curvas de calibración de CHL en regulador de fosfatos pH 7.4 con diferentes concentraciones de TM- β -CD.	124
9.1.1.4 Curvas de calibración de CHL en regulador de fosfatos pH 7.4 con diferentes concentraciones de HP- β -CD.	126
9.1.2 Curvas de calibración obtenidas por espectroscopia UV-VIS, en solución reguladora de fosfatos pH 7.4, con diferentes concentraciones de M- β -CD, a 255 nm, en contacto con mucosa bucal durante 8 h, utilizadas para la cuantificación de CHL durante las permeaciones.	128
9.1.2.1 Curva de calibración de CHL en regulador de fosfatos pH 7.4.	130
9.1.2.2 Curvas de calibración de CHL en regulador de fosfatos pH 7.4, con diferentes concentraciones de M- β -CD.	130
9.1.2.3 Curva de calibración de CHL en metanol, en contacto con mucosa bucal durante 8 h. Utilizada para la cuantificación de CHL extraído de la mucosa bucal porcina después de las permeaciones.	132
9.2 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LA SOLUBILIDAD	133
9.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ESTABILIDAD DEL CHL CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CICLODEXTRINA.	133
9.4 ANÁLISIS DE VARIANZA DEL EFECTO DE LAS CDS SOBRE LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE LA MUCOSA BUCAL.	137
9.5 PERMEACIONES	143
9.5.1 Resultados numéricos de las permeaciones realizadas	143
9.5.2 Análisis estadístico de los estudios de permeación in vitro del clorambucilo y de sus complejos de inclusión.	153

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	NOMBRE	PÁGINA
1	Fármacos útiles en enfermedades neoplásicas (Calabresi y Chabner, 1989).	7
2	Tiempos de vida media para el CHL	11
3	Modificaciones químicas realizadas al CHL	12
4	Ventajas de la vía de administración bucal	15
5	Composición lipídica de la mucosa oral del cerdo. (Veuillez et al., 2001).	22
6	Promotores químicos de penetración bucal (Senel et al., 2001)	24
7	Propiedades físicas de las ciclodextrinas (Modificada de Bekers et al., 1991 y Loftsson et al., 1996).	30
8	Derivados de las ciclodextrinas (α , β y γ) utilizados en investigación farmacéutica (modificada de Loftsson, 1996; Stella, 1997 y Rajewski, 1996)	32
9	Formulaciones farmacéuticas comerciales a base de Ciclodextrinas (Giordano, 2001).	39
10	Constantes de estabilidad para los complejos formados entre el CHL y ciclodextrinas.	55
11	Grado y constantes de estabilidad de CHL-CD a 37°C y regulador de fosfatos pH 7.4	60
12	Eficiencia de encapsulamiento (n=3)	66
13	Eventos térmicos presentados por los complejos CHL-CD	70
14	Bandas de absorción infrarroja características (cm^{-1}) para clorambucilo y los complejos formados con ciclodextrinas.	73
15	Parámetros termotrópicos de la mucosa bucal porcina para la transición a $\sim 78^\circ\text{C}$. (n = 5)	86
16	Números de onda para las bandas simétricas (2850cm^{-1}) y asimétricas (2920cm^{-1}) de los lípidos de la mucosa bucal ($\mu \pm \text{S.D}$, n = 6)	90

TABLA	NOMBRE	PÁGINA
17	Áreas bajo la curva de la región simétrica y asimétrica de los lípidos de la mucosa bucal. (promedio de 6 determinaciones.)	91
18	Efecto del método de preparación del complejo y tipo de ciclodextrina sobre el flujo de clorambucilo a través de mucosa bucal.	96
19	Efecto del pre-tratamiento con CDs sobre el flujo de CHL.	103

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	NOMBRE	PÁGINA
1	Desarrollo del cáncer. Tomada de www.linfoma.net/v2/home2.php?p=7	4
2	Ciclo celular. Modificado de: http://www.whfreeman.com/life/update/ .	6
3	Estructura química del clorambucilo	8
4	Mecanismo de acción del clorambucilo (Chabner et al., 1989)	10
5	Mecanismo de la degradación del CHL en solución acuosa (Loftsson et al., 1989).	12
6	Estructura general de la mucosa bucal (Mitchell et al., 2003)	16
7	Variaciones regionales en la cavidad oral (Jacques et al, 1998)	17
8	Representación esquemática detallada del epitelio bucal (Junginger, 1999)	20
9	Rutas de penetración endotelial: a) transcelular b) intercelular (Senel y Hincal, 2001)	23
10	Figura 10. Estructura general de la β -CD (Lloyd, 1998).	28
11	Dimensiones de las ciclodextrinas (Cerestar.com)	29
12	Ilustración esquemática de la formación del complejo 1:1 (Rajewski y Stella, 1996)	34
13	Interacción p-xileno-ciclodextrina. (http://www.aqfu.org.uy/nueva/revistas/29/revista_N29_noviembre_2000_electroforesis_capilar_04.htm)	35
14	Celda de difusión tipo Franz, para estudios de permeación <i>in vitro</i> .	50
15	Diagramas de solubilidad de fases, tomada de: http://club.telepolis.com/jjtorresl/doc/USC/ciclodextrinas_imagenes .	53
16	Diagrama de solubilidad del CHL en la presencia de DM- β -CD (●), TM- β -CD (■) y HP- β -CD (▲) en solución acuosa a 37°C y pH 7.4.	54

FIGURA	NOMBRE	PÁGINA
17	Hidrólisis del CHL en la presencia de varias concentraciones de DM- β -CD. (♦) 0.0 %; (■) 1.0%; (▲) 2.5%; (x) 5.0 %; (*) 8.7 %	58
18	Hidrólisis del CHL en la presencia de varias concentraciones de HP- β -CD. (♦) 0.0 %; (■) 0.06 %; (▲) 1.0 %; (x) 2.5 %; (*) 5.0%; (●) 8.7%; (+) 10.0%	59
19	Hidrólisis en la presencia de varias concentraciones de TM- β -CD. (♦) 0.0% (■) 0.06 %; (▲) 1.25 %; (x) 2.5%; (*) 5.0% (●) 8.7 %	59
20	Constantes de degradación para el CHL como una función de la concentración de CD, en regulador de fosfatos a 37°C. (♦) TM- β -CD; (▲) DM- β -CD; (■) HP- β -CD	61
21	Gráfica de Lineweaver-Burk (de acuerdo a la ecuación 3 y a los datos de las figuras 17, 18 y 19). (♦) TM- β -CD; (▲) DM- β -CD; (■) HP- β -CD	62
22	Termogramas para (A) Clorambucilo, (B) DM- β -CD, (C) Mezcla física DM- β -CD:CHL, (D) Complejo DM- β -CD:CHL CP y (E) Complejo DM- β -CD:CHL Lio	68
23	Termogramas para (A) Clorambucilo, (B) TM- β -CD, (C) Mezcla física TM- β -CD:CHL, (D) Complejo TM- β -CD:CHL CP y (E) Complejo TM- β -CD:CHL Lio	69
24	Termogramas para (A) Clorambucilo, (B) HP- β -CD, (C) Mezcla física HP- β -CD:CHL, (D) Complejo 2HP- β -CD:CHL CP y (E) Complejo 2HP- β -CD:CHL Lio	69
25	Espectros de absorción infrarroja de los sistemas DM- β -CD : CHL (a) CHL, (b) Mezcla DM- β -CD : CHL (c), DM- β -CD : CHL CP y (d) DM- β -CD : CHL Lio	74
26	Espectros de absorción infrarroja de los sistemas TM- β -CD: CHL (a) CHL, (b) Mezcla TM- β -CD : CHL, (c) TM- β -CD : CHL CP y (d) TM- β -CD : CHL Lio	75

FIGURA	NOMBRE	PÁGINA
27	Espectros de absorción infrarroja de los sistemas HP- β -CD : CHL: (a) CHL, (b) Mezcla HP- β -CD : CHL, (c) HP- β -CD : CHL CP y (d) HP- β -CD : CHL Lio	77
28	Micrografías electrónicas de: (A) Mezcla física CHL: HP- β -CD, (B) Complejo HP- β -CD: CHL CP (C) Complejo HP- β -CD: CHL Lio. Imágenes tomadas con la asistencia del técnico Rodolfo Robles de la FES-C.	79
29	Micrografías electrónicas de: (A) Mezcla física CHL: DM- β -CD, (B) Complejo DM- β -CD: CHL CP (C) Complejo DM- β -CD: CHL Lio. Imágenes tomadas con la asistencia del técnico Rodolfo Robles de la FES-C.	80
30	Micrografías electrónicas de: (A) Mezcla física CHL: TM- β -CD, (B) Complejo TM- β -CD: CHL CP (C) Complejo TM- β -CD: CHL Lio. Imágenes tomadas con la asistencia del técnico Rodolfo Robles de la FES-C.	81
31	Complejo CHL: β -CD	83
32	Termograma de la mucosa bucal hidratada.	84
33	Termogramas de la mucosa bucal porcina con diferentes tratamientos. (A) Sin tratamiento, (B) Tratada con DM- β -CD, (C) Tratada con TM- β -CD y (D) Tratada con HP- β -CD	85
34	Efecto del tratamiento sobre la T _M de los lípidos de la mucosa bucal porcina (n = 5).	86
35	Efecto del tratamiento sobre el calor de fusión de la temperatura de transición de los lípidos de la mucosa bucal porcina (n = 5).	88
36	Espectros de absorción Infrarroja de la mucosa bucal de cerdo con y sin tratamiento.	89
37	Números de onda para las bandas de estiramiento simétricas de los lípidos de la mucosa bucal.	90

FIGURA	NOMBRE	PÁGINA
38	Números de onda para las bandas de estiramiento asimétricas de los lípidos de la mucosa bucal.	90
39	Área bajo la curva de la banda de estiramiento simétrico de los lípidos de la mucosa bucal.	91
40	Área bajo la curva de la banda de estiramiento asimétrico de los lípidos de la mucosa bucal.	92
41	Cinética de permeación del CHL y sus complejos de inclusión obtenidos por co-precipitación. -◆-CHL, -■- DM-β-CD, -▲- TM-β-CD y -●- HP-β-CD	95
42	Cinética de permeación del CHL y sus complejos de inclusión obtenidos por liofilización. -◆-CHL, -■- DM-β-CD, -▲- TM-β-CD y -●- HP-β-CD	95
43	Cantidad acumulada de CHL a las 8h, (1) CHL. (2) Co-precipitado DM-β-CD, (3) Liofilización DM-β-CD, (4) Pre-tratamiento DM-β-CD, (5) Co-precipitado TM-β-CD, (6) Liofilización TM-β-CD, (7) Pre-tratamiento TM-β-CD, (8) Co-precipitado HP-β-CD, (9) Liofilización HP-β-CD, (10) Pre-tratamiento HP-β-CD.	97
44	Cinética de permeación del CHL y sus complejos de inclusión obtenidos con (A) DM-β-CD, (B) TM-β-CD y (C) HP-β-CD. -◆-CHL, -■- Co-precipitación -▲- Liofilización.	98
45	Liberación y absorción del fármaco a partir del complejo de inclusión. Modificada de: http://club.telepolis.com/jjtorresl/doc/USC/ciclodextrinas_imagenes.htm	100
46	Efecto de HP-β-CD y PM-β-CD sobre el flujo de bupranolol (Tomada de Babu., et al 2004)	102
47	Cinética de permeación del CHL utilizando como promotor las ciclodextrinas -◆-CHL, -■-DM-β-CD, -▲-TM-β-CD y -●- HP-β-CD	103

FIGURA	NOMBRE	PÁGINA
48	CHL retenido en la mucosa bucal, (1) CHL, (2) Co-precipitado DM- β -CD, (3) Co-precipitado TM- β -CD, (4) Co-precipitado HP- β -CD, (5) Liofilización DM- β -CD, (6) Liofilización TM- β -CD, (7) Liofilización HP- β -CD, (8) Pre-tratamiento DM- β -CD, (9) Pre-tratamiento TM- β -CD y (10) Pre-tratamiento HP- β -CD.	105

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ABC	Área bajo la curva
ADN	Ácido desoxirribonucleico
α -CD	Alfa-Ciclodextrina
β -CD	Beta-Ciclodextrina
BPL	Bupranolol
CHL	Clorambucilo
CD	Ciclodextrina
CDs	Ciclodextrinas
CGT	Ciclodextrina glucosil transferasa
CHLOH	Derivado mono-hidroxilado del clorambucilo
CHL(OH) ₂	Derivado di-hidroxilado del clorambucilo
CP	Co-precipitación
Δ H	Entalpía
DMA	
DM- β -CD	Heptakis (2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina
DM- β -CD:CHL CP	Complejo formado por co-precipitación
DM- β -CD:CHL Lio	Complejo formado por liofilización
DPPC	1-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido (" <i>Differential scanning calorimetry</i> ")
e.g.	Por ejemplo (" <i>exempli gratia</i> ")
FTIR/ATR	Espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier a través de reflectancia total atenuada.
γ -CD	Gamma-Ciclodextrina
GS	Grado de sustitución
HP- β -CD	Hidroxiopropil- β -ciclodextrina
HP- β -CD:CHL CP	Complejo formado por co-precipitación

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
HP-β-CD:CHL Lio	Complejo formado por liofilización
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución (" <i>High Performance Liquid chromatography</i> ")
HPTLC	Cromatografía en capa fina de alta resolución (" <i>High Performance Thin Layer chromatography</i> ")
Lio	Liofilización
OH	Hidroxilo
p	Probabilidad
p.a.	Principio activo
p/v	Peso/volumen (g/100ml)
PLA	Ácido poliláctico
PLA/GA	Ácido poliláctico Co-glicólico
PM	Peso molecular
RM-β-CD	b-Ciclodextrina metilada al azar
rpm	Revoluciones por minuto
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia humana
S ₀	Solubilidad intrínseca
TEM	Tenoxicam
T _M	Temperatura de fusión
TM-β-CD	Heptakis (2,3,6-tri-O-metil)-β-ciclodextrina
TM-β-CD:CHL CP	Complejo formado por co-precipitación
TM-β-CD:CHL Lio	Complejo formado por liofilización
USP	Farmacopea de los Estados Unidos, (" <i>United States Pharmacopea</i> ")
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

I. RESUMEN

Este trabajo propone el uso de ciclodextrinas (CDs) para modificar la solubilidad y estabilidad acuosa y absorción del clorambucilo (CHL), el cual es un fármaco anticancerígeno con baja solubilidad y estabilidad en medio acuoso. Las ciclodextrinas que se usaron con esta finalidad fueron la 2,6-di-O-metil- β -ciclodextrina (DM- β -CD), la 2,3,6-tri-O-metil- β -ciclodextrina (TM- β -CD) y la hidroxipropil - β -ciclodextrina (HP- β -CD), ver tabla 8.

La solubilidad del CHL fue determinada en varias concentraciones de las CDs estudiadas a 37°C y pH 7.4, encontrándose que las tres ciclodextrinas aumentan la solubilidad del CHL, se calcularon las constantes de unión a partir de los diagramas de solubilidad, observándose que este método provee sólo datos cualitativos sobre la unión entre el CHL y las CDs estudiadas debido a la rápida degradación del fármaco.

La cinética de degradación de CHL fue estudiada en función del tipo y concentración de la ciclodextrina a 37 °C y pH 7.4. Estos estudios indican que la reactividad del fármaco cuando se encuentra formando complejos de inclusión con las ciclodextrinas es significativamente menor que cuando se encuentra en estado libre.

Se obtuvieron los complejos de inclusión en estado sólido entre el clorambucilo y las ciclodextrinas estudiadas por el método de co-precipitación y liofilización y se caracterizaron por espectroscopia infrarroja, microscopía electrónica de barrido y calorimetría diferencial de barrido, encontrándose que el método de co-precipitación conduce a la formación de un complejo real, mientras que el proceso de liofilización conduce a la formación de una dispersión sólida amorfa.

Se determinó la influencia de las ciclodextrinas sobre las propiedades estructurales de la mucosa bucal por medio de espectroscopia infrarroja y calorimetría diferencia de barrido. Los resultados muestran que las CDs estudiadas causan extracción y posible desorganización de los lípidos de membrana.

Uno de los propósitos de este trabajo fue determinar el efecto de las ciclodextrinas sobre la penetración transbucal in vitro del CHL y de sus complejos de inclusión con ciclodextrinas. Así mismo se evaluó el efecto del pre-tratamiento de la mucosa bucal con CDs sobre la absorción del CHL, estos experimentos de permeación *in vitro* fueron llevados a cabo en celdas de difusión tipo Franz. La permeación del CHL incrementó significativamente cuando se encuentra formando un complejo de inclusión con la DM- β -CD, mientras que la formación de complejos con la TM- β -CD e HP- β -CD disminuyen la permeación. El pre-tratamiento de la mucosa bucal con DM- β -CD y TM- β -CD favorecen ligeramente la permeación del CHL, sin embargo la HP- β -CD la disminuye.

II. INTRODUCCIÓN

La forma de administrar las sustancias activas ha cambiado radicalmente en las últimas tres décadas. Las formas convencionales han perdido funcionalidad debido a la inespecificidad del tratamiento, la constante intervención del paciente y los efectos adversos generados. Términos tales como sistemas de liberación controlada, prolongada, extendida, vectores farmacéuticos, sistemas terapéuticos, etc., engloban el creciente interés de los investigadores farmacéuticos en desarrollar nuevas formas de dosificación de activos capaces de optimizar la forma y rapidez de entrega del fármaco y el lugar de su liberación. Solo después de considerar las características del fármaco, la enfermedad y destino al cual va dirigido es posible definir el sistema de liberación más adecuado. Sin embargo, en muchos casos es necesario desarrollar un sistema de liberación nuevo para llegar a conocer problemas y necesidades específicas.

Existen muchas clases de fármacos que pueden producir beneficios cuando son administrados en forma controlada, siendo especialmente importantes los utilizados en el tratamiento de afecciones de tipo crónico, destacándose agentes quimioterapéuticos, inmunosupresores, proteínas, enzimas y hormonas. Muchos de los agentes anticancerígenos (clorambucilo, taxol, melfalan etc.) tienen varios problemas de formulación. En particular el clorambucilo tiene una baja solubilidad y estabilidad en medio acuoso, dando como consecuencia que la absorción del mismo por vía oral sea variable.

La administración bucal, así como el uso de ciclodextrinas ofrecen una alternativa para la administración del clorambucilo.

La posibilidad de la administración de fármacos a través de la mucosa bucal cada vez es más conocida y están apareciendo más productos en el mercado. La barrera de permeabilidad de la mucosa bucal no es absoluta y hay la posibilidad de que ciertas sustancias penetren el tejido subyacente o incluso alcancen la circulación general, esto ha dado origen a numerosos estudios sobre la penetración de sustancias de diversa índole, se puede decir que estos estudios buscan fundamentalmente responder a las siguientes interrogantes: ¿Cuál es el grado y rapidez de penetración de una sustancia?, ¿Cómo puede verse comprometida la barrera de permeabilidad? y ¿Qué estrategias existen para favorecer el paso de sustancias de interés a través de las mucosas?

Las limitaciones de ésta vía de administración está principalmente asociada con la función de barrera del epitelio, la baja permeabilidad de la mayoría de las sustancias a través de la mucosa bucal, ha guiado las investigaciones hacia la búsqueda de estrategias para favorecer el transporte, entre ellas podemos mencionar el uso de promotores de absorción, con los cuales se pretende aumentar la permeabilidad del tejido.

Las ciclodextrinas (CDs) constituyen una clase de intensificadores de penetración que tienen ventajas sobre otros intensificadores convencionales, algunos derivados de las CDs forman complejos de inclusión con diversas moléculas de interés farmacéutico para establecer rápidamente el equilibrio con moléculas libres de fármaco en la formulación, resultando en un incremento de la biodisponibilidad. También pueden utilizarse para evitar efectos colaterales indeseables asociados a los fármacos. La investigación actual está examinando la efectividad de las CDs como promotores de absorción.

Es generalmente aceptado que las CDs funcionan como verdaderos acarreadores de fármacos, ya que mantienen las moléculas hidrofóbicas en solución y las liberan en la superficie de las membranas biológicas (piel, mucosa nasal, bucal, cornea) donde estos migran hacia la membrana y las CDs se quedan en el exterior de la membrana.

III. ANTECEDENTES

3.1 CLORAMBUCILO

3.1.1 Cáncer

La palabra cáncer tiene su origen en el latín *Cancris* (cangrejo), se dice que las formas de cáncer avanzado adoptan una forma abigarrada, con ramificaciones, similar a la de un cangrejo marino y de ahí deriva su nombre. Todos los cánceres comparten la característica de ser un trastorno en el control normal de la división, crecimiento y diferenciación celular. Las manifestaciones clínicas son muy diversas ya que puede aparecer en cada órgano o tejido del organismo y tiene la capacidad de expandirse o aparecer en otras zonas. El cáncer se produce por mutaciones en células somáticas, producidas por errores intrínsecos en la replicación, reparación y segregación del ácido desoxirribonucleico (ADN), se necesitan varias mutaciones a lo largo de años para que se produzcan células malignas (Peralta et al., 1997). Estas células son defectuosas, no maduran y pierden su capacidad de diferenciación, al no madurar, no mueren (están "inmortalizadas") y para mantenerse segregan sustancias que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), por lo que el tumor se desarrolla sin límites. Las células del tumor pueden trasladarse a través del torrente sanguíneo y/o linfático a otras partes del cuerpo donde continúa creciendo (metástasis). En la figura 1, se ejemplifica el desarrollo del cáncer.

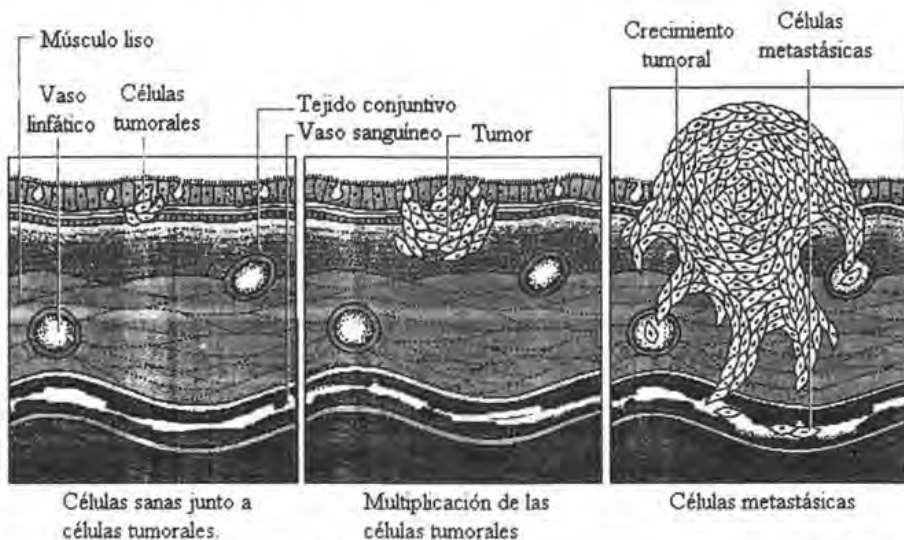


Figura 1. Desarrollo del cáncer. Tomada de www.linfoma.net/v2/home2.php?p=7

El cáncer es una enfermedad curable si se detecta en etapas tempranas. En los últimos treinta años la incidencia del cáncer ha aumentado en México, a partir de la década de los noventa las neoplasias malignas ocupan el segundo lugar como causa de muerte entre la población general de México después de las enfermedades cardiovasculares (INEGI, 2000).

Existen varios tratamientos para el cáncer, los cuales son: cirugía, radioterapia y quimioterapia, los dos primeros se utilizan para casos en que el cáncer está limitado a una zona y la quimioterapia se utiliza para tratar las células cancerosas que se han propagado o producido metástasis. Dependiendo del tipo de cáncer y de su etapa del desarrollo, la quimioterapia puede ser utilizada para: curar el cáncer, evitar que se extienda, hacer más lento su crecimiento, eliminar las células cancerosas que se han extendido a otras partes del cuerpo o aliviar los síntomas causados por el cáncer. En la tabla 1 se muestran los principales tipos de fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer.

Desde hace muchos años, diversos investigadores se han enfocado a diseñar moléculas nuevas o modificar las ya existentes, capaces de controlar el cáncer. Es necesario conocer la cinética de los ciclos celulares para el empleo adecuado de los medicamentos antineoplásicos. Muchos de los agentes citotóxicos más potentes actúan en fases específicas del ciclo celular y por lo tanto actúan solo contra células que están en proceso de división. Por ello las neoplasias del ser humano que muestran mayor susceptibilidad a las medidas quimioterapéuticas son las que tienen una gran tasa de proliferación y crecimiento, es decir que cuentan con un elevado número de células en proceso de división. Existen diferencias en la duración del ciclo celular según el tipo de célula, pero todos los tipos muestran un patrón semejante en el proceso de división.

El ciclo (figura 2) puede describirse con las siguientes etapas:

- 1) Fase presintética (G_1)
- 2) Fase de síntesis de ADN (S)
- 3) Fase postsintética (G_2)
- 4) Mitosis (M)

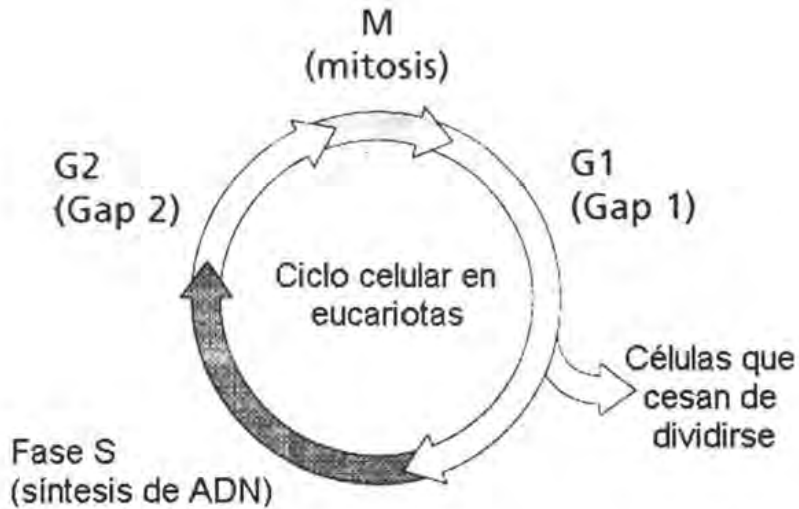


Figura 2. Ciclo celular. Modificado de: <http://www.whfreeman.com/life/update/>.

Casi todos los antineoplásicos actúan de manera específica en procesos como la síntesis de ADN o el huso mitótico. Otros bloquean la síntesis de precursores del ADN o dañan la integridad de dicho ácido nucleico. La mayoría de los antineoplásicos conocidos tienen mayor eficacia contra células en fase de proliferación activa, pero algunos afectan las células únicamente durante la fase S o en la mitosis y no destruirán células que no estén en proceso de división.

La naturaleza del tratamiento oncológico y sus métodos fundamentales cambia constantemente ya que pocas categorías de medicamentos de uso común tienen un índice terapéutico más estrecho y una mayor probabilidad de ocasionar efectos dañinos, que los que muestran los fármacos antineoplásicos. Es poco probable que los nuevos medicamentos sustituyan por completo a los ya existentes, dado que la eficacia de estos se incrementa constantemente y se ha podido controlar y pronosticar su toxicidad. Su utilización ha mejorado gracias a factores como los siguientes:

- a) Actualmente las personas tienden a revisarse de manera periódica, detectándose la enfermedad en su inicio, por lo que los fármacos anticancerosos se usan en una etapa temprana de la enfermedad, cuando los tumores son más curables y el paciente tiene mayor posibilidad de tolerar el tratamiento.

- b) Uno de los principales efectos adversos del tratamiento oncológico es la leucopenia, actualmente se cuenta con el factor de crecimiento de granulocitos, por lo que se acorta el periodo de leucopenia.
- c) La mejor comprensión de los mecanismos de la resistencia de las células tumorales a los quimioterapéuticos ha permitido la integración racional de los regimenes medicamentosos.

Tabla 1. Fármacos útiles en enfermedades neoplásicas (Calabresi y Chabner, 1989)

Clase	Tipo de agente	Ejemplos
Agentes de alquilación	Mostazas nitrogenadas	Mecloretamina, ciclofosfamida, melfalan, clorambucilo.
	Etileniminas	Hexametilmelamina.
	Alquilsulfonatos	Busulfán.
	Nitrosoureas	Carmustina, Lomustina, estreptozocina.
Antimetabolitos	Triazenos	Dacarbazina.
	Análogos del ácido fólico	Metotrexato.
	Análogos de pirimidina	5-fluorouracilo, floxuridina, Citarabina.
Productos naturales	Análogos de purina	Mercaptopurina, tioguanina.
	Alcaloides de vinca	Vinblastina, vincristina.
	Epipodofilotoxinas	Etopósido, Tenipósido.
	Antibióticos	Dactinomicina, doxorubicina, mitomicina C.
	Enzimas	L-asparaginasa.
Agentes diversos	Modificadores de respuestas biológicas.	Interferón alfa.
	Complejos de coordinación	Cisplatino
	Urea sustitutiva	Hidroxiurea
	Derivados de metilhidrazina	Procarbazina
	Hormonas antágonistas	Corticosteroides suprarrenales
Progestágenos		Acetato de megestrol, caproato de hidroxiprogesterona.
Estrógenos		Dietilestilbestrol, etinilestradiol.
Antiestrógeno		Tamoxifeno
Andrógenos		Propionato de testosterona.
	Antiandrógeno	Flutamida.

3.1.2 Agentes Alquilantes.

Los agentes alquilantes permanecen como una clase efectiva de fármacos anticancerígenos, cuya citotoxicidad y efectos terapéuticos se derivan de su habilidad para formar entrecruzamientos con el ADN. La mayoría de los agentes alquilantes son bifuncionales y pueden inducir la formación de entrecruzamientos ADN-proteína y ADN-ADN, las cuales son lesiones citotóxicas.

Las mostazas nitrogenadas representan a uno de las cinco principales clases de fármacos anticancerígenos que actúan como entrecruzadores del ADN. Estos fármacos incluyen: mostazas nitrogenadas, aziridinas, alcanos sulfonatos y nitrosoureas.

Las mostazas nitrogenadas fueron una de las primeras clases de agentes quimioterapéuticos sistemáticamente estudiados que aun se usan clínicamente. Desde que estas fueron usadas por primera vez en el tratamiento de un paciente con linfosarcoma en 1942, muchos agentes alquilantes han sido sintetizados y probados para verificar su actividad antitumoral.

3.1.3 Clorambucilo

El Clorambucilo (CHL, figura 3), ácido 4-[p-(bis [2-cloroetil] amino) fenil] butírico, es un agente alquilante bifuncional, derivado aromático de las mostazas nitrogenadas, sintetizado originalmente por Everett en 1953. Este agente alquilante bifuncional también llamado leukeran ha sido usado clínicamente desde 1961 en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica, que es la forma de leucemia más común en los países occidentales, linfomas de Hodgkin, linfomas malignos y en carcinomas de seno y ovario. El uso óptimo del CHL aún no ha sido establecido, no obstante, a que sirve de referencia natural cuando se prueba un nuevo análogo a las purinas en pruebas clínicas.

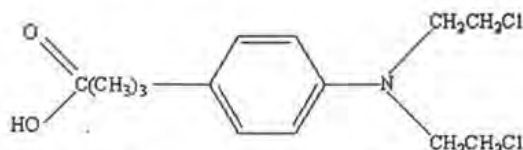


Figura 3. Estructura química del clorambucilo

La combinación química del grupo reactivo amino bis-(2-cloroetil) con un ácido carboxílico aromático, se realizó para facilitar la absorción a través de las membranas biológicas. (Paci et al., 2001).

3.1.3.1 Mecanismo de acción del CHL

El CHL tiene la propiedad de tomarse en un electrófilo potente, por la formación de intermediarios del ión carbenio o de estados transicionales con las moléculas blanco en las que actúan. Estas reacciones generan enlaces covalentes, por alquilación de diversas fracciones nucleófilas, como los grupos fosfato, amino, sulfhidrilo, hidroxilo, carboxilo e imidazol. El átomo de nitrógeno 7 de la guanina es particularmente susceptible a la formación de enlaces covalentes con los agentes de alquilación monofuncionales y bifuncionales, sin embargo también pueden ser alquilados en menor grado otros átomos en las bases de purina y pirimidina del ADN, así como los átomos de fosfato en las cadenas de ADN y las proteínas. En la figura 4 se ejemplifica el mecanismo de acción del CHL.

La alquilación procede a través de un ión cíclico intermediario etileniminio o un ión carbenio intermediario susceptible al ataque nucleofílico por componentes de la doble hélice del ADN (Loftsson et al, 1989).

La alquilación del nitrógeno 7 de los residuos guanínicos del ADN tiene considerables efectos biológicos, la guanina modificada (alquilada) puede no acoplarse a los residuos timidínicos durante la síntesis del ADN, además la alquilación del nitrógeno 7 hace lábil el anillo imidazol y permite su apertura o despurinización, cualquiera de estos dos eventos lesiona la molécula de ADN. En el caso del CHL que es bifuncional, la segunda cadena lateral 2-cloroetilo puede alquilar un segundo residuo guanidínico o cualquier otra fracción nucleófila, produciéndose enlaces cruzados entre dos cadenas de ADN o entre ADN y una proteína.

3.1.3.2 Metabolismo, excreción y toxicidad

A pesar de la extensa oxidación de la cadena lateral, el CHL no requiere metabolismo específico en los tejidos para generar la forma activa, como otros agentes alquilantes (Horton et al., 1999). El CHL es metabolizado en la cadena del ácido butírico por una β -oxidación generando un metabolito tóxico: mostaza del ácido fenil-acético. El CHL en circulación sistémica tiene una vida media relativamente baja, aproximadamente de 1.5h (Chatterji et al., 1982).

Se ha reportado que cerca del 50% del CHL administrado por vía oral es eliminado por los riñones, principalmente como mono- y dihidroxi-derivados de CHL y menos del 1% de la mostaza del ácido fenil-acético, es excretado sin cambio (Lof et al., 1997).

Desgraciadamente, los tejidos normales que proliferan con rapidez (médula ósea, folículos pilosos y epitelio intestinal) pueden ser lesionados por los agentes anticancerígenos, toxicidad que suele limitar la utilidad de los productos farmacológicos. En particular el CHL produce los siguientes efectos adversos: destrucción de la médula ósea, neurotoxicidad central, desórdenes gastrointestinales, hepatotoxicidad, amenorrea permanente en mujeres y azoospermia irreversible en hombres (Calabresi y Bruce, 1989).

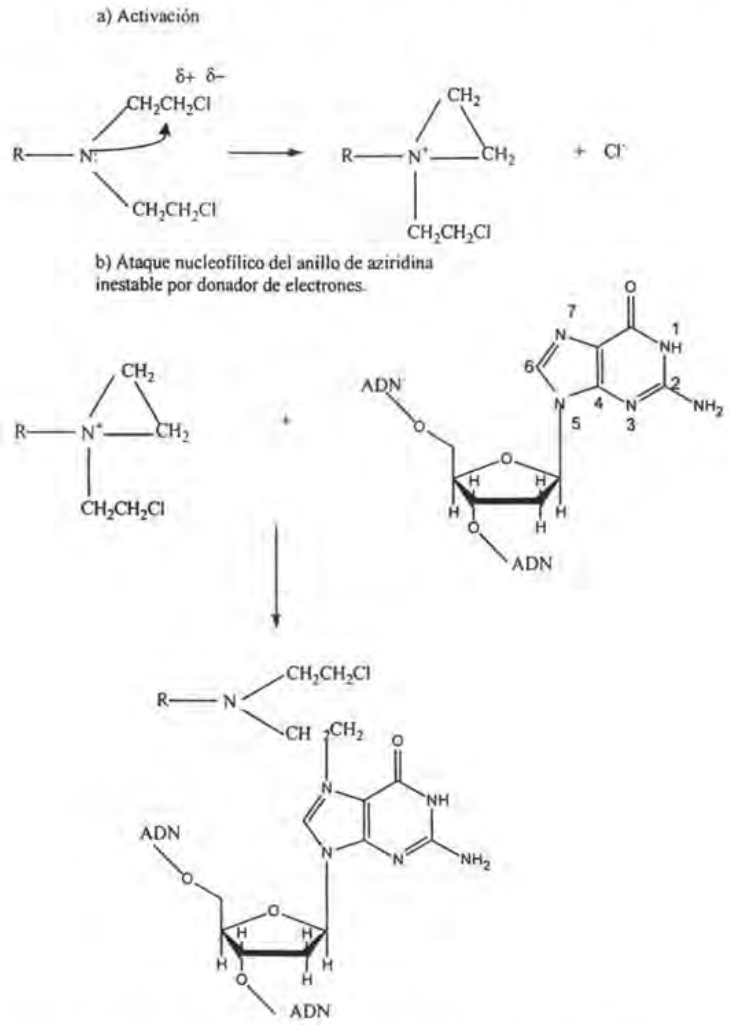


Figura 4. Mecanismo de acción del clorambucilo (Chabner et al., 1989)

3.1.3.3 Hidrólisis del CHL

Como ya se mencionó la actividad farmacológica del CHL está basada en la formación de un intermediario muy reactivo (ión etilenimonio), desafortunadamente este intermediario, esencial para su actividad, se forma rápidamente en solución acuosa, donde es atacado por nucleófilos tales como el agua, por lo que el CHL presenta tiempos de vida media ($t_{1/2}$) muy cortos en solución acuosa. Dependiendo de las condiciones de pH y temperatura se han reportado distintos $t_{1/2}$, en la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos.

Tabla 2. Tiempos de vida media para el CHL

$t_{1/2}$ (minutos)	pH	Temperatura (°C)	Referencia
12	7.4	25	Ehrsson et al., 1980
25	3.0	37	Chatterji et al., 1982
18	5.0	37	Chatterji et al., 1982
9	6.5	25	Green et al., 1989

La degradación del CHL (Figura 5), ocurre por la formación del ión etilenimonio, el cual es formado por el desplazamiento intramolecular del cloro por el nitrógeno. Este ión es muy susceptible a la sustitución por nucleófilos como el agua, por lo que los principales productos de degradación en solución acuosa son los dihidroxi derivados (Loftsson et al., 1989). La formación del ión intermediario es reversible y la adición de cloro en la solución resulta en una menor degradación (Chatterji et al., 1982).

3.1.3.4 Mecanismos para mejorar las propiedades del CHL.

Además de su baja estabilidad en solución acuosa el CHL es prácticamente insoluble en agua. La mayoría de las investigaciones realizadas para mejorar la eficiencia del clorambucilo se han enfocado al diseño de pro-fármacos. En la Tabla 3 se muestran las modificaciones químicas que se le han hecho al CHL, así como el beneficio que aporta dicha modificación.

Se han realizado pocas investigaciones en las que no se realice alguna modificación química al CHL para aumentar su eficiencia, entre ellas están la producción de micro y nano partículas y la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas.

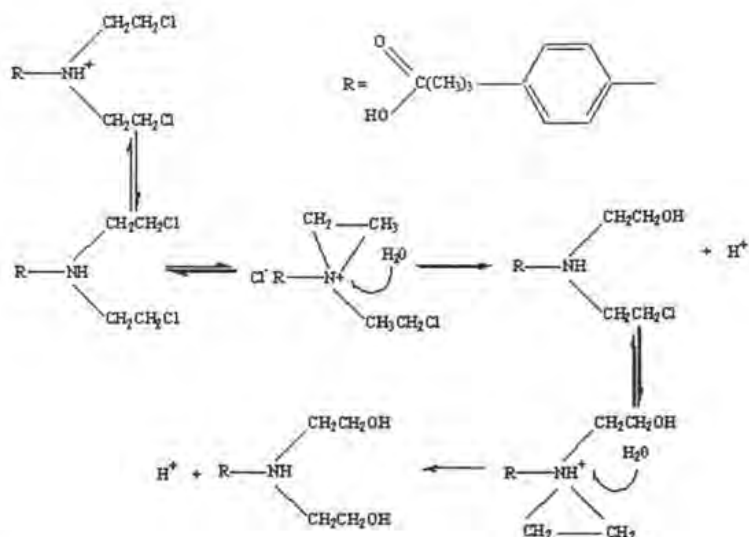


Figura 5. Mecanismo de la degradación del CHL en solución acuosa (Loftsson et al., 1989).

Tabla 3. Modificaciones químicas realizadas al CHL.

Modificación química	Ventaja	Referencia
CHL fluorometilado	Modificación del metabolismo	Coe et al, 1998
CHL-hexopiranos	Aumento de la selectividad (tumores cerebrales)	Iglesias et al, 1999 Halmos et al, 1996
CHL-glicina-tris-monopalmitato	Aumento de la captura celular de CHL	Wells et al, 1999
CHL-lipoaminoácido	Aumento de la citotoxicidad	Wells et al, 1999
CHL-dipalmitoil-seudo glicérido	Aumento de la absorción linfática	Lambert et al, 2000
Dendrimeros	Aumento de la potencia	Sun et al, 2002
(CHL) ₃ -maleimida		Wells et al, 1998
(CHL) ₉ -maleimida		
Inmunoconjugados	Aumento de la selectividad	Sun et al, 2002
Moléculas híbridas	Aumento de los efectos antitumorales	Wittman et al, 2001
CHL-Paclitaxel		
Sistemas de liberación químicos	Aumento del índice terapéutico	Beyer et al, 1999
CHL-Transferrina		
CHL-Albumina		
CHL-Ácido lipoico (ácido 1, 2-ditiol-3-pentanoico)	Selectividad hacia pulmones	Saah et al, 1996
CHL-Esteroide	Mejor efecto terapéutico	Karayianni et al, 2003

En 1995 Leroux et al. prepararon nanopartículas con CHL de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliláctico-coglicólico (PLA/GA 85:15) por el método emulsificación-difusión obteniéndose una eficiencia de encapsulamiento aceptable del 63%

En el 2002 Mi et al. utilizando como modelo al CHL, prepararon microsferas de quitina [poli β (1-4)-D-glucosamina] / PLA/GA (50:50) y se estudió la liberación del fármaco. Se encontró que el modelo de liberación constó de dos fases, una fase inicial rápida en la que se libera el 60% del CHL en 50h, siguiendo una etapa de liberación sostenida por 200 h.

En ambos trabajos el objetivo se concentró en la preparación de nanopartículas ya sea para aumentar la eficiencia del método de preparación o para prolongar la liberación del fármaco, utilizando diferentes proporciones de los polímeros empleados. El método utilizado para determinar la cantidad de CHL liberado o encapsulado fue espectrofotométrico, método que no permite identificar si el CHL se ha hidrolizado.

En la búsqueda de modificar las propiedades fisicoquímicas del CHL sin cambiar su estructura química, Green et al. (1989) investigaron el efecto de la heptakis (2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina (DM- β -CD) sobre la solubilidad y estabilidad acuosa del CHL, encontrando que a una concentración de $1.3 \times 10^{-3}M$ de DM- β -CD la estabilidad aumenta 20 veces (pH 4.13, 37°C) y la solubilidad es aumentada más de cuarenta veces a una concentración de $1.74 \times 10^{-2}M$ de DM- β -CD (pH 4.13, 3.0°C). Loftsson et al. (1989) encontraron que la solubilidad y estabilidad del CHL aumenta conforme se incrementa la concentración de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (2HP- β -CD): a 30°C y 20% de 2HP- β -CD la solubilidad aumenta 18 veces. La estabilidad aumenta 19 veces a pH neutro, 40°C y 5% de 2HP- β -CD en el medio de reacción. Como puede observarse ambos estudios se realizaron bajo condiciones no fisiológicas, es decir a pH 7.4 y a la temperatura corporal 37°C.

Generalmente el CHL se administra por vía oral en tabletas de 2 mg (Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 2000) y aunque el CHL es estable a pH 1 y 37°C, teniendo una vida media de 12 horas, el pH del estómago varía de 1.5 a 5.0, si a pH de 3.0 y 37°C el CHL tiene una vida media de 25 minutos, podría significar que el 10% del fármaco es degradado en 4 minutos (Chatterji et al., 1982). Por lo que la cantidad de CHL disponible para la absorción está en función del pH estomacal a un tiempo determinado, por esta razón hay mucha inconsistencia en la disponibilidad del CHL administrado en forma oral.

Otras formas de dosificación (hospitalización) son a través de inyecciones intravenosas o perfusión y como ya se ha discutido anteriormente en estos medios acuosos el CHL es hidrolizado rápidamente.

Debido a lo anteriormente expuesto es necesario buscar una alternativa para la administración del CHL. Algunas CDs presentan características de bioadhesión, por lo que son candidatas idóneas para ser utilizadas en la liberación de activos vía mucosas. Así la mucosa bucal y el uso de ciclodextrinas ofrecen una buena alternativa.

3.2 ABSORCIÓN BUCAL DE FÁRMACOS

La investigación farmacéutica se centra desde hace muchos años en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad farmacológica que den respuesta terapéutica a enfermedades aún por resolver como el cáncer y el síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA). Pero no por ello olvida a las moléculas con reconocida actividad y de manera simultánea se realizan trabajos enfocados a la búsqueda de novedosas rutas y formas de administración tanto para las moléculas nuevas, como para las ya conocidas.

En los últimos años la administración no invasiva de fármacos ha tomado gran interés. Como una alternativa para la liberación parenteral, continuamente se desarrollan nuevos sistemas para optimizar la liberación de fármacos metabólicamente inestables. Las rutas transmucosales como la nasal, rectal, bucal, sublingual y vaginal, tienen un gran potencial para la administración de fármacos. Particularmente la mucosa bucal ofrece varias ventajas para la liberación de fármacos las cuales se enlistan en la Tabla 4.

La absorción de fármacos a través de la mucosa oral fue observada por primera vez con la nitroglicerina por Sobrero en 1847. A partir de este hecho la mucosa bucal ha sido investigada como un sitio potencial para la liberación controlada de fármacos cardiovasculares (nitroglicerina, dinitrato de isosorbide, propanolol y nifedipina), analgésicos opioides (morfina y sus derivados) y agentes macromoleculares hidrofílicos, como proteínas, péptidos y polisacáridos, entre los que se pueden mencionar a la insulina, vasopresina, α -amilasa, calcitonina, interferon- α_2 , etc. (Merkle, et al., 1992 y Nozaki et al., 1997)

Tabla 4. Ventajas de la vía de administración bucal

- * Se evita el efecto de primer paso hepático
 - * Se evita el metabolismo pre-sistémico en el tracto gastrointestinal (TGI)
 - * Fácil administración
 - * No dolorosa
 - * Vascularización muy desarrollada
 - * Poca o nula irritación
 - * Aceptabilidad por parte del paciente
 - * Excelente accesibilidad
 - * Seguridad de empleo (es posible retirar el medicamento en caso de urgencia.)
 - * La robustez de la mucosa facilita la utilización de promotores de absorción
 - * Poca variación del pH, con respecto al TGI
 - * Actividad enzimática local inferior a la encontrada en otras mucosas
 - * Posibilidad de localizar con precisión un dispositivo de liberación
-

3.2.1 Características estructurales de la mucosa bucal

La cavidad oral está cubierta con una membrana mucosa con un área superficial total de 100 cm^2 , sirve para proteger las estructuras subyacentes a ella de las influencias externas, como la entrada de sustancias potencialmente peligrosas (Veuillez et al., 2001)

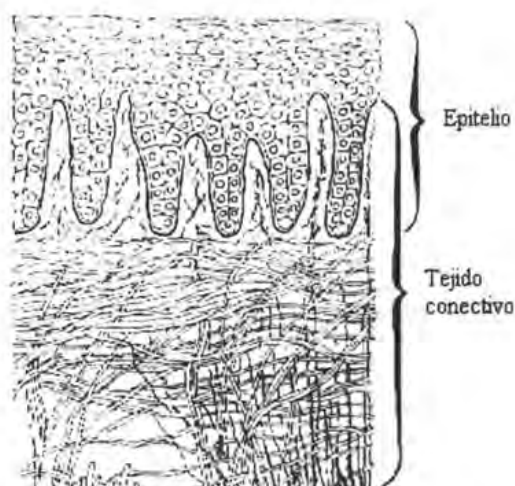


Figura 6. Estructura general de la mucosa bucal (Mitchell et al., 2003) .

La mucosa bucal está constituida por un epitelio de recubrimiento y por tejido conectivo laxo que sostiene y nutre al epitelio, llamado lámina propia (Castellanos, 2002). El epitelio de la mucosa oral está formado por multicapas celulares (40-50 células) cubiertas por moco, es común observar prolongaciones epiteliales hacia el tejido conectivo, denominadas digitaciones (Shojaei, 1998), ver Figura 6.

El epitelio presenta diferentes patrones de maduración relacionados con las demandas funcionales del tejido, pudiendo ser queratinizado o no-queratinizado. Como puede apreciarse en la Figura 7, se reconocen tres tipos de mucosa oral:

- a) Mucosa masticatoria; esta cubre la encía y el paladar duro, regiones que son susceptibles al estrés y tensión producidos por la masticación. Estas regiones están cubiertas por un epitelio queratinizado, parecido al de la piel en su patrón de maduración.

- b) Mucosa especializada; esta se encuentra en el dorso de la lengua y se caracteriza por poseer una superficie mixta, con áreas de epitelio queratinizado y áreas de epitelio no queratinizado.
- c) Mucosa de recubrimiento; ésta cubre las regiones restantes, como los labios y el interior de las mejillas. Esta superficie elástica es capaz de distenderse durante el proceso de masticación y el habla. El epitelio es no queratinizado y puede variar en grosor dependiendo de la región.

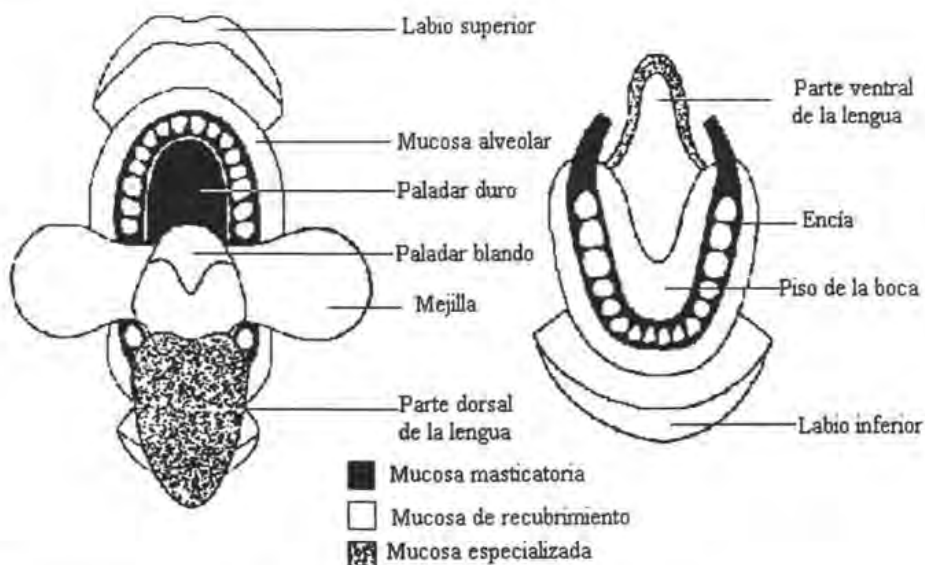


Figura 7. Variaciones regionales en la cavidad oral (Jacques et al., 1998)

Estas variaciones regionales correspondientes al grado de queratinización, sugiere que el sitio de liberación del fármaco puede elegirse según lo que se desee, reduciéndose las condiciones adversas en el tejido y mejorando la aceptación por parte del paciente. En base a lo expuesto anteriormente la administración de fármacos en la cavidad oral puede clasificarse de la siguiente manera:

- a) Liberación sublingual. En la cual se administra el fármaco en la mucosa sublingual (la membrana de la superficie ventral de la lengua y el piso de la boca), para circulación sistémica. La ruta sublingual es la más ampliamente estudiada de estas rutas. La mucosa sublingual es relativamente permeable, dando una rápida

absorción y aceptable biodisponibilidad de muchos fármacos. Esta es la ruta de elección para la administración de nitroglicerina (Shojaei, 1998).

- b) Liberación bucal. En la cual el fármaco se administra en la parte interna de las mejillas, para circulación sistémica. La mucosa bucal es considerablemente menos permeable, que el área sublingual. Esta ruta ha sido utilizada para la administración de análogos esteroidales, ya que evita el metabolismo debido al primer paso hepático, el cual limita la eficacia de estos fármacos cuando se administran por vía gastrointestinal.
- c) Liberación local. Tiene numerosas aplicaciones incluyendo el tratamiento de enfermedades de la cavidad oral, como aftas (ulceras), micosis, infecciones bacterianas (Aungst et al., 1998).
- d) Liberación gingival. Esta ruta de liberación está enfocada al tratamiento de las afecciones dentarias (dolor de dientes, periodontitis) y de las propias encías como la gingivitis (Castellanos, 2002)

Desde el punto de vista de liberación de fármacos, la mucosa oral puede ser considerada como una serie de varias capas (del exterior al interior):

- a) Capa de moco. El moco que cubre el epitelio está formado por mucina la cual está contenida en la saliva y es secretada por las glándulas salivales. La saliva es un fluido acuoso que contiene 1% de material orgánico e inorgánico, su composición depende de la hora del día, del tipo y grado de estimulación, tiene un pH que fluctúa entre 5.5-7.4 dependiendo del flujo (a un alto flujo el pH aumenta). Hay evidencia que sugiere que para algunos fármacos la saliva y la mucina presentes en ella pueden ser una barrera de absorción. En adición a la función de protección de la saliva, esta tiene la habilidad de mantener la superficie húmeda. La presencia de saliva en la boca es importante para la absorción de fármacos por dos razones importantes: 1) La permeación de fármacos a través de membranas que tienen moco ocurre mucho más rápido que a través de membranas sin moco y 2) Los fármacos son comúnmente administrados en estado sólido, por lo que el fármaco se debe disolver primero en la saliva para que pueda ser absorbido. Además, se ha visto que

la presencia de moco juega un papel muy importante en la bioadhesión de sistemas de liberación mucoadhesivos (Shojaei, 1998).

- b) Epitelio escamoso estratificado. Como ya se vió puede ser queratinizado, sólo en ciertas regiones de la cavidad oral, como el paladar duro y la encía, para dar una superficie firme, no flexible y resistente a la abrasión. El epitelio del interior de las mejillas, el piso de la boca y el paladar suave es no queratinizado y facilita la distensibilidad. Cualquiera que sea la región, el epitelio está constituido por múltiples capas de células, en donde cada una representa una etapa del proceso de diferenciación, el cual concluye con la formación de una capa superficial adaptada a las funciones específicas de cada región. Las células del compartimiento generador, migran sucesivamente hacia la superficie, en donde finalmente se desprenden (la renovación celular ha sido estimada entre 5-6 días). Los espacios intercelulares del epitelio están llenos de lípidos procedentes de los cuerpos de Odland, los cuales son organelos ovales o esféricos, que tienen un diámetro de 100-300 μ m y se encuentran en la capa espinosa de muchos epitelios estratificados, estos organelos fueron descritos por primera vez por Odland en epidermis y han sido reportados tanto en epitelio queratinizado, como en epitelio no queratinizado. Los cuerpos de Odland (los cuales se pueden apreciar en la Figura 8) aparecen primero en la parte media del epitelio, en el tercer cuarto del epitelio se funden con la membrana celular, vertiendo su contenido al espacio intercelular. Los lípidos pueden estar organizados en lámelas y constituyen la principal barrera para la difusión molecular. Algunas áreas de la mucosa oral (paladar y encías) tienen una capa cornificada, la cual es similar en su patrón de maduración al estrato corneo de la piel. Los lípidos que llenan el espacio intercelular del epitelio oral queratinizado son pequeñas cantidades de ceramidas, monohexocilceramidas, ésteres de colesterol, sulfato de colesterol, ácidos grasos y una alta proporción de fosfolípidos, triglicéridos y colesterol. En las regiones no queratinizadas (interior de las mejillas, piso de la boca y labios) la naturaleza química del material intercelular está menos definida y la barrera es menos eficiente que en el epitelio queratinizado.

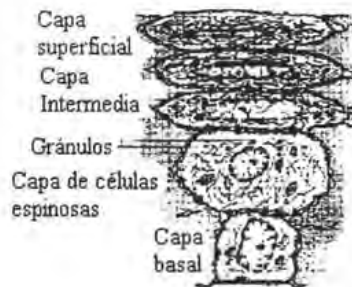


Figura 8. Representación esquemática detallada del epitelio bucal (Junginger, 1999)

- c) Una membrana basal de aspecto poliédrico, la cual separa el epitelio de la lámina propia. Esta membrana es una capa continua de material extracelular de aproximadamente 1 μm de espesor.
- d) Tejido conectivo, el cual forma la lámina propia. Este tejido contiene fibras de colágeno y elastina. Esta estructura no es densa y se considera permeable para moléculas grandes y compuestos hidrofílicos.
- e) Submucosa, la cual puede estar presente en algunas regiones por debajo de la lámina propia (Ganem-Quintanar et al., 1997).

Sistema vascular de la mucosa oral.

El abastecimiento de sangre a la boca está dado principalmente por medio de la arteria carótida externa, la arteria maxilar es la principal ramificación, otras dos ramificaciones pequeñas son las arterias facial y lingual. La arteria lingual y sus ramificaciones (la arteria sublingual) proveen a la lengua, el piso de la boca y la gingiva. La arteria facial distribuye la sangre a los labios y al paladar blando. La arteria maxilar proporciona sangre a las mejillas, al paladar duro y la gingiva maxilar y mandibular.

Claramente la membrana mucosa de la cavidad oral tiene una alta naturaleza vascular, y los fármacos que difunden a través de la membrana tienen fácil acceso a la circulación sistémica (Ganem-Quintanar et al., 1997).

3.2.2 Permeabilidad de la mucosa bucal

Es sabido que la principal barrera de permeabilidad de la piel es el estrato córneo, la ausencia de la capa queratinizada en muchas regiones de la cavidad oral ha sido interpretada como prueba de que la mucosa oral presenta una mayor permeabilidad que la piel. De hecho algunos autores indican que la permeabilidad de la mucosa oral se encuentra entre la epidermis y la mucosa intestinal, estimándose que la permeabilidad de la mucosa oral es de 4-4000 veces mayor que la de la piel, este rango tan amplio es debido a las diferentes regiones de la cavidad oral. En general la permeabilidad de la mucosa oral disminuye en el siguiente orden: sublingual > bucal > palatal (Chidambaram, 1995; Ganem et al., 2001, Nielsen et al., 2000)

Las regiones no-queratinizadas tienen mayor permeabilidad al agua y compuestos hidrofílicos que las áreas queratinizadas.

3.2.3 Barrera de permeabilidad de la mucosa bucal.

Se han realizado estudios de permeación en mucosa bucal de cerdo, con marcadores como la peroxidasa del rábano (enzima de PM 40 000) para determinar la ubicación de esta barrera, encontrándose, que la barrera de permeabilidad para este marcador se ubica en el primer cuarto del epitelio, se han encontrado resultados semejantes cuando se utilizan dextranos fluorescentes. La explicación más plausible del origen de esta barrera de permeabilidad involucra al material lipídico intercelular proveniente de los cuerpos de Odland. Así mismo se ha encontrado que la extracción de este material lipídico genera un aumento en la permeabilidad de la mucosa bucal (Harris et al., 1992).

El tejido de la mucosa oral contiene una gran cantidad de material extracelular, el cual no solo da al epitelio su elasticidad, sino que también contribuye a la barrera de permeabilidad. Las diferencias regionales en permeabilidad son dependientes del espesor del epitelio, de la presencia o ausencia de la capa queratinizada y la organización del material intercelular.

La mucosa bucal contiene principalmente lípidos polares como fosfolípidos, sulfato de colesterol y glicosilceramidas. En la Tabla 5 se detalla la composición bioquímica de la mucosa oral del cerdo.

Tabla 5. Composición lipídica de la mucosa oral del cerdo. (Veuillez et al., 2001).

Componentes (%)	Encía	Paladar	Piso de la boca	de la Bucal
Queratina	Presente	Presente	Ausente	Ausente
Fosfolípidos	42.3	39.1	44.2	38.2
Glicosilceramidas	2.1	1.8	5.8	16.5
Acilglicosilceramidas	2.1	2.8	0.0	0.0
Acilceramidas	0.4	0.2	0.0	0.0
Ceramidas	6.6	3.3	0.7	0.8
Colesterol	21.0	33.6	19.5	13.6
Sulfato de colesterol	2.0	1.7	3.2	7.8
Ácidos grasos	5.0	1.1	0.6	1.6
Triglicéridos	16.9	15.9	11.1	15.7
Esteres de colesterol	1.1	0.2	15.0	5.9

Thompson et al., (2001) dan la composición de fosfolípidos contenidos en la mucosa bucal, teniendo principalmente esfingomiélin (7.7%), fosfatidilcolina (18.4%), fosfatidilserina (0.8%), fosfatidilinositol (1.8%) y fosfatidiletanolamina (16.8%)

Aunque los lípidos provenientes de los cuerpos de Odland representan la principal barrera de permeabilidad de la mucosa bucal, se ha encontrado que otras estructuras de la mucosa también cumplen funciones de barrera, como el moco. Algunos autores reportan que la lámina basal puede representar una barrera para la absorción de inulina, dextrano 70 y complejos inmunes (Xiang et al., 2002).

3.2.4 Rutas de penetración de los fármacos a través de la mucosa bucal.

La mucosa bucal tiene un forro consistente de un epitelio no-queratinizado escamoso soportado por tejido conectivo de la lámina propia. La capa superficial del epitelio bucal representa la barrera primaria para la entrada de sustancias del exterior. El epitelio debe ser atravesado por las moléculas de fármaco para intentar alcanzar su sitio de acción. Las rutas de penetración de fármacos en el epitelio bucal son las mismas que para otros epitelios del cuerpo. Existen dos rutas principales involucradas: la ruta transcelular (intracelular), donde los compuestos tienen que atravesar el epitelio a través de las células y la ruta paracelular (intercelular), donde los compuestos difunden a través de los lípidos intercelulares, entre las células, como se muestra en la Figura 9. En general, para muchos fármacos, la permeación a través de la mucosa bucal es por medio de la ruta paracelular por difusión pasiva (Kurosaki et al., 1991).

Tanto los fármacos liposolubles como los hidrosolubles pueden penetrar por cualquier ruta. La ruta intracelular puede involucrar compuestos hidrosolubles, que atraviesen las células a través de poros acuosos en las células epiteliales, lo cual estaría limitado a moléculas pequeñas (moléculas de bajo volumen molar $80 \text{ cm}^3/\text{mol}$) o bien por medio de un transporte especializado, la penetración por esta ruta por compuestos liposolubles, sería atravesando la bicapa lipídica de la membrana celular. La ruta intercelular podría permitir el paso de compuestos liposolubles por difusión a través de los lípidos intercelulares, mientras que los fármacos hidrosolubles podrían utilizar esta ruta por medio de canales acuosos asociados con las cabezas polares de los lípidos (Veuillez et al., 2001).

Algunos investigadores sugieren que ciertos fármacos como los péptidos pequeños pueden utilizar acarreadores presentes en la mucosa bucal, ya que ésta cuenta con acarreadores para moléculas pequeñas como monosacáridos y aminoácidos, aunque aún se requiere de una investigación sistemática a este respecto (Veuillez et al., 2001)

Los lípidos parecen estar en fase líquida no lamelar, con ocasionales pilas cortas de lípidos en forma de lamela. Están principalmente compuestos de fosfolípidos, colesterol y una inusual proporción de glicosilceramidas.

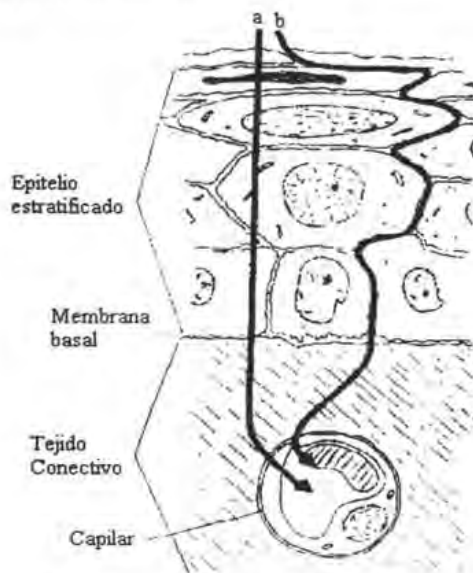


Figura 9. Rutas de penetración endotelial: a) transcelular b) intercelular (Senel y Hincal, 2001)

3.2.5 Promotores de absorción bucal

A pesar de las múltiples ventajas que representa la administración de fármacos a través de la mucosa bucal (Tabla 1), el bajo flujo asociado con ésta hace difícil alcanzar los niveles terapéuticos deseados, y a partir del hecho de que la mucosa bucal es un tejido robusto con un alto grado de recuperación, la cual rutinariamente está expuesta a compuestos xenobióticos, como los alimentos, se hace posible y necesario el empleo de promotores de absorción ya sean de carácter químico o físico.

Los químicos usados como promotores de absorción idealmente deben ser seguros, no tóxicos, farmacológica y químicamente inertes, no irritantes y no alergénicos. Además la barrera de permeabilidad del tejido se debe de recuperar al poco tiempo después de retirar el promotor utilizado. En la Tabla 6 se da una clasificación de estos promotores en base a su estructura.

Tabla 6. Promotores químicos de penetración bucal (Senel et al., 2001)

Clasificación	Ejemplos
Surfactantes	Aniónicos: Lauril sulfato de sodio, laureato de sodio Catiónicos: Cloruro de cetilpiridinio No-iónicos: Poloxámeros, Brij, Span, Tween Sales biliares: Glicodioxicolato de sodio, taurocolato de sodio
Misceláneos	Azona®, etanol
Ácidos grasos	Ácido oleico, ácido caprílico
Ciclodextrinas	α , β y γ - ciclodextrinas
Agentes quelantes	EDTA, citrato de sodio, poliacrilatos
Polímeros cargados positivamente	Quitósán, trimetil quitósán, poli-L-arginina.
Compuestos catiónicos	L-lisina.

Los promotores de carácter físico pueden ser clasificados de la siguiente manera:

- Stripping: Usando un adhesivo, se pueden remover capas sucesivas de epitelio, disminuyendo el grosor de la barrera de permeabilidad.
- Raspado: Usando una espátula, las células exteriores pueden ser removidas del epitelio.
- Iontoforesis: Aplicación de un campo eléctrico a través del epitelio.

Mecanismo de acción de los promotores

- a) Cambios en la viscosidad del moco; la mucosa oral está cubierta por una capa de saliva, la cual puede impedir la absorción de ciertos tipos de fármacos.
- b) Perturbando los lípidos de membrana, ya sea aumentando la fluidez de la bicapa lipídica de la membrana o bien extrayendo lípidos de membrana. El rompimiento del arreglo de los lípidos intercelulares por la interacción del promotor con los componentes lipídicos o proteínicos, hace que aumente la permeabilidad. Se ha encontrado una correlación entre el aumento de la fluidez de los lípidos y el aumento de la permeabilidad (Hoogstraate et al., 1996).
- c) Afectando los componentes involucrados en la formación de uniones intercelulares.
- d) Vencimiento de la barrera enzimática; inhibidores de proteasas tanto endo como exopeptidasas son promotores potenciales.
- e) Incremento de la actividad termodinámica de fármacos; esta puede ser afectada por la composición del vehículo, ya que este influye directamente sobre la solubilidad del fármaco (Veuillez et al., 2001).

Como se aprecia en la Tabla 6, las ciclodextrinas son consideradas como promotores de absorción, se ha observado que las ciclodextrinas pueden aumentar o disminuir la absorción de fármacos a través de la mucosa bucal, dependiendo de la composición del vehículo, concentración y tipo de la CD y de las propiedades fisicoquímicas del fármaco. Pitha et al. (1986) encontró que las ciclodextrinas no fueron efectivas como promotores de absorción en la administración bucal de hormonas esteroideas, sin embargo encontraron que los productos de condensación de β -CD con óxido de propileno forman complejos con testosterona, progesterona y estradiol, facilitando la absorción bucal de estas en humanos.

Lofftson et al. (1999) encontró que la disponibilidad del triclosán formulado en pastas dentales aumenta cuando se incorpora a la pasta el complejo formado entre el triclosan, β -CD y carboximetilcelulosa.

La formación de complejos entre el miconazol y la 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, tuvo efectos tóxicos sobre un modelo celular de la mucosa bucal (cultivo celular TR146), esta toxicidad se atribuyó a que la 2HP- β -CD incrementó la biodisponibilidad del antimicótico. Este complejo se formuló en gomas de mascar encontrándose que la liberación *in vitro* del miconazol aumenta (Jacobsen et al., 1999).

3.3 CICLODEXTRINAS

El Consejo Internacional de Excipientes farmacéuticos define los excipientes como "sustancias, que han sido apropiadamente evaluadas en cuanto a su seguridad y se incluyen en un sistema de liberación de fármacos ya sea para ayudar al proceso del sistema de liberación del fármaco durante su manufactura, para proteger, apoyar, mejorar la estabilidad, la biodisponibilidad o la aceptabilidad del paciente, ayudar en la identificación del producto o mejorar cualquier otro atributo de la seguridad y efectividad global del sistema de liberación del fármaco durante el almacenamiento o el uso" (Apte y Ugwu, 2003)

De acuerdo a esta definición las ciclodextrinas son excipientes que tienen influencia sobre la estabilidad, liberación y absorción del principio activo, ya que como se mencionó en capítulos anteriores las ciclodextrinas aumentan la solubilidad y estabilidad acuosa de muchas moléculas (incluido el CHL), contribuyen a la liberación de fármacos (triclosán a partir de pasta dental y miconazol a partir de goma de mascar) y pueden ser promotores de la absorción de fármacos a través de mucosa bucal (testosterona).

El primer reporte concerniente al aislamiento de sustancias reconocidas como ciclodextrinas fue realizado en 1891 por Villiers, aislando una pequeña cantidad de una sustancia cristalina de un cultivo de *Bacillus amilobácter* (el medio de cultivo contenía almidón), a tal sustancia le llamó celulosina por su semejanza con la celulosa. Schardinger caracterizó la sustancia cristalina en 1903, encontrando que era la mezcla de dos sustancias a las que llamó dextrina cristalina α y dextrina cristalina β (Bekers, 1991).

Aunque las ciclodextrinas se conocen desde hace más de 100 años, la primera patente registrada sobre su uso potencial como excipientes farmacéuticos se dio hasta 1953, debido a su difícil producción y purificación, aunado a su alto costo, lo que evitó que su utilidad se difundiera hasta 1970. Los recientes avances en biotecnología han mejorado los métodos de producción reduciéndose los costos, por lo que ahora se pueden obtener ciclodextrinas y sus derivados con alta pureza y un costo relativamente bajo. Por lo anterior desde la década de los setentas el número de publicaciones científicas en las que aparecen implicadas las ciclodextrinas aumenta a un ritmo elevado. En el periodo comprendido entre 1979 y 1993 el *Chemical Abstracts* presenta 7131 citas bibliográficas sobre el tema y para julio de 1998 se encontraban 16300 referencias disponibles. Las aplicaciones farmacéuticas de las

ciclodextrinas hidrosolubles fueron discutidas en 800 artículos y 120 patentes (Szente y Szejtli, 1999).

En 1991 las Ciclodextrinas sólo eran producidas a escala industrial por cuatro compañías en Japón, dos en Francia, una en Hungría y una en Estados Unidos; otros países han reportado obtención de ciclodextrinas a escala piloto. El mercado mundial de estos excipientes en 1990 fue de 1 millón de kilogramos y su precio oscilaba entre 7–25 dólares /Kg. Es importante conocer estas tendencias de la tecnología farmacéutica mundial para fortalecer la calidad biofarmacéutica de los productos y además para abordar el diseño de estrategias en la investigación, síntesis y producción de fármacos, excipientes; conjuntamente, al desarrollo de nuevas formas farmacéuticas.

3.3.1 Definición.

El término ciclodextrinas (CDs) engloba una familia de oligosacáridos macrocíclicos cuya estructura está formada por unidades de α -D- glucopiranososa. Las CDs son denominadas también como dextrinas Schardinger, cicloamilosas, oligosacáridos cíclicos o cicloglucanos (Bekers, 1991; Qi y Sikorski, 1999).

Las más importantes son las denominadas α -, β - y γ - ciclodextrinas (de forma abreviada α -CD, β -CD y γ -CD) compuestas por 6, 7 y 8 unidades de glucopiranososa respectivamente, las cuales se encuentran unidas por enlaces glicosídicos α -1,4. En la figura 10 se puede apreciar la estructura general de la β -ciclodextrina.

Las CDs con nueve o más unidades son difíciles de purificar y tienen pocas habilidades para la formación de complejos. CDs con menos de seis unidades de glucosa no se pueden formar debido a razones estéricas.

3.3.2 Producción de ciclodextrinas

Los productos de la hidrólisis enzimática del almidón son generalmente glucosa, maltosa y dextrinas ramificadas o lineales. Sin embargo, algunas plantas y microorganismos producen ciertas enzimas llamadas ciclodextrina-glucosil-transferasas (CGT), las cuales degradan el almidón por medio de una reacción intramolecular generando productos de degradación cíclicos a los que se les llama ciclodextrinas (Lofsson, 2001).

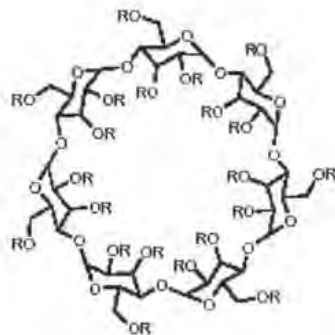


Figura 10. Estructura general de la β -CD (Lloyd, 1998).

La preparación de CDs se puede dividir en las siguientes etapas:

- a) Cultivo de microorganismos que produzcan la enzima CGT.
- b) Separación, concentración y purificación de la enzima.
- c) Conversión enzimática del almidón prehidrolizado a CDs.
- d) Purificación de la CD.

Los microorganismos que se usan para producir la enzima CGT son: *Bacillus macerans*, *Klebsiella pneumoniae* y *Alkalophilic bacterium* No. 38-2, la proporción de cada CD (α , β y γ) producida está en función del origen de la enzima utilizada, CGT de *Bacillus macerans* y *Klebsiella pneumoniae* producen principalmente α -CD y *Alkalophilic bacterium* No. 38-2 principalmente β -CD. La proporción de las diferentes CDs formadas es también dependiente del tiempo de incubación de la enzima en el medio de almidón, la formación de la β -CD es más lenta que la de α -CD (Bekers, 1991).

El proceso antes mencionado produce pequeñas cantidades de CDs por lo que los costos de producción son muy altos, lo cual ha evitado su uso industrial, en la actualidad muchos de los genes de la CGT han sido clonados, disminuyendo los costos y produciendo mayores cantidades de CDs, lo cual favorecerá su uso a nivel industrial.

3.3.3 Estructura y propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas.

Como ya se mencionó las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos constituidos por unidades de α -D-glucopiranososa unidas por enlaces α -1,4, capaces de formar complejos de inclusión con una gran cantidad de moléculas, principalmente con aquellas de carácter

hidrofóbico. Como consecuencia de la conformación del C₁ de los residuos α -D-glicopiranosil y la falta de libre rotación alrededor de las uniones glicosídicas, las CDs no son moléculas perfectamente cilíndricas, sino que tienen forma de cono truncado. Debido a la libre rotación del carbono C₆, esta parte de la cavidad es más estrecha que el lado donde se encuentran los hidroxilos C₂ y C₃. Las dimensiones de las ciclodextrinas (profundidad y ancho) varían de acuerdo al número de unidades de glucosa y debido a estas diferencias en el diámetro interno de la cavidad, cada CD tiene diferente capacidad para la formación de complejos. En la Figura 11 se aprecia la forma y dimensiones de la cavidad de las ciclodextrinas más comunes.

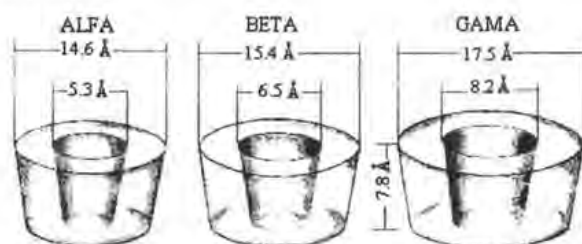


Figura 11. Dimensiones de las ciclodextrinas (Cerestar.com)

Las funciones hidroxilo (OH) están orientadas hacia el exterior del cono, con los grupos OH primarios de los residuos de glucosa en el extremo más estrecho del cono y los grupos OH secundarios en el extremo más ancho (sobre el carbono C₂ y C₃ de las unidades de glucosa). Estos grupos hidrofílicos interactúan con el agua y le confieren sus características de solubilidad. La cavidad central está formada por el esqueleto de carbono y los átomos de oxígeno etéreos (glicosídicos), dándole a la cavidad su carácter hidrofóbico.

Las CDs son químicamente estables en soluciones alcalinas acuosas, pero son susceptibles a la hidrólisis en condiciones fuertemente ácidas, el grado de hidrólisis es dependiente de la temperatura, concentración, tipo de ácido y tamaño de la cavidad, sin embargo las CDs son más resistentes a la hidrólisis que las dextrinas lineales (Loftsson, 2001 y Qi, 1999).

Las CDs son susceptibles a la hidrólisis enzimática por parte de la α -amilasa, aunque en un menor grado que las dextrinas lineales. En la Tabla 7 se enlistan algunas de las propiedades físicas de las CDs.

Tabla 7. Propiedades físicas de las ciclodextrinas. (Modificada de Bekers et al., 1991 y Loftsson et al., 1996)

	α -CD	β -CD	γ -CD
No. de residuos de glucosa	6	7	8
Formula empírica	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Diámetro de la cavidad (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Altura del cono (Å)	7,9	7,9	7,9
Volumen aproximado cavidad (Å ³)	174	262	472
Peso molecular	972	1135	1297
Solubilidad acuosa a 25°C (g/100ml)	14,5	1,85	23,2
Punto de fusión (°C)	275	280	275
Rotación específica [a] _D ²⁵	+ 150,5°	+ 162,0°	+ 177,4°

3.3.4 Ciclodextrinas modificadas.

La seguridad es el principal factor que decide si un excipiente puede ser utilizado en preparados farmacéuticos. Se sabe que la α y β ciclodextrinas causan severa nefrotoxicidad cuando se administran parenteralmente, la etiología de esta no se conoce con exactitud, pero parece estar relacionada con la captura de CD por las células de los túbulos del riñón seguida por la disrupción de la función intracelular o por la extracción de lípidos componentes de membrana por parte de las CD. La habilidad de las ciclodextrinas de causar hemólisis en los eritrocitos e irritación en la membrana parece estar relacionada a su habilidad para extraer lípidos componentes de membrana, principalmente colesterol y fosfolípidos. La γ -CD es menos tóxica debido probablemente a su menor habilidad de afectar a los lípidos celulares (Stella, 1997).

El control de calidad y el costo de producción son factores muy importantes que deben ser considerados al evaluar la utilidad farmacéutica de una CD. La alfa, beta y gama CD contienen 18, 21 y 24 grupos hidroxilos respectivamente susceptibles de ser sustituidos. La síntesis y purificación debe ser fácil, barata y escalable para que sea económicamente viable. Por lo que aquellas CDs que necesiten varias etapas de síntesis y purificación probablemente serán desechadas a menos que las ventajas que representen sean mayores.

La mayoría de los fármacos tienden a interactuar de forma más favorable con la β -CD que con la α -CD, debido el tamaño de la cavidad. La β -CD tiene una cavidad de 6Å de

diámetro, tamaño suficiente para acomodar grupos aromáticos presentes en muchas moléculas, en cambio el diámetro de la alfa es más pequeño. También pueden interactuar con la gama, pero el costo de ésta no ha hecho extensivo su uso (Rajewiski, 1996).

Es por ello que hasta el momento la CD más estudiada en el campo farmacéutico es la β -CD por su habilidad para formar complejos de inclusión con numerosas moléculas, sin embargo presenta muy baja solubilidad acuosa (18mg/ml a 25°C) debido a que el OH del C₂ de una unidad de glucosa puede formar un puente de hidrógeno con el OH del C₃ de la unidad de glucosa adyacente, estos puentes de hidrógeno intramoleculares estabilizan el ciclo de la CD tornándola en una estructura rígida, además de que estos puentes de hidrógeno evitan la hidratación de la molécula.

El objetivo de muchos investigadores ha sido el desarrollo de CD modificadas, que conserven su habilidad para formar complejos pero con menor toxicidad y mayor solubilidad acuosa. La CD modificada ideal debe tener las siguientes características para que pueda ser usada como excipiente farmacéutico (Szente y Szejtli, 1999):

- Muy soluble en agua a temperatura ambiente.
- Económica.
- Disponible en alta pureza.
- No tóxica.
- Poder de solubilizar varios fármacos lipofílicos.
- Estable durante procesos de esterilización.
- Farmacológicamente inerte.
- Biodegradable en la circulación y ser eliminada como pequeñas moléculas.
- No reaccionar con los componentes de la membrana celular.

La sustitución de algún átomo de hidrógeno que forma parte de un grupo hidroxilo, por grupos hidrofóbicos como metilo, etilo, da como resultado un incremento considerable en la solubilidad de las ciclodextrinas. Algunas de las CDs derivadas que se encuentran en el mercado están en la Tabla 8. La introducción de sustituyentes metilo a la β -CD hace que la CD sea dramáticamente más soluble en agua que la CD nativa. La solubilidad acuosa incrementa con el número de metilos hasta 13-14 y a partir de este punto la solubilidad disminuye con la metilación (21 grupos metoxi por molécula de β -CD).

La reacción de CD con óxido de propileno en solución acuosa alcalina resulta en la sustitución de los hidroxilos de la CD por grupos 2-hidroxipropil, con diferentes grados de sustitución, por lo que el desafío de la producción de esta CD es la purificación.

Cuando los hidroxilos de la β -CD reaccionan con un agente químico, la sustitución conduce a una mezcla heterogénea de CD con diferente grado de sustitución. El grado de sustitución expresa el número de aquellos hidroxilos en las unidades de glucosa que están sustituidos, así este número puede ser 1, 2 ó 3.

Tabla 8 Derivados de las ciclodextrinas (α , β y γ) utilizados en investigación farmacéutica (modificada de Loftsson, 1996; Stella, 1997 y Rajewski, 1996)

Ciclodextrina	Abreviatura	R	N
a)Alquiladas			
Metil- α -ciclodextrina	M- α -CD	CH ₃ o H	4
Butil- α -ciclodextrina	B- α -CD	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ o H	4
Dietil- β -ciclodextrina	DE- β -CD	CH ₂ CH ₃ o H	5
Dimetil- β -ciclodextrina	DM- β -CD	CH ₃ o H	5
Metil- β -ciclodextrina	M- β -CD	CH ₃ o H	5
β -ciclodextrina metilada al azar	RM- β -CD	CH ₃ o H	5
Metil- γ -ciclodextrina	M- γ -CD	CH ₃ o H	6
Butil- γ -ciclodextrina	B- γ -CD	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ o H	6
b)Hidroxialquiladas			
Hidroxipropil- α -ciclodextrina	HP- α -CD	CH ₂ CHOHCH ₃ o H	4
Hidroxipropil- α -ciclodextrina	HP- α -CD	CH ₂ CHOHCH ₃ o H	4
Hidroxietil- β -ciclodextrina	HE- β -CD	CH ₂ CH ₂ OH o H	5
Hidroxipropil- β -ciclodextrina	HP- β -CD	CH ₂ CHOHCH ₃ o H	5
Hidroxietil- γ -ciclodextrina	HE- γ -CD	CH ₂ CH ₂ OH o H	6
Hidroxipropil- γ -ciclodextrina	HP- γ -CD	CH ₂ CHOHCH ₃ o H	6

Continuación de la Tabla 8

Ciclodextrina	Abreviatura	R	n
c)Esterificadas			
Acetil- α -ciclodextrina	A- α -CD		4
Succinil- α -ciclodextrina	S- α -CD		4
Acetil- β -ciclodextrina	A- β -CD		5
Propionil- β -ciclodextrina	P- β -CD		5
Succinil- β -ciclodextrina	S- β -CD		5
Benzoil- β -ciclodextrina	B- β -CD		5
Palmitil- β -ciclodextrina	Pa- β -CD		5
Acetil- γ -ciclodextrina	A- γ -CD		6
Succinil- γ -ciclodextrina	S- γ -CD		6
d)Ramificadas			
Glucosil- α -ciclodextrina	G ₁ - α -CD	Glucosil o H	4
Maltosil- α -ciclodextrina	G ₂ - α -CD	Maltosil o H	4
Glucosil- β -ciclodextrina	G ₁ - β -CD	Glucosil o H	5
Maltosil- β -ciclodextrina	G ₂ - β -CD	Maltosil o H	5
Glucosil- γ -ciclodextrina	G ₁ - γ -CD	Glucosil o H	6
Maltosil- γ -ciclodextrina	G ₂ - γ -CD	Maltosil o H	6
e)iónicas			
Carboximetil- α -ciclodextrina	CM- α -CD	CH ₂ CO ₂ H o H	4
Ester-fosfato- α -ciclodextrina	EF- α -CD		4
Carboximetil- β -ciclodextrina	CM- β -CD	CH ₂ CO ₂ H o H	5
Carboximetil-etil- β - ciclodextrina	CME- β -CD	CH ₂ CO ₂ H, CH ₂ CH ₃ o H	5
<u>Sulfobutyleter</u> - β -ciclodextrina	SBE- β -CD	(CH ₂) ₄ SO ₃ Na o H	5
Carboximetil- γ -ciclodextrina	CM- γ -CD	CH ₂ CO ₂ H o H	6
Ester-fosfato- γ -ciclodextrina	EF- γ -CD		6

3.3.5 Formación de complejos

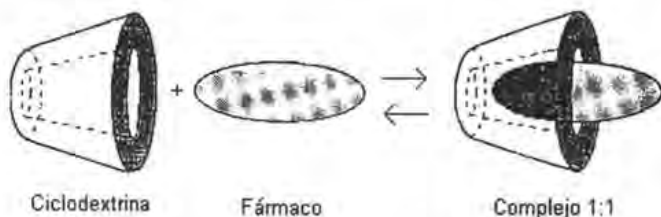


Figura 12. Ilustración esquemática de la formación del complejo 1:1 (Rajewski y Stella, 1996)

Como se ilustra en la Figura 12, muchos fármacos forman complejos con la ciclodextrina en una relación estequiométrica 1:1. Esta formación de complejos puede ser definida por la ecuación 1 en donde $K_{1:1}$ representa la constante de unión, $[\text{fármaco}]_{\text{Complejo}}$ representa la cantidad de fármaco que se encuentra formando el complejo, $[\text{Fármaco}]_{\text{Libre}}$ representa la cantidad de fármaco libre y $[\text{Ciclodextrina}]_{\text{Libre}}$ representa la concentración de ciclodextrina libre.

$$K_{1:1} = \frac{[\text{Fármaco}]_{\text{complejo}}}{[\text{Fármaco}]_{\text{Libre}} [\text{Ciclodextrina}]_{\text{Libre}}} \quad (1)$$

La magnitud de la constante de unión, $K_{1:1}$, que es definida por la ecuación 1, para la interacción descrita en la Figura 12, es del orden de $0 - 100\,000\text{M}^{-1}$, 0 para un fármaco que es incapaz de formar un complejo de inclusión. (Rajewski, 1996).

En cuestiones de solubilidad, si $[\text{Fármaco}]_{\text{Libre}}$ representa la solubilidad del fármaco en ausencia de ciclodextrinas, entonces el incremento de solubilidad del fármaco está principalmente dado por el producto de $K_{1:1}$ y $[\text{Ciclodextrina}]_{\text{Libre}}$, con $[\text{Ciclodextrina}]_{\text{Libre}}$ igual a la $[\text{Ciclodextrina}]_{\text{Total}}$ menos $[\text{fármaco}]_{\text{Complejo}}$. Los valores de $K_{1:1}$ están en el rango de $100 - 20\,000\text{M}^{-1}$ y la concentración de ciclodextrina total es usualmente menor a $0.1 - 0.2\text{M}$, el incremento máximo de solubilidad que puede ser esperado para una interacción 1:1 con ciclodextrina es del orden de 1,000 - 2,000. Es importante resaltar que la solubilidad intrínseca del fármaco en ausencia de ciclodextrinas juega un papel importante

en la solubilidad que pueda lograrse, si la solubilidad intrínseca es de 10 µg/ml, entonces se podrá obtener una solubilidad de 10 – 20 mg/ml, pero si es de 10 ng/ml ninguna CD es capaz de aumentar la solubilidad en el orden de miligramos si la interacción es 1:1. Si la interacción del fármaco con la CD es 1:1 entonces la solubilidad del fármaco no puede ser mayor a la concentración molar de la CD (Stella y Rajewski, 1997).

Algunos autores afirman que la principal fuerza conductora para la formación de complejos puede ser la expulsión de agua del interior de la cavidad (la cavidad de la CD se encuentra siempre ocupada por moléculas de agua, consideradas de alta energía debido a que no pueden tener completas sus interacciones por puente de hidrógeno con las moléculas vecinas). La energía del sistema disminuye cuando estas moléculas de agua ricas en energía son reemplazadas por otras moléculas de menor polaridad produciéndose un cambio de entalpía favorable (Bekers et al., 1991, Loftsson y Brewater, 1996, Qi et al., 1999, Singh et al., 2002). En la figura 13 se observa la interacción entre una molécula huésped y una molécula de CD y se demuestra como las moléculas del disolvente son expulsadas del interior de la cavidad de la CD para permitir la entrada del p-xileno. Aunque este mecanismo es muy importante hay otras fuerzas asociadas con la formación de complejos de inclusión entre una molécula y una ciclodextrina, estas son: fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, cambios en la tensión superficial del disolvente y liberación de la tensión del anillo de la molécula de CD.

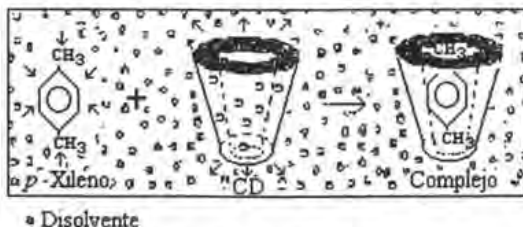


Figura 13. Interacción p-xileno-ciclodextrina.
http://www.aqfu.org.uy/nueva/revistas/29/revista_N29_noviembre_2000_electroforesis_capilar_04.htm

3.3.5.1 Factores que afectan la formación de complejos

- 1) Compatibilidad geométrica. Ya que el tamaño de la cavidad varía con el número de unidades de glucosa en el anillo, la compatibilidad geométrica es un factor muy importante (Qi y Sikorski, 1999). La molécula huésped debe entrar total o

parcialmente en la cavidad de la CD. No se forman complejos estables si la molécula es demasiado pequeña ya que esta se puede salir de la cavidad. La formación de complejos tampoco es posible si la molécula es muy grande a menos que una parte de ella pueda entrar en la cavidad.

- 2) Polaridad. En general, moléculas hidrofóbicas tienen mayor afinidad por las CDs en solución acuosa que las moléculas hidrofílicas.
- 3) Carga. Usualmente el complejo a partir de especies iónicas es menos estable que los complejos de especies no-ionizadas, por lo que el pH de la solución puede influir en la unión CD-Fármaco por cambio del estado iónico del fármaco o de la CD (Qi y Sikorski, 1999).
- 4) Presencia de otras moléculas. La presencia de moléculas competitivas para la cavidad de la CD desplaza el equilibrio de la molécula que está inicialmente asociada hacia el estado libre, dependiendo de la afinidad que tengan dichas moléculas por la CD (Qi y Sikorski, 1999).

La estabilidad de los complejos por inclusión depende de varios parámetros:

- Estructura química e hidrofobia de la molécula huésped
- Contracción
- pH
- Solvente orgánico
- Temperatura
- Concentración de la CD
- Fuerza iónica

Los complejos se pueden formar tanto en estado sólido como en solución.

Los métodos para obtener el complejo de inclusión en estado sólido son: co-precipitación, co-liofilización, aspersión y amasado entre otros.

En solución es importante enfatizar que la cinética de formación y disociación del complejo entre la CD y el fármaco es rápida, el tiempo de vida media para la formación/disociación es menor a un segundo, por lo que en solución el complejo se está formando y disociando continuamente, es decir el proceso de formación del complejo es dinámico.

3.3.6 Usos de las ciclodextrinas.

Debido a su peculiar estructura cíclica hueca, las ciclodextrinas pueden hospedar distintos compuestos formando complejos de inclusión cuya estequiometría más usual es 1:1 (Figura

12). Esta peculiar característica de formar complejos de inclusión estables permite que las ciclodextrinas tengan multitud de aplicaciones en farmacología, biotecnología, tecnología de alimentos, cosmética, química analítica, etc. Además, el hecho de que puedan sintetizarse multitud de derivados monosustituídos (sobre grupos hidroxilo primarios o secundarios), disustituídos, polisustituídos, etc. permite ampliar el número de aplicaciones de esta familia de compuestos.

Los principales beneficios que trae consigo la formación de complejos de inclusión son los siguientes:

- a) Aumento de la estabilidad física y química.
- b) Aumento de la solubilidad acuosa.
- c) Liberación controlada.
- d) Aumento de la biodisponibilidad.
- e) Protección contra la volatilización.
- f) Enmascaramiento de sabores indeseables.
- g) Mejoramiento del manejo de sustancias (transporte y almacenamiento), por conversión de sustancias líquidas a polvos cristalinos.

En base a estos beneficios las CDs se utilizan en diversas áreas:

3.3.6.1. Área farmacéutica.

La industria farmacéutica necesita siempre de nuevas formulaciones para mejorar propiedades físicas inadecuadas de principios activos nuevos o para reformular los fármacos ya existentes. Las CDs ofrecen múltiples ventajas sobre las formulaciones estándar ya que el complejo formado entre la CD y el fármaco puede aumentar la solubilidad y estabilidad acuosa del mismo, además de aumentar su biodisponibilidad y de disminuir los efectos adversos, por lo que las CDs son candidatos potenciales para la liberación de fármacos por diversas rutas de administración (oral, rectal, nasal, ocular, transdérmica y tópica) debido a que pueden alterar las propiedades físicas, químicas y biológicas de la molécula huésped.

La importancia de las CDs en la industria farmacéutica está bien documentada por el incremento de medicamentos en el mercado conteniendo CDs (Tabla 9).

3.3.6.2 Bioconversión y fermentación.

La eficiencia de los procesos de bioconversión y fermentación está a menudo disminuida por la influencia tóxica o inhibitoria del sustrato o del producto de la biocatálisis, además la biocatálisis es más activa en su medio ambiente natural (medio acuoso) y la gran mayoría de los sustratos orgánicos son lipofílicos y poco solubles en agua, por lo que solo una cantidad limitada de sustrato está accesible para la biocatálisis. Las CDs tienen la capacidad de aumentar la solubilidad de los sustratos orgánicos y disminuir la toxicidad de las toxinas por la formación de complejos. Se ha encontrado por ejemplo que la biotransformación del colesterol a testosterona por *Lactobacillus bulgaricus* aumentó significativamente con la presencia de CDs en el medio de fermentación (Kumar, 2001).

3.3.6.3 Contaminación Ambiental

Las CDs juegan un papel muy importante en la resolución de los problemas de contaminación. Las CDs son usadas en la solubilización, encapsulación y adsorción de contaminantes en el tratamiento de agua, suelo y aire. Usando ciclodextrinas se pueden remover sustancias altamente tóxicas de efluentes industriales por la formación de complejos de inclusión. El aumento de la solubilidad es usado para probar la remediación de suelos, la β -CD acelera la degradación de todos los tipos de hidrocarburos que influyen en la cinética de crecimiento de las plantas, produciendo un mayor rendimiento de la biomasa y una mejor utilización de los hidrocarburos como fuente de carbono y energía (Singh et al., 2002).

3.3.6.4 Catálisis

Se ha encontrado que las CDs pueden ser usadas en reacciones catalíticas por su habilidad de imitar a las enzimas, estas son formadas por las CDs modificadas de manera natural a través de la sustitución de varios grupos funcionales en la cara primaria o secundaria. Estas CDs modificadas son útiles debido al fenómeno de reconocimiento molecular atribuido a los grupos substituidos de la CD. Esta habilidad resulta de la entrada del sustrato en la cavidad hidrofóbica con la subsiguiente reacción iniciada por los grupos unidos a la CD, algunas CDs modificadas pueden actuar como transaminasas. Las CDs pueden inhibir la reacción completamente o aumentar la actividad catalítica.

Tabla 9. Formulaciones farmacéuticas comerciales a base de Ciclodextrinas (Giordano, 2001).

Componente	Nombre comercial	Compañía	País	Formulación
PGE ₁ /α-CD	Prostandin 500 Prostavasin Viridal	Ono Schwarz Pharma	Japón Alemania	Infusión
PGE ₂ /β-CD	Prostarmon.E	Ono	Japón	Tabletas Sublinguales
Piroxicam/β-CD	Brexin Brexidol	Chiesi Robapharm Promedica Nycomed Lauder	Italia, Bélgica, Suiza,, Noruega Francia Escandinava Alemania	Tabletas Supositorios
OP-1206/γ-CD	Opalmon	Ono	Japón	Tabletas
Benexate/β-CD	Ulgut Lonmiel	Teikpku Shionogi	Japón Japón	Cápsulas
Yodo/β-CD	Mena-Gargle	Kyushin	Japón	Solución para gárgaras
Dexametasona/β-CD	Glymesason	Fujinaga	Japón	Ungüento
Nitroglicerina/β-CD	Nitropen	Nipón Kayaku	Japón	Tabletas Sublinguales
Cefotiam/α-CD	Pansporin T	Takeda	Japón	Tabletas
CefalosporinaE 1207/β-CD	Meiact	Meiji Seika Roussel- Maestretti	Japón Italia	Tabletas
Nimesulida/β-CD	Nimedex	Novartis, Italfarmaco, Boehringer Mann	Italia, Suiza	Tabletas
Difenidramina HCL + Clorteofilina/β- CD	Stada Travel	Stada	Alemania	Tabletas masticables
Clorodiacepoxido/β- CD	Transilium	Gador	Argentina	Tabletas
Hroconazol/HPβ- CD	Sopranos	Janssen	Bélgica	Solución
Hidrocortisona/HPβ- CD	Dexacort		Israel	Solución

3.3.6.5 Química analítica

Las CDs son usadas en separaciones debido a su habilidad para discriminar entre isómeros posicionales, grupos funcionales, homólogos y enantiómeros. Las CDs hidrofílicas son usadas en electroforesis capilar como modificadores de soluciones amortiguadoras para realizar separaciones quirales de fármacos, también son usadas en cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) como fase estacionaria unida a un soporte sólido o como aditivo en la fase móvil, además son usadas en cromatografía de gases, cromatografía electrocinética, microdiálisis, cromatografía en capa fina y en la separación a través de membranas.

3.3.6.6 Industria Alimentaria

Las CDs presentan un amplio campo en la industria alimentaria ya que son usadas para : a) Enmascarar componentes no deseados, muchos alimentos tienen constituyentes que les confieren un sabor amargo, las CDs eliminan el sabor amargo de los jugos de frutas cítricas producido por flavonoides (naringina) y limonoides (limonina), por la formación de un complejo de inclusión entre estos y las CDs. b) Liberación controlada de constituyentes alimentarios deseados, como los sabores en gomas de mascar c) Eliminación de constituyentes no deseados, las CDs se usan para remover colesterol de huevos y productos lácteos, compuestos fenólicos que producen el oscurecimiento de jugos de frutas y verduras. d) Protección de constituyentes (sabores) en los procesos industriales, ya que la mayoría de los saborizantes son líquidos o aceites volátiles, las CDs actúan como encapsulantes moleculares protegiendo a los sabores de los procesos rigurosos como: congelamiento, descongelamiento y calentamiento.

3.3.6.7. Industria Cosmética

En el área cosmética las CDs encuentran un amplio campo de acción, sobre todo en la protección y liberación controlada de fragancias, los principales beneficios son la estabilización, control del aroma, mejoramiento del proceso por convertir un ingrediente líquido a un sólido, protección y liberación del sabor en lápiz labial, aumento de la solubilidad acuosa y estabilidad térmica de aceites, etc.

3.3.6.8 Agricultura

Las CDs forman complejos de inclusión con una amplia variedad de productos agrícolas como herbicidas, insecticidas, fungicidas, repelentes, feromonas y reguladores de crecimiento, aumentando la solubilidad y estabilidad.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la utilidad de la 2,6 di-O-metil- β -ciclodextrina, 2,3,6 tri-O-metil- β -ciclodextrina y de la hidroxipropil- β -ciclodextrina en la formación de complejos de inclusión con el clorambucilo, con la finalidad de mejorar su solubilidad, estabilidad y permeación transbucal *in vitro*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de la DM- β -CD, TM- β -CD e HP- β -CD sobre la solubilidad acuosa del clorambucilo.
- Evaluar el efecto de la DM- β -CD, TM- β -CD e HP- β -CD sobre la estabilidad acuosa del clorambucilo.
- Preparar los complejos de inclusión (clorambucilo-ciclodextrina) en estado sólido por los métodos de co-precipitación y liofilización.
- Caracterizar los complejos de inclusión en estado sólido por calorimetría diferencial de barrido, espectroscopia de absorción infrarroja y microscopía electrónica de barrido.
- Determinar mediante espectroscopia de absorción infrarroja por transformadas de Fourier/ Reflectancia total atenuada y calorimetría diferencial de barrido si las ciclodextrinas utilizadas alteran la barrera de permeabilidad de la mucosa bucal de cerdo *in vitro*.
- Determinar el flujo del clorambucilo y de sus complejos de inclusión con ciclodextrinas, a través de mucosa bucal de cerdo, mediante pruebas de permeación *in vitro*.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1 Reactivos

Clorambucilo (Fluka Chemie GmbH, Switzerland)

Heptakis (2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina (SIGMA-ALDRICH, USA)

Heptakis (2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina (Fluka Chemie GmbH, Switzerland)

Hidroxipropil - β -ciclodextrina (Donada por Nutrer S.A, México)

Acetonitrilo (reactivo analítico, Fermont; México)

Agua destilada (Obtenida del equipo Milli-Q, Millipore)

Ácido acético glacial (reactivo analítico, Merck; México)

Etanol (reactivo analítico, Fermont; México)

Metanol (reactivo analítico, Fermont; México)

Fosfato monobásico de potasio (Productos Químicos Monterrey, S.A: México)

Hidróxido de sodio (J.T. Baker NJ USA)

Bromuro de potasio (Productos Químicos Monterrey, S.A: México)

Cloruro de sodio (Productos Químicos Monterrey, S.A: México)

Sulfato de sodio (Productos Químicos Monterrey, S.A: México)

5.1.2 Equipos e instrumentos

Balanza analítica BBC32 (Boeco; Germany)

Baño de agua (Polyscience 5L, USA)

Microcentrifuga EBA 12, Hettich

pH metro (Corning 430, UK)

Cromatógrafo de Capa Fina de Alta Resolución, Automatic TLC Sampler III Versión 2.12 (CAMAG, Suiza).

Scanner 3 y software CATS Versión 4.06 para Cromatografía de Capa Fina de alta resolución (CAMAG, Suiza).

Placas de sílica gel C18, fase reversa (Machery-Nagel; Germany)

Cámaras cromatográficas de fondo plano

Espectrofotómetro UV-VIS, (Varian, Modelo Cary IE 95031003, Australia)

Sonicador (Branson Branson 5210, USA)

Liofilizadora Labconco (USA)

Infrarrojo por transformadas de Fourier, con celdas de ATR. FTIR-8300. Contiene un cristal ATR de forma trapezoidal de 80 x 10 x 4 mm. Con un ángulo de corte de 45°, una resolución de 1 y una sensibilidad de 0.1 unidades. (Shimadzu, Japón).

Calorímetro Diferencial de Barrido Q 10, TA Instruments (Canada)

DSC Refrigerated Cooling system (Canada)

Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JMS-25sII, Japón)

Celdas verticales tipo Franz con un área de exposición promedio de 0.8244 cm² y un volumen receptor de 1.8 ml. (Figura 14).

Cristalería en general

5.1.3 Material biológico

Mucosa bucal de cerdo.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Método de cuantificación para el clorambucilo

Las muestras obtenidas de los estudios de solubilidad y estabilidad se evaluaron mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC por sus siglas en inglés). Se utilizaron placas de sílica gel C18, y la fase móvil fue acetonitrilo: agua: ácido acético (55:44:1).

Las muestras, una vez filtradas y llevadas a el volumen deseado, se colocaron en el aplicador del cromatógrafo (Automatic TLC Sampler III, CAMAG Suiza), se aplicaron 1000 nL en banda de 3 mm sobre la placa de sílica gel C18 y con una distancia de 10 mm entre cada aplicación. La placa se colocó en la cámara de elución la cual contenía 10 mL de la fase móvil y se dejó correr a una altura de 4.5 cm. Una vez seca la placa, se leyó a 255 nm en el scanner 3 (CAMAG Suiza), evaluándose con el Software CATS 4 (CAMAG Suiza), el área bajo la curva (ABC) del pico correspondiente al clorambucilo. El área se interpoló en la curva de calibración correspondiente para obtener la concentración.

5.2.1.1 Curvas de Calibración en HPTLC

Las curvas de calibración se prepararon de siguiente manera:

Se prepararon soluciones con regulador de fosfatos pH 7.4 con las siguientes concentraciones de CD 0, 1.0, 2.5, 5, 7.5 y 10%. A cada solución se le agregaron 100 µL de una solución stock de clorambucilo en metanol (17.5mg/mL), De estas soluciones se aplicaron en placas de sílica gel C18 de 100 – 2400 nL, para obtener un amplio rango de cantidades de clorambucilo de 20 – 500 ng (7 puntos) Las placas se corrieron en la fase móvil y se leyeron a 255 nm en el escáner 3 (CAMAG, Suiza) Cada curva se realizó por triplicado. Se reportan en el anexo 1.

5.2.1.2 Curvas de calibración utilizadas para la cuantificación de clorambucilo en los estudios de permeación.

Se realizó una curva de calibración por triplicado para el clorambucilo, con la solución utilizada como fase receptora (solución reguladora de fosfatos pH 7.4 conteniendo diferentes concentraciones de metil-β-ciclodextrina, 50, 3.5 y 0.39 mg/ml) en presencia de mucosa bucal. Esto se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se aisló mucosa bucal de cerdo y se colocó en solución reguladora de fosfatos pH 7.4 conteniendo metil-β-ciclodextrina al 5% durante 8 horas a 37°C y con agitación constante.

La solución obtenida se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. y posteriormente se filtró. Esta solución se utilizó como medio para preparar la curva de calibración del principio activo. El rango de concentraciones del clorambucilo fue de 1 – 26 µg/mL (8 puntos), las soluciones se leyeron en el espectrofotómetro a 255nm. (Anexo 1)

5.2.1.3 Curva de calibración en etanol.

Siguiendo la metodología anterior se realizó una curva de calibración del clorambucilo en etanol, para cuantificar el principio activo retenido en la mucosa bucal de cerdo. La solución que se utilizó fue etanol en contacto con la mucosa bucal de cerdo, durante 24 h a 37 °C. (Anexo 1)

5.2.2 Solubilidad del clorambucilo en diferentes concentraciones de ciclodextrina.

Los estudios de solubilidad se realizaron de acuerdo a la metodología planteada por Loftson et al. (1989) la cual fue modificada del método de Higuchi y Connors.

Se prepararon soluciones con regulador de fosfatos pH 7.4 (USP 24) conteniendo diferentes cantidades de ciclodextrina (0, 2.5, 5, 7.5, 10% p/v), a cada solución se le adicionó un exceso de clorambucilo. Las suspensiones se sonicaron durante dos horas y posteriormente se colocaron en un baño de agua a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1$ durante 24 horas, transcurrido este tiempo, las suspensiones se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 minutos, del sobrenadante se tomó una alícuota de 100 µL, la cual se filtró y se diluyó a 1 mL. La cantidad de clorambucilo disuelto se cuantificó por medio de cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC por sus siglas en inglés). Cada determinación se realizó por triplicado.

5.2.3 Estabilidad química del clorambucilo

Se prepararon soluciones con regulador de fosfatos pH 7.4, conteniendo distintas cantidades de ciclodextrina (0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 % p/v). Así mismo se preparó una solución stock de clorambucilo en metanol.

A cada solución de CD previamente equilibrada a 37°C y con agitación, se le adicionó 100 µL de la solución stock de clorambucilo. La concentración inicial de clorambucilo en la solución final fue de 1.1×10^{-4} M, la concentración final de metanol en el medio de reacción fue de 0.5%. A intervalos de una hora se tomaron muestras de 100 µL, se diluyeron a 1mL y se cuantificó la cantidad remanente de clorambucilo en el medio de reacción por HPTLC. Cada determinación se realizó por triplicado.

5.2.4 Preparación del complejo de inclusión entre las CDs y el clorambucilo

5.2.4.1 Método de co-precipitación

Se pesaron 50 mg de cada ciclodextrina, las cuales se adicionaron a 3 mL de etanol absoluto y se calentaron con agitación hasta que se disolvieron. Una vez disuelta la CD se adicionaron 35 mg de clorambucilo. Esta solución se tapó y se guardó a 0°C. Después de 72 h, se observó un precipitado blanco (atribuible a la formación de complejo), el cual se filtró (membranas de 0.45 µm) y lavó con etanol. El filtrado una vez lavado se colocó en un desecador a 4°C.

5.2.4.2 Método de Liofilización

Se pesaron 70 mg de cada una de las ciclodextrinas, se disolvieron en agua y se les adicionaron 35 mg de clorambucilo, cada suspensión formada se sonicó durante dos horas. Trascurrido este tiempo se filtraron (0.45 µm) y las soluciones obtenidas se congelaron externamente a -20°C y se liofilizaron (Liofilizadora Labconco) bajo las siguientes condiciones: Temperatura: -50°C, Presión: 50×10^{-3} mbar.

5.2.5 Eficiencia de encapsulación

La cantidad de clorambucilo incorporada en la cavidad de las ciclodextrinas se evaluó de la siguiente manera:

Se pesaron 5-7 mg de cada polvo obtenido y se disolvieron en 1 mL de regulador de fosfatos pH 7.4, se tomó una muestra de cada solución y se aforaron a 5 mL regulador de fosfatos pH 7.4, las muestras obtenidas se cuantificaron por HPTLC. El área bajo la curva obtenida se interpoló en la curva correspondiente con la finalidad de obtener la concentración de clorambucilo. Cada determinación se realizó por triplicado.

5.2.6 Caracterización de los complejos

5.2.6.1 Caracterización del complejo por Calorimetría Diferencial de Barrido

Se corrieron calorimetrías de los siguientes compuestos:

Complejos obtenidos por los dos métodos (liofilización y co-precipitación):

CHL:DM-β-CD, CHL:TM-β-CD y CHL:HP-β-CD

Mezclas físicas:

CHL:DM-β-CD, CHL:TM-β-CD y CHL:HP-β-CD

Compuestos solos:

CHL, DM-β-CD, TM-β-CD y HP-β-CD

Se pesaron 3-5 mg de cada muestra y se colocaron en charolas de aluminio no herméticas, estas se cerraron y se colocaron en el calorímetro. Se usó una rampa de calentamiento de 10°C/min., en un rango de temperatura de 0 – 300 °C, con un flujo de nitrógeno de 50mL/min. El instrumento se calibró previamente dentro de $\pm 0.1^\circ\text{C}$ usando Indio ultra puro, el cual tiene un punto de fusión teórico de 156.6°C y una entalpía de 6.80 cal/g.

5.2.6.2 Caracterización del complejo por Espectroscopia Infrarroja

Los espectros de absorción infrarroja se obtuvieron de la siguiente manera:

Se pesaron en un mortero de ágata 250 mg de KBr a los cuales se le adicionó una mínima cantidad de cada muestra (se determinaron infrarrojos para las mismas muestras que en el calorímetro) y se trituraron hasta obtener un polvo fino y homogéneo. El polvo se colocó en una prensa manual y se formó la pastilla, la cual se colocó en el infrarrojo para su lectura.

5.2.6.3 Caracterización del complejo por Microscopía Electrónica de Barrido

Las muestras (las mismas de la calorimetría diferencial de barrido) se colocaron en el porta muestras y se tiñeron con tetróxido de osmio, posteriormente se cubrieron con una fina película de oro de aproximadamente 20 nm y se examinaron por microscopía electrónica de barrido a 12.5 KV.

5.2.7 Estudios de permeación del clorambucilo a través de mucosa bucal de cerdo

5.2.7.1 Obtención de la mucosa bucal

Se utilizó mucosa bucal de cerdo recuperada del rastro después del sacrificio de los animales y antes de ser tratados con vapor o agua caliente, para evitar que se dañara el tejido. La mucosa bucal se aisló y limpió utilizando un equipo de disección, se desechó todo el músculo, tejido adiposo y tejido conjuntivo. Durante el proceso la mucosa se hidrató con solución salina fisiológica (NaCl, 0.9%) para evitar resequead. La mucosa se congeló a 0°C hasta ser utilizada, por un lapso no mayor a una semana.

5.2.7.2 Efecto de las β -ciclodextrinas sobre la barrera de permeabilidad de la mucosa bucal de cerdo

5.2.7.2.1 Efecto de las β -ciclodextrinas sobre la barrera de permeabilidad de la mucosa bucal por medio de Espectroscopia Infrarroja

Se cortaron pedazos de mucosa bucal de aproximadamente 1 cm. de ancho por 10 cm. de largo y se colocaron en contacto con soluciones de las distintas ciclodextrinas utilizadas al 10% en regulador de fosfatos pH 7.4, a 37°C durante 8 h. Trascurrido este tiempo la

mucosa se lavó con agua destilada, para retirar el exceso de ciclodextrina y se colocó en refrigeración en un desecador, cuando la mucosa estuvo seca, se determinó el espectro de absorción infrarroja de cada muestra (46 barridos) y de cada espectro se obtuvo el área, altura y número de onda de las bandas cercanas a 2850 y 2920 cm^{-1} , correspondientes al estrechamiento simétrico y asimétrico respectivamente de las uniones C-H, pertenecientes a los lípidos de la mucosa bucal.

5.2.7.2.2 Efecto de las β -ciclodextrinas sobre la barrera de permeabilidad de la mucosa bucal por medio de Calorimetría diferencial de barrido

Se cortaron pedazos de mucosa bucal de aproximadamente 1 cm^2 y se colocaron en contacto con soluciones de las distintas ciclodextrinas utilizadas al 10% en regulador de fosfatos pH 7.4, a 37°C durante 8 h. Transcurrido este tiempo la mucosa se lavó con agua destilada, para retirar el exceso de ciclodextrina y se colocó en refrigeración en un desecador. Cuando la mucosa estuvo seca, se transfirió a otro desecador conteniendo una solución saturada de sulfato de sodio, la cual genera una humedad relativa del 97%, con la finalidad de hidratar la mucosa. Cuando ésta presentó 30% de humedad (determinada por diferencia de peso entre la mucosa seca y la mucosa hidratada) se pesaron muestras de 50 mg de mucosa y se colocaron en charolas de aluminio recubiertas herméticas, las cuales se sellaron y se colocaron en el calorímetro. Las condiciones de las corridas fueron: rampa de calentamiento 3°C/min., flujo de nitrógeno 50 mL/min. y un rango de calentamiento de 0 – 120°C. De los termogramas obtenidos se obtuvieron la temperatura de fusión (T_M) y la entalpía del proceso (ΔH).

5.2.7.3 Permeación del clorambucilo y de sus complejos de inclusión a través de mucosa bucal *in vitro*.

Los estudios de permeación *in vitro*, se llevaron a cabo utilizando celdas de difusión verticales tipo Franz (Figura 14).

Se colocaron porciones de mucosa bucal (0.7967 cm^2) en solución salina fisiológica para descongelarlas. Se montaron las celdas de permeación tipo Franz (como se muestra en la figura 14), colocando en el compartimento donador y receptor 0.5 y 1.5 mL respectivamente de solución reguladora de fosfatos pH 7.4, las celdas se colocaron en un baño de agua previamente estabilizado a 37°C con agitación constante para hidratar por 30 minutos. Transcurrido este tiempo se extrajo la solución de ambos compartimentos y se

colocaron en el compartimento donador 100 μL de regulador de fosfatos conteniendo 2 mg de clorambucilo o el equivalente a 2 mg de clorambucilo de los complejos obtenidos y en la fase receptora se colocó 1.5 mL de solución reguladora de fosfatos pH 7.4 conteniendo metil- β -ciclodextrina al 5%. Las celdas permanecieron 8 h en un baño de agua a 37°C y con agitación constante. Durante la primera hora se tomaron muestras (400 μl) cada 15 minutos y posteriormente cada hora, reponiendo el volumen con medio fresco. Cada muestra se aforó a 1 mL y se leyó a 255 nm en un espectrofotómetro. La absorbancia obtenida se interpoló en la curva de calibración correspondiente.

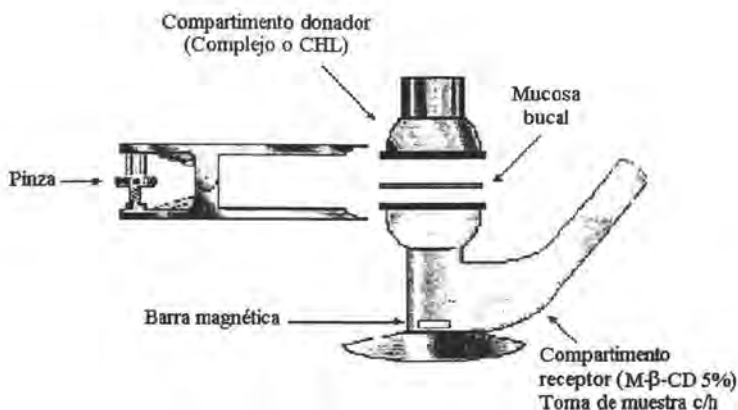


Figura 14. Celda de difusión tipo Franz, para estudios de permeación *in vitro*.

Así mismo se realizaron estudios de permeación para evaluar si las ciclodextrinas utilizadas para promover la permeación de clorambucilo a través de mucosa bucal. La metodología que se utilizó fue la anteriormente descrita pero con algunas variantes:

La mucosa bucal montada en las celdas de permeación se trató e hidrató durante una hora con 100 μL de una solución de cada una de las ciclodextrinas utilizadas al 10%. Trascurrido este tiempo se retiró dicha solución y la mucosa se lavó con regulador de fosfatos pH 7.4 para retirar en su totalidad la solución de ciclodextrina. Se colocó nuevamente en el compartimento receptor 1.5 mL de solución reguladora de fosfatos pH 7.4 conteniendo metil- β -ciclodextrina al 5% y en el compartimento donador 100 μL de una solución reguladora de fosfatos pH 7.4 conteniendo 2 mg de clorambucilo. Al igual que en

los estudios anteriores se tomaron muestras a los mismos intervalos de tiempo y la cantidad de clorambucilo permeada se determinó leyendo a 255 nm.

5.2.7.4 Extracción del clorambucilo retenido en la mucosa bucal durante el estudio de permeación.

5.2.7.4.1 Determinación del porcentaje de recuperación para la extracción del clorambucilo retenido en la mucosa bucal.

Se colocaron 100 mL de una solución etanólica de clorambucilo de concentración conocida en la superficie de pequeñas porciones de mucosa bucal (1 cm²) y se dejó evaporar a temperatura ambiente. Posteriormente se cortaron cada una de las porciones en pedazos más pequeños y se colocaron en viales con 5 mL de etanol, los viales se mantuvieron en agitación constante durante 24 horas a temperatura ambiente.

Las suspensiones se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos, se tomó una alícuota del sobrenadante, y se leyó a 255 nm. La absorbancia obtenida se interpoló en una curva de calibración, determinándose el porcentaje de principio activo extraído con respecto a la cantidad total colocada. Cada determinación se realizó por triplicado.

5.2.7.4.2 Determinación del clorambucilo retenido en la mucosa bucal durante los estudios de permeación.

Concluida la permeación, la mucosa bucal se retiró de las celdas de permeación, se cortó en pequeños pedazos y se colocaron en viales con 5 mL de etanol, se colocaron a temperatura ambiente y con agitación constante durante 24 h. Posteriormente las suspensiones se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos, se tomó una alícuota del sobrenadante, y se leyó a 255 nm. La absorbancia obtenida se interpoló en una curva de calibración, para obtener la concentración de clorambucilo retenido en la mucosa bucal.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 SOLUBILIDAD DEL CLORAMBUICLO EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CICLODEXTRINA

Hay muchos fármacos que se "liberan por si mismos" y no necesitan de sistemas de liberación sofisticados, ya que son solubles y estables en los fluidos biológicos y pH fisiológico, generalmente son de bajo peso molecular y razonablemente lipofílicos que pueden ser transportados satisfactoriamente a través de las barreras celulares y llegar a su sitio de acción. Pero hay muchos fármacos, que pueden ser de mayor tamaño, menos solubles, menos estables y menos permeables, estos compuestos podrían ser mucho más difíciles de liberar por las rutas convencionales, por lo que se necesitan nuevos métodos para liberación de fármacos, para que atraviesen las mucosas y de ser posible lleguen a sitios específicos (drug targeting) que incluyen tejidos, órganos y células.

La molécula que tiene el mejor perfil farmacológico, no siempre es la mejor para el diseño de la forma farmacéutica, así aunque las relaciones estructura-actividad son importantes, no lo son todo. Los aspectos relacionados a la relación estructura-liberación necesitan también ser tomados en cuenta. Factores críticos como la solubilidad, la permeabilidad hacia las membranas, rutas metabólicas y estabilidad necesitan ser considerados. Desafortunadamente los expertos en el diseño de formas farmacéuticas no intervienen en el diseño del fármaco, generalmente reciben la molécula que tuvo mayor éxito en las pruebas farmacológicas y toxicológicas y se les encarga diseñar la forma de dosificación.

A lo largo de un gran número años se han usado diversas técnicas para aumentar la solubilidad acuosa de muchas moléculas, entre estas técnicas se encuentran: el ajuste de pH, la adición de co-solventes, la adición de surfactantes y la adición de ciclodextrinas, esta última muy eficiente en moléculas no polares (Myrdal y Yalkowsky, 1999).

La formación de complejos de un fármaco con agentes no tóxicos, es un tipo de manipulación usado para mejorar sus propiedades de disolución. Las ciclodextrinas han sido usadas para este propósito (Pitha, 1985). Este incremento de la solubilidad es debido a la formación de un complejo de inclusión, por la introducción de la región no polar del fármaco (molécula huésped) en la cavidad de la molécula de ciclodextrina (molécula anfitrión) (Li, 1999).

Como se mencionó en la introducción, el clorambucilo es insoluble en soluciones acuosas, por lo que se evaluó el efecto de las ciclodextrinas sobre su solubilidad. Debido a la inestabilidad del CHL no fue posible determinar su solubilidad en soluciones acuosas por el método reportado por Higuchi y Connors, en su lugar se formaron soluciones saturadas del CHL en soluciones acuosas que contenían diferentes concentraciones de las ciclodextrinas estudiadas, por sonicación, por un corto periodo de tiempo, permitiendo la estabilización durante 24 horas a 37°C. Cada experimento se repitió varias veces y el resultado reportado es el promedio de al menos tres determinaciones.

Como lo describen Higuchi y Connors (1965), las curvas de solubilidad se dividen en dos categorías principales, tipo A y tipo B (Figura 15). La curva de solubilidad tipo A se obtiene cuando la solubilidad aparente del sustrato incrementa con el incremento de la concentración del ligante. Se puede obtener una relación lineal (Tipo A_L), una curva positiva (Tipo A_p) o una curva negativa (Tipo A_N). El diagrama de solubilidad tipo B, se obtiene cuando se alcanza una meseta en la curva de solubilidad (Tenjarla et al., 1998)

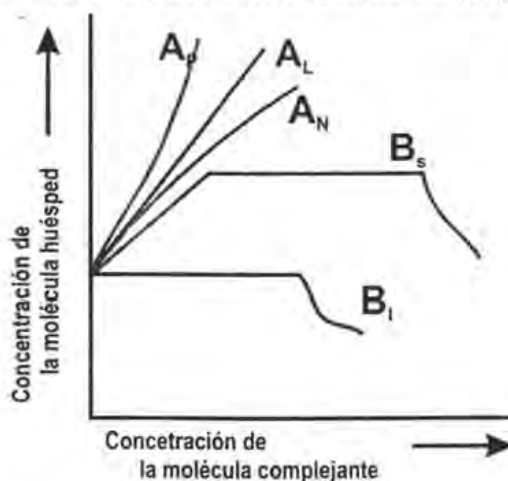


Figura 15, Diagramas de solubilidad de fases, tomada de: http://club.telepolis.com/jjtorresl/doc/USC/ciclodextrinas_imagenes.htm

La figura 16 muestra los diagramas de solubilidad de fase obtenidos para el clorambucilo con las distintas CD estudiadas. Como puede apreciarse la solubilidad incrementa como una función de la concentración de la CD. Las curvas de solubilidad obtenidas con la HP- β -CD, DM- β -CD y la TM- β -CD pueden ser clasificadas como del tipo A_1 , con una pendiente menor a 1 (0.0634, 0.8151 y 0.4543, respectivamente), indicando que el complejo formado tiene una relación molar 1:1, es decir el complejo formado tiene una dependencia de primer orden con respecto a la concentración de ciclodextrina. Este efecto fue menos evidente en el caso de la HP- β -CD, en el que se observa sólo un ligero aumento en la solubilidad del CHL bajo las condiciones de estudio.

La solubilidad del CHL se vio afectada de acuerdo al tipo de ciclodextrina. Por ejemplo utilizándose soluciones de ciclodextrinas al 8.7% y a 37°C se observó el siguiente orden: DM- β -CD (8.65 mg/ml de CHL \pm 0.12) > TM- β -CD (4.3 mg/ml de CHL \pm 0.3) > HP- β -CD (0.47 mg/ml de CHL \pm 0.02).

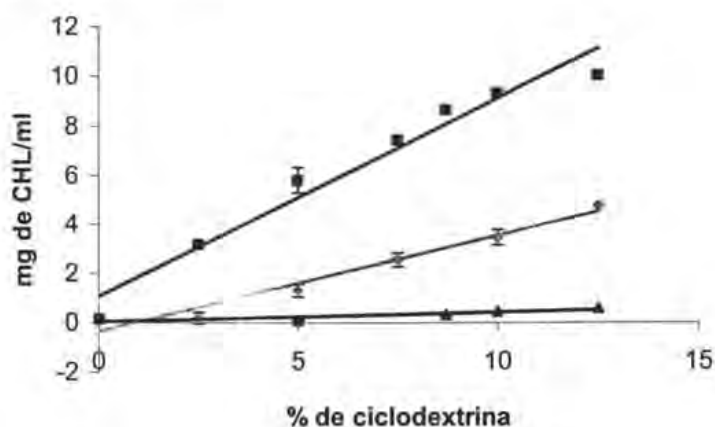


Figura 16. Diagrama de solubilidad del CHL en la presencia de DM- β -CD (■), TM- β -CD (◆) y HP- β -CD (▲) en solución acuosa a 37°C y pH

Las diferencias en las curvas de solubilidad son claramente notorias, (estadísticamente diferentes ANOVA, $F_{\text{Calculada}} 17.44 > F_{\text{Tablas}} 6.93$, $\alpha = 0.01$, anexo II). Los estudios de solubilidad indican que el CHL probablemente forma complejos de inclusión con las tres ciclodextrinas estudiadas.

Las diferencias en el aumento de la solubilidad por parte de las CDs, pueden estar relacionadas con la $K_{1:1}$ del complejo, la cual es un parámetro empírico que describe el incremento en la solubilidad aparente del fármaco en la presencia de CD (Vianna et al., 1998).

La constante de unión o de estabilidad ($K_{1:1}$) se obtuvo de los datos de solubilidad por medio de la ecuación 2.

$$K_{1:1} = \frac{\text{pendiente}}{S_0 (1 - \text{pendiente})} \quad (2)$$

En la ecuación 2, la pendiente es el cambio de la concentración de fármaco sobre el cambio de la concentración de ciclodextrina y representa en todos los casos la habilidad de complejación de la CD, S_0 es la solubilidad intrínseca del fármaco. Para el CHL la solubilidad intrínseca (S_0) es de 0.158 mg/ml. Usando esta información y los resultados del diagrama de solubilidad, se obtuvieron los valores de $K_{1:1}$, los cuales se reportan en la tabla 10.

Tabla 10. Constantes de estabilidad para los complejos formados entre el CHL y ciclodextrinas

Complejo	$K_{1:1}$ (M^{-1})	Tipo de diagrama de solubilidad
CHL:DM- β -CD	1067.54	A_L
CHL:TM- β -CD	520.76	A_L
CHL:HP- β -CD	49.97	A_L

De los resultados obtenidos se observa (Figura 16 y Tabla 10) que la constante de unión ($K_{1:1}$) de los complejos es dependiente de la ciclodextrina estudiada mostrando la siguiente tendencia: CHL:DM- β -CD ($1067.54M^{-1}$) > CHL:TM- β -CD ($520.76 M^{-1}$) > CHL:HP- β -CD ($49.97M^{-1}$).

Para el complejo formado entre CHL y DM- β -CD la $K_{1:1}$ es mayor que para las otras dos ciclodextrinas utilizadas, probablemente debido a la presencia de grupos metilo que expanden la región hidrofóbica de la cavidad de la DM- β -CD (la metilación hace más grande el interior del cono - mayor profundidad- hidrofóbico, estimado de 10-11 Å para la

DM- β -CD comparado con los 7.8 Å de la β -CD) y por lo tanto aumenta su afinidad por el CHL.

Así también como la interacción hidrofóbica, el efecto estérico juega también un papel importante en la interacción fármaco-ciclodextrina, ya que es interesante notar que aunque la cavidad de la TM- β -CD tiene mayor hidrofobia comparada con la DM- β -CD, el valor de $K_{1:1}$ para el complejo formado entre CHL y TM- β -CD es menor, sugiriendo que el sustituyente metilo de la posición 3-O de la ciclodextrina reduce la interacción entre el CHL y la TM- β -CD, ya que a mayor grado de sustitución, hay un estrechamiento de la apertura de la cavidad. Resultados similares fueron obtenidos por Ventura et al., (1994) al evaluar el efecto en la solubilidad del ácido 4-bifenil acético por medio de la DM- β -CD, TM- β -CD e HP- β -CD.

Se ha observado también que la constante de unión varía con el grado de sustitución de la CD, pero no sigue una tendencia general, es decir a veces aumenta el valor de ésta constante y otras veces disminuye dependiendo del fármaco utilizado, lo cual sugiere la posibilidad de interacciones específicas entre los diferentes componentes o grupos funcionales del fármaco y una CD específica (Zia et al., 2000).

En el caso de la HP- β -CD se observa que su capacidad de solubilizar al CHL es mínima lo cual puede ser atribuido a varios factores:

La solubilidad acuosa de la HP- β -CD muestra un incremento exponencial con el incremento de sustituyentes, mientras que su capacidad de unión con otras moléculas disminuye. En nuestro caso el grado de sustitución de la HP- β -CD es de 4.6.

Zia et al., (2001) encontraron que la habilidad de formar complejos de la HP- β -CD, disminuye cuando el sustrato (fármaco) se encuentra ionizado (positivo o negativo) ya que al encontrarse cargado aumenta su hidrofilia. Esto basado en la regla de "semejante disuelve a semejante", con un incremento en la hidrofilia del sustrato, aumenta la interacción con los solventes polares, disminuyendo por lo tanto la complejación con ciclodextrinas. Los estudios de solubilidad se realizaron a pH 7.4, el CHL tiene dos grupos ionizables, el grupo ácido con un pKa de 5.1 y el grupo amino con pKa de 3.0, por lo que al pH utilizado el fármaco se encuentra ionizado.

Cabe aclarar que la $K_{1:1}$ reportada en la tabla I (para las tres ciclodextrinas utilizadas), se denomina constante de unión aparente, ya que el análisis por HPTLC muestra la presencia no solo del CHL sino también de sus principales productos de degradación (CHLOH y $\text{CHL}(\text{OH})_2$ figura 5). Tanto CHLOH y $\text{CHL}(\text{OH})_2$ están disponibles en la solución para competir con el CHL por la unión con la CD, disminuyendo de esta forma la solubilidad aparente del CHL. Esta competencia puede conducir a obtener valores subestimados de $K_{1:1}$. A pesar de que se usó un método alternativo al reportado por Higuchi y Connors desarrollado por Loftsson et al., (1989) no se pudo evitar la degradación del CHL siendo esta mayor cuando se usó la HP- β -CD, lo cual explicaría el bajo valor de la $K_{1:1}$, por lo que podemos decir que el método de solubilidad empleado no es el adecuado para estimar el valor real de $K_{1:1}$ cuando el fármaco se degrada rápidamente y los productos de degradación pueden interactuar con las ciclodextrinas. Resultados parecidos se obtuvieron con melfalan e HP- β -CD (Ma et al., 2000). Sin embargo se puede obtener una conclusión cualitativa de estos estudios de solubilidad y es que las tres ciclodextrinas estudiadas aumentan linealmente la solubilidad del CHL con el incremento de la concentración en el siguiente orden DM- β -CD > TM- β -CD > HP- β -CD. Una tendencia similar se encontró para la complejación con ibuprofan e ibuprofeno, sugiriendo que la presencia de sustituyentes metilo y más aún de sustituyentes hidroetilo e hidroxipropilo obstruyen la inclusión de ibuprofan en la cavidad de la CD debido a la cubierta parcial de la apertura. Este efecto fue marcado particularmente con los derivados hidroxialquilados. Por otro lado, es evidente que en el caso de los derivados metilados, el efecto estérico es directamente menos intenso y probablemente parcialmente contrarestando por la expansión de la cavidad hidrofóbica, lo cual aumenta la posibilidad de que el sustrato se una por medio de un efecto hidrofóbico (Mura et al., 2002).

6.2 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD QUÍMICA DEL CHL

Durante el diseño y desarrollo de formas de dosificación de fármacos, la estabilidad del principio activo (p.a.) debe ser uno de los principales criterios para determinar su "sustentabilidad". Diversas formas de inestabilidad pueden conducir al rechazo del producto: como la hidrólisis, fotólisis, oxidación etc. La formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas es un recurso tecnológico que ha permitido generar nuevas especies químicas con diferentes fisicoquímicas.

Se sabe que el CHL se degrada en solución acuosa, como ya se explicó en la introducción, esta degradación es dependiente del pH, conforme este aumenta el grado de degradación se incrementa. Esta degradación en solución acuosa sigue una cinética de pseudo primer orden en ausencia y presencia de CDs, como es evidente en las figuras 17, 18 y 19. Las tres ciclodextrinas estudiadas disminuyen la degradación del CHL, este efecto es mayor en la presencia de TM- β -CD (Tabla 11), La constante de pseudo primer orden (K_{obs}), fue obtenida a partir de la regresión lineal del logaritmo natural de la cantidad remanente de CHL contra el tiempo. En la tabla 11 se puede observar que a una concentración de 8.7 % de CD, la TM- β -CD (37°C, pH 7.4) reduce la K_{obs} por un factor de 30, mientras que la DM- β -CD y la HP- β -CD reducen la k_{obs} por un factor de 13 y de 14 respectivamente.

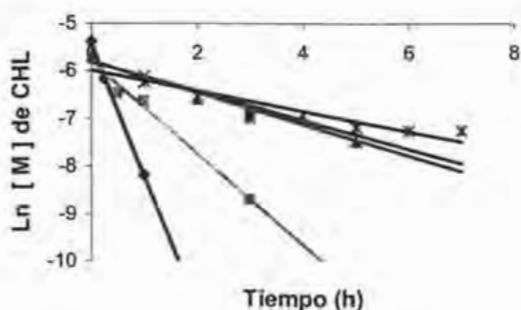


Figura 17. Hidrólisis del CHL en la presencia de varias concentraciones de DM- β -CD. (♦) 0.0 %; (■) 1.0%; (▲) 2.5%; (x) 5.0 %; (*) 8.7 %

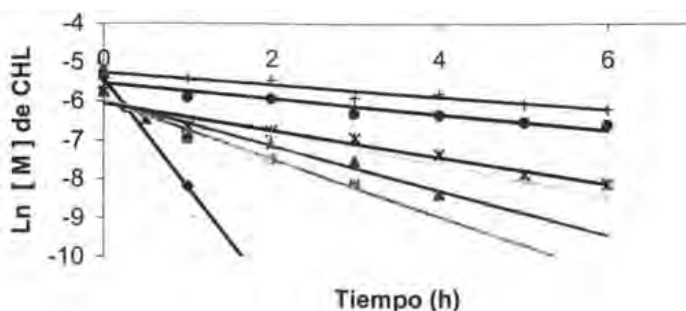


Figura 18. Hidrólisis del CHL en la presencia de varias concentraciones de HP-β-CD. (♦) 0.0 %; (■) 0.06 %; (▲) 1.0 %; (x) 2.5 %; (*) 5.0%; (●) 8.7%; (+) 10.0%

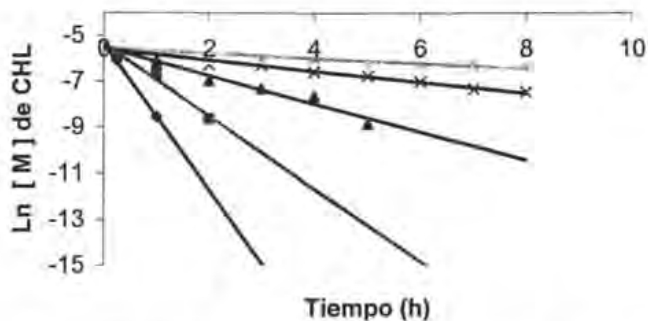


Figura 19. Hidrólisis de CHL en la presencia de varias concentraciones de TM-β-CD. (♦) 0.0% (■) 0.06 %; (▲) 1.25 %; (x) 2.5%; (*) 5.0% (●) 8.7 %

A menudo se asume que la naturaleza del complejo de CDs derivadas es la misma que la de los complejos formados por las CDs nativas, sin embargo, se ha visto que la conformación de la CD es modificada al tener sustituyentes, como grupos metilo, por lo que cambia ligeramente la forma de la cavidad de la CD. Es posible que la variación en la constante de estabilidad y el grado de degradación del fármaco, pueda ser explicada por tales cambios en la forma de la cavidad de la ciclodextrina (Masón et al, 1998).

Tabla 11. Constantes de estabilidad de la hidrólisis del CHL-CD a 37°C en regulador de fosfatos pH 7.4 y grado de aumento de la estabilidad.

Ciclodextrina	% CD	k_{obs} (h^{-1})	k_0/k_{obs}
	0,00	2,776	1
DM- β -CD	1,0	0,963	3
	2,50	0,33	8
	5,00	0,30	9
	8,70	0,215	13
HP- β -CD	0,6	1,013	3
	1,0	0,577	5
	2,5	0,408	7
	5,00	0,3477	8
	8,70	0,2035	14
	10,00	0,1572	18
TM- β -CD	0,06	1,586	2
	1,25	0,612	5
	2,50	0,242	11
	5,00	0,112	25
	8,70	0,092	30

k_{obs} : Constante de estabilidad

k_0/k_{obs} : grado de aumento de la estabilidad

En la figura 20, se observa el efecto de la concentración de las CDs estudiadas sobre la degradación de CHL. La constante de degradación de pseudo primer orden disminuye hiperbólicamente en los tres casos, con el incremento de la concentración de CD, mostrando una cinética de saturación, lo anterior indica que el retardo de esta degradación es vía formación de complejos de inclusión (Ikeda et al, 2002).

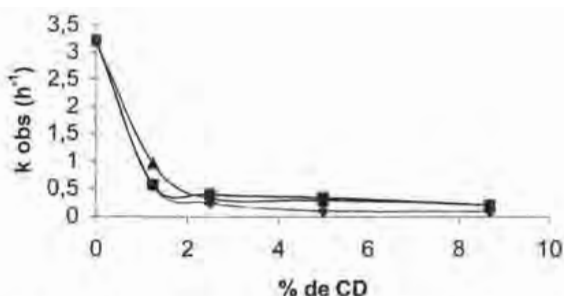
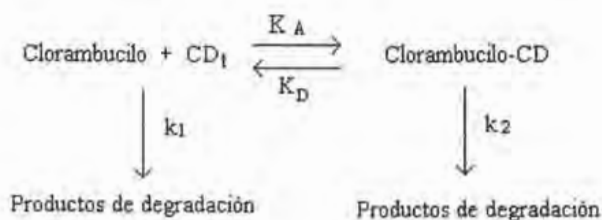


Figura 20. Constantes de degradación para el CHL como una función de la concentración de CD, en regulador de fosfatos a 37°C. (♦) TM-β-CD; (▲) DM-β-CD; (■) HP-β-CD



Esquema 1

La dependencia de la k_{obs} de la reacción de hidrólisis sobre la concentración de TM-β-CD fue tratada cuantitativamente por la ecuación 3 (Backensfeld et al., 1990).

$$\frac{[\text{CD}_T]}{(k_1 - k_{\text{obs}})} = \frac{[\text{CD}_T]}{(k_1 - k_2)} + \frac{1}{K_A \times (k_1 - k_2)} \quad (3)$$

Siguiendo el esquema 1 y con base a que el complejo formado entre la CD y el CHL tiene una relación 1:1, donde K_A es la constante de estabilidad (o de unión) del complejo, k_1 es la constante de degradación de pseudo primer orden del CHL sin acomplejar, k_2 es la constante de degradación de pseudo primer orden para el complejo de inclusión y CD_T la concentración total de CD. La gráfica de Lineweaver-Burk (Backensfeld et al., 1990) se obtiene al graficar $[\text{CD}_T]/(k_1 - k_{\text{obs}})$ contra la concentración de CD. La gráfica de la ecuación 3, se basa en los datos de las figuras 17, 18 y 19, en los tres casos da una línea recta con un

coeficiente de correlación > 0.999 (figura 21), de acuerdo a esto, el esquema 1 describe adecuadamente la cinética de degradación del CHL en la presencia de CDs.

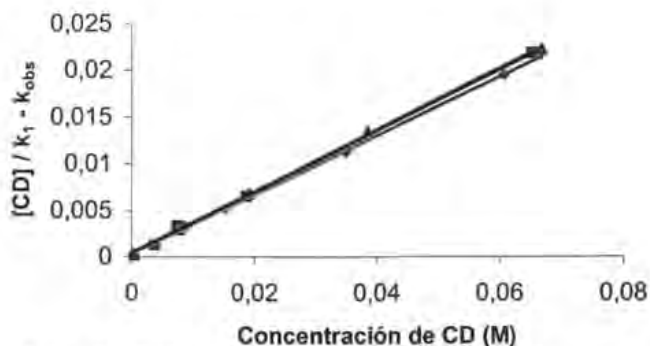


Figura 21. Gráfica de Lineweaver-Burk (de acuerdo a la ecuación 3 y a los datos de las figuras 17, 18 y 19). (◆) TM-β-CD; (▲) DM-β-CD; (■) HP-β-CD

Las diferencias en el grado de degradación del CHL por parte de las CDs, se puede deber a varias causas: A) Se ha observado que el tipo de sustituyente de la CD es importante para la estabilización del p.a. (esta estabilización también depende del fármaco). En el caso del CHL se observó que el grupo sustituyente que favorece la estabilización química del CHL es el grupo metilo. Algunos investigadores han reportado que los sustituyentes más lipofílicos, tales como metilo y etilo, son los más efectivos agentes estabilizantes (Backensfeld et al., 1990). B) El grado de sustitución de las CDs sustituidas también influye en la estabilización química de los compuestos, en general se ha observado que a mayor grado de sustitución de la CD da un mejor efecto estabilizante. Entre más grupos hidroxilo de las unidades de glucosa de la CD estén sustituidos, el efecto protector de la CD es mejor, debido a que el interior de la cavidad de la CD se alarga. La metilación hace más grande el interior del cono hidrofóbico (más profundidad), estimado de 10-11 Å comparado con los 7.8 Å de la β-CD (Loftsson, 1995). Esto explicaría las diferencias encontradas en la K_{obs} con las diferentes ciclodextrinas utilizadas. C) El estado de transición para la degradación del clorambucilo es muy polar con la separación de cargas. Cuando se forman los complejos de inclusión, la cavidad no polar de la CD mantiene un micro ambiente

desfavorable para la formación del estado de transición polar; por consiguiente, puede retardarse la degradación de CHL simplemente porque en los complejos de inclusión no se favorece la ionización del p.a., las CDs metiladas poseen un micro ambiente mas hidrofóbico que la HP- β -CD (Ma et al., 2000).

6.3 OBTENCIÓN DEL COMPLEJO EN ESTADO SÓLIDO

Hay un interés creciente en optimizar la eficacia de la actividad de un fármaco a través del uso de acarreadores de fármacos diseñados racionalmente. Las CDs son fuertes candidatos para ocupar este papel, modificando las propiedades físicas, químicas y biológicas de fármacos a través de la formación de compuestos de inclusión.

Un compuesto de inclusión constituye una forma única de complejo químico, en el cual una molécula es encerrada dentro de otra molécula o estructuras de moléculas. Esta combinación está caracterizada por la ausencia de enlaces químicos convencionales (iónico, covalente o covalente coordinado); el principio fundamental para su formación es simplemente que la molécula encerrada o huésped sea de forma, tamaño y carga conveniente para ocupar la cavidad dentro de la estructura sólida formada por las moléculas anfitrionas.

Se han propuesto varios métodos para obtener complejos de inclusión CD:fármaco en estado sólido, tanto en un medio de reacción semisólido como líquido, pero no existe un método general o universal, debido probablemente a que cada fármaco es un caso particular y las condiciones óptimas dependen de las características del fármaco y la CD, ya que hay métodos que conducen a la formación de un complejo real con algunas moléculas, mientras que con otras no.

El aislamiento de complejos de inclusión en estado sólido entre CDs y fármacos por el método de co-precipitación (CP) generalmente se obtiene de un modo relativamente simple en medios acuosos cuando el fármaco es estable. La precipitación del complejo se logra después de un periodo prolongado de agitación a temperatura ambiente (generalmente una semana) de una mezcla acuosa de CD y fármaco con una relación molar 1:1. Sin embargo la degradación significativa del CHL no se puede evitar bajo estas condiciones, las condiciones más favorables para evitar la degradación del CHL requiere la preparación del complejo en un medio con una constante dieléctrica baja, a bajo pH y baja temperatura. Los solventes con una baja constante dieléctrica pueden competir con el fármaco por la cavidad de la CD, sin embargo se ha demostrado que los complejos de inclusión entre DM- β -CD y varias moléculas orgánicas pueden ser re-cristalizadas a partir de metanol (Green et al., 1991). Por lo que en el caso del CHL al ser inestable en medio acuoso y al ser estable en solución etanólica a temperaturas bajas (Hovinen et al., 1997) se pudo aislar el complejo

con las tres ciclodextrinas estudiadas a partir de una solución de etanol que contenía un exceso de CHL, aunque cabe aclarar que con la HP- β -CD el rendimiento fue muy bajo, atribuido a la baja interacción entre esta CD y el CHL.

La liofilización (Lio) es uno de los métodos de preparación de complejos de inclusión de ciclodextrinas con fármacos. Este procedimiento es usado principalmente para la preparación de complejos con derivados de CD fácilmente solubles en agua (Funk et al., 1994). La liofilización, es un método ventajoso desde el punto de vista de la degradación del CHL, ya que el proceso toma lugar a baja temperatura, además de generar un mayor rendimiento y facilidad para el escalamiento.

6.3.1 Eficiencia de la formación de complejo en estado sólido

El análisis químico de los complejos de inclusión obtenidos por co-precipitación y liofilización, permitió determinar la relación molar en la que se encuentran el CHL y la CD. En la tabla 12 se presenta la eficiencia de encapsulamiento. Este análisis revela que el polvo obtenido por el método de co-precipitación etanólica y lavado con etanol, corresponde a la formación de un complejo con una relación molar 1:1, para el caso de la DM- β -CD cuya eficiencia de encapsulamiento fue del $99.16\% \pm 0.99$, para el caso de la TM- β -CD fue de $89.17\% \pm 4.387$, sin embargo, con la HP- β -CD se obtuvo una eficiencia del $16.21\% \pm 2.15$. Todos los polvos obtenidos por el método de liofilización tienen una eficiencia de encapsulamiento baja, para el caso de la DM- β -CD fue de $74.01\% \pm 2.37$, para la TM- β -CD de $26.61\% \pm 0.35$ y para la HP- β -CD de $14.52\% \pm 2.085$. El método de liofilización requiere la formación previa de una solución acuosa que contenga la CD y el fármaco en solución, la cual se realizó por medio de sonicación, en el caso de la TM- β -CD durante la sonicación se forma un precipitado, el cual al ser analizado por HPTLC corresponde al clorambucilo.

Tabla 12. Eficiencia de encapsulamiento (n=3)

Método	Ciclodextrina	Eficiencia (%)	Desviación estándar (D.E.)	Relación CD:CHL
co-precipitación	DM- β -CD	99.17	0.99	1 : 1
	TM- β -CD	87.99	3.72	1.13 : 1
	HP- β -CD	16.22	2.16	6 : 1
Liofilización	DM- β -CD	74.01	2.38	1.35 : 1
	TM- β -CD	26.62	0.36	3.76 : 1
	HP- β -CD	14.53	2.09	6.88 : 1

En solución, los diagramas de solubilidad de fase han mostrado la formación de un complejo con una relación 1:1, en estado sólido, la estequiometría fue la misma para el producto obtenido por el método de co-precipitación (con excepción de la HP- β -CD), sin embargo el método no fue válido para el proceso de liofilización, debido a las siguientes causas:

- a) Este proceso no conduce a la obtención de un complejo real.
- b) En la formación de la solución previa a la liofilización influye la capacidad de solubilización de la CD, así como el tiempo de agitación y/o sonicación. Por lo que el complejo formado se encuentra con un exceso de CD.

En estado sólido la molécula huésped puede estar incluida en la cavidad de la CD (complejo real) o bien agregada fuera de la molécula de CD.

En muchos estudios, el factor crítico que debe ser cuidadosamente considerado en la interpretación de los datos es el grado de sustitución (GS) de la CD derivada. Muller y Brauns han establecido una relación entre el número de sustitución promedio y la habilidad de formación de complejos, a menor grado de sustitución, es más extenso el fenómeno de complejación. Este resultado es atribuido al factor estérico debido a los sustituyentes en la cavidad de la ciclodextrina.

En un estudio comparativo de la complejación de flurbiprofeno con β -CD y algunos derivados se mostró que el modo de inclusión era completamente diferente, debido a la distinta cantidad de grupos hidroxilo libres en la CD.

La HP- β -CD con alto grado de sustitución presenta un menor poder de solubilización. El grado de sustitución de la HP- β -CD utilizada es de 4.6, la disminución en la habilidad de formar complejos de esta CD es atribuida al efecto estérico (Menard et al, 1988).

La eficiencia de complejación puede ser considerada igual al producto de la solubilidad intrínseca del fármaco por la constante de unión del complejo (Fauci y Mura, 2001). Los resultados obtenidos están en concordancia con las constantes de unión obtenidas a partir de los diagramas de solubilidad (Tabla 10). El CHL muestra mayor afinidad por la DM- β -CD, por lo que la eficiencia de encapsulamiento es mayor, en cambio la HP- β -CD mostró muy poca afinidad por el CHL lo cual conduce a obtener una baja eficiencia de encapsulamiento independientemente del método empleado en la formación del complejo, obteniéndose el siguiente orden DM- β -CD > TM- β -CD > HP- β -CD.

6.3.2 Caracterización de los complejos de inclusión obtenidos por co-precipitación y liofilización

6.3.2.1 Caracterización por calorimetría diferencial de barrido.

Existen varias técnicas analíticas que pueden ser usadas en la caracterización de los complejos de inclusión en estado sólido, en este contexto las técnicas termo-analíticas como la calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés) es ampliamente aplicada en la confirmación del proceso de inclusión.

Mediante el DSC se mide la capacidad calorífica relativa de un sistema determinado cuando sufre una transición inducida por un cambio térmico. En el experimento, las celdas con la muestra y la referencia se calientan simultáneamente a una misma velocidad predeterminada. Cuando se produce una transición inducida por la temperatura (por ejemplo, la fusión de la muestra), la muestra absorbe parte del calor que se le está suministrando a la celda, por lo que la celda de la muestra tendría una temperatura inferior a la celda de referencia, pero el sistema de control del equipo suministra una potencia calorífica adicional para que ambas celdas se encuentren a la misma temperatura y esta diferencia es registrada por el equipo (Beldarraín, 2001). Por medio del DSC se pueden evaluar la temperatura y la energía asociada con los siguientes eventos: fusión, reacciones de oxidación y reducción, transiciones vítreas, ebullición, sublimación, descomposición, cristalización. La desaparición de los eventos térmicos de la molécula huésped dentro de la molécula de la ciclodextrina, así como la aparición de nuevos eventos térmicos, generalmente son tomados como evidencia de que se ha formado un complejo. Por lo que el objetivo al realizar este análisis es comparar el comportamiento térmico de un solo

componente, su mezcla física y el complejo de inclusión preparado por cualquiera de los métodos disponibles (Giordano et al., 2001).

En las figura 22, 23 y 24 se muestran los termogramas obtenidos para los complejos obtenidos por el método de co-precipitación y liofilización a partir de la DM- β -CD, TM- β -CD y HP- β -CD respectivamente, así como de las mezclas físicas y los componentes individuales. En la tabla 13 se resumen los eventos térmicos que presenta cada muestra.

El trazo del clorambucilo puro es el típico de una sustancia anhidra cristalina, presentando un pico pronunciado a una temperatura de 67.93°C el cual corresponde a su punto de fusión y concuerda con el reportado en la literatura (Index Merk, 1996).

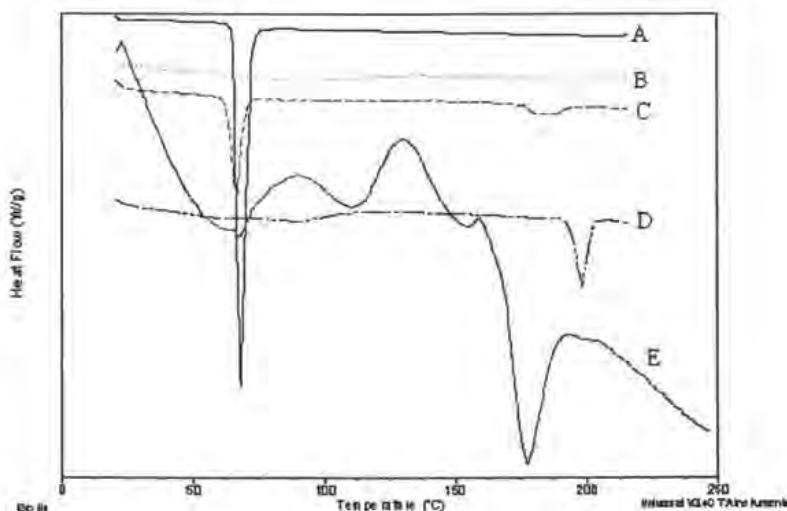


Figura. 22 Termogramas para (A) Clorambucilo, (B) DM- β -CD, (C) Mezcla física DM- β -CD:CHL, (D) Complejo DM- β -CD:CHL CP y (E) Complejo DM- β -CD:CHL Lio

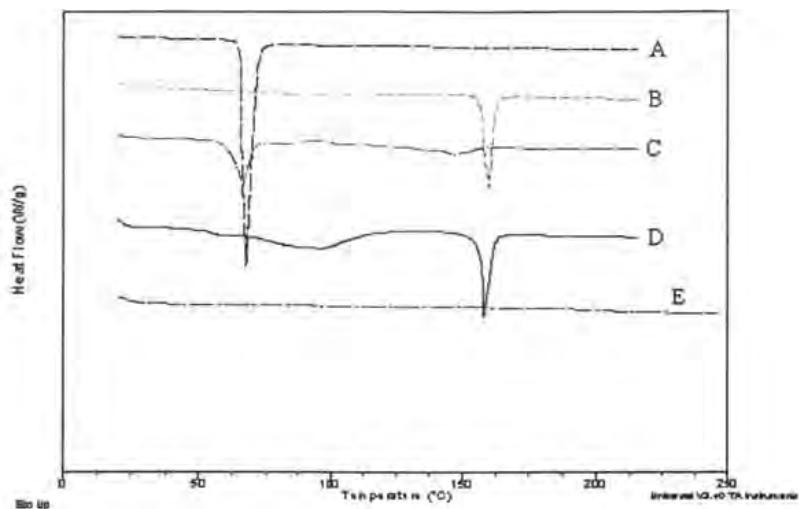


Figura. 23 Termogramas para (A) Clorambucilo, (B) TM-β-CD, (C) Mezcla física TM-β-CD:CHL, (D) Complejo TM-β-CD:CHL CP y (E) Complejo TM-β-CD:CHL Lio

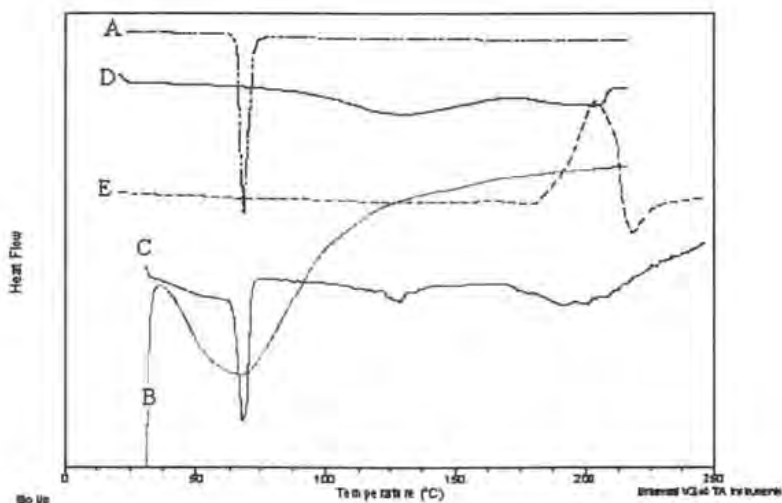


Figura. 24 Termogramas para (A) Clorambucilo, (B) HP-β-CD, (C) Mezcla física HP-β-CD:CHL, (D) Complejo 2HP-β-CD:CHL CP y (E) Complejo 2HP-β-CD:CHL Lio

Tabla 13 Eventos térmicos presentados por los complejos CHL-CD

Muestra	Eventos endotérmicos (°C)	Eventos exotérmicos (°C)
Clorambucilo	67.93	-----
DM-β-CD	90.30, 198.68	-----
Mezcla	66.78, 185.34	-----
Complejo (Co-precipitación)	90.30, 198.60	-----
Complejo (Liofilización)	67, 111.02, 177.70	-----
TM-β-CD	160.04	-----
Mezcla	66.90, 147.12	-----
Complejo (Co-precipitación)	91.88, 158.33	-----
Complejo (Liofilización)	161.03(casi imperceptible)	-----
2HP-β-CD	69.24 (muy ancho)	-----
Mezcla	67.26, 129.27, 200.95	-----
Complejo (Co-precipitación)	128.93, 204 (muy pequeño)	-----
Complejo (Liofilización)	217.43 (pequeño)	204.35 (ancho)

Los termogramas de la DM-β-CD (figura 22) y de la HP-β-CD (figura 24) presentan una endoterma a 90 y 69.14°C respectivamente, más pronunciado para el caso de la CD hidroxipropilada, pero en ambos casos esta endoterma es ancha, la cual representa pérdida de agua (Vianna et al, 1998; Fernández, 2002). Adicionalmente la DM-β-CD presenta una endoterma muy pequeña a 198.68°C. La TM-β-CD (figura 23) presenta una endoterma a 160.04°C el cual corresponde a su punto de fusión y concuerda con el reportado por Giordano (Giordano et al, 2001).

Los termogramas de las mezclas físicas entre el clorambucilo y la DM-β-CD, TM-β-CD y 2HP-β-CD (figura 22, 23 y 24 respectivamente) muestran el pico característico del fármaco (fusión) pero desplazados a menores temperaturas y con menor intensidad (66.78, 66.90 y 67.26°C respectivamente), también se observan los picos correspondientes a las CD pero igualmente desplazados a temperaturas menores, 185.4°C para la mezcla con DM-β-CD y 147.12°C para la mezcla con TM-β-CD. La mezcla con 2HP-β-CD además de presentar el punto de fusión del fármaco, presenta otras dos endotermas a 129.27, 200.95°C. Estos cambios pueden sugerir una interacción débil entre los componentes de la mezcla física por activación mecánica durante el mezclado o por el calentamiento durante el desarrollo del DSC (Ventura et al., 1994; Ribeiro, 2003). Los termogramas de los complejos de inclusión formados entre el clorambucilo y las CDs por el método de co-precipitación etanólica muestran las siguientes endotermas: 90.30 y 198.60°C para el

complejo con DM- β -CD, 91.88 y 158.33°C para el complejo con TM- β -CD y 128.93 y 204°C para el complejo con 2HP- β -CD (figura 22, 23 y 24 respectivamente). La primera endoterma (90.30, 91.88 y 128.93°C) en todos los casos es ancha y puede ser debida a la pérdida de etanol y/o agua residual, la segunda endoterma de los complejos con la DM- β -CD y la TM- β -CD corresponden a la CD, el complejo con la 2HP- β -CD presenta una endoterma a 204°C la cual es atribuible al complejo (Vianna et al., 1998). En ninguno de los tres casos se observa el pico correspondiente al punto de fusión del fármaco y como ya hemos indicado anteriormente esto es una prueba de que se ha formado un complejo de inclusión real entre las ciclodextrinas estudiadas y el clorambucilo, algunos autores (Palmieri et al., 1997) indican que la ausencia total de este pico (fusión del fármaco) indica una complejación total.

Los termogramas de los complejos de inclusión preparados por el método de liofilización, son completamente diferentes a los complejos preparados por el método de coprecipitación. Para el caso de la DM- β -CD, el termograma presenta las siguientes endotermas: 67°C el cual es atribuible al punto de fusión del clorambucilo, 111.02°C atribuible a la pérdida de agua y 177.70°C probablemente debido a la interacción entre el clorambucilo y la DM- β -CD, de estos resultados podemos inferir que la complejación no fue total, ya que la presencia del punto de fusión del fármaco es considerado por diversos autores (Palmieri et al., 1997; Bettinetti et al., 2002) como evidencia de que la formación del complejo solo es de manera parcial.

Para el caso de la TM- β -CD, el complejo preparado por liofilización presenta una endoterma a 161.03°C casi imperceptible, la cual corresponde a la fusión de la TM- β -CD, la disminución de la intensidad puede ser atribuible al cambio de estado físico, es decir de un estado cristalino a un estado amorfo.

En el caso de la HP- β -CD, el complejo preparado por liofilización presenta una exoterma a 204.35°C (ancha) lo cual conduce a pensar en la recristalización de una estructura amorfa, seguida de una endoterma a 217.43°C (pequeña) atribuible a la posible descomposición del producto formado, resultados similares fueron encontrados en la formación de complejo por liofilización entre ketoprofeno y DM- β -CD (Funk et al., 1994; Ventura et al., 1994).

La ausencia del punto de fusión del clorambucilo en los complejos preparados por liofilización tanto con la TM- β -CD como con la HP- β -CD puede ser debida a:

- a) La formación de una dispersión sólida amorfa (Funk et al., 1994; Spamer et al., 2002)
- b) El enmascaramiento del clorambucilo por la alta proporción de TM- β -CD y HP- β -CD (tabla 13), resultados parecidos se encontraron en la formación de complejos entre la β -CD y metoxibutropato ya que al aumentar la relación CD:fármaco, 1:2 y 1:4 desaparece el punto de fusión del fármaco independientemente del método de preparación del complejo (Palmieri et al., 1997).

6.3.2.2 Caracterización por espectroscopia infrarroja.

La espectroscopia infrarroja es una de las técnicas más apropiadas para entender las interacciones a nivel molecular, a través de la detección de cambios en las bandas que puedan estar relacionadas en el proceso de formación de complejos (García et al., 2003). Los estudios de infrarrojo reportados para los complejos formados con CDs son principalmente cuando la molécula huésped posee un grupo carbonilo, este grupo presenta una banda de estrechamiento de elevada intensidad, que es muy sensible a los puentes de hidrógeno (Bekers et al., 1991). En nuestro caso, el clorambucilo es un ácido carboxílico por lo que ésta técnica se puede utilizar para la caracterización de los complejos formados entre éste y las CDs.

En la tabla 14 y en las figuras 25, 26 y 27 se muestra los espectros de absorción infrarroja para el CHL y sus complejos de inclusión con DM- β -CD, TM- β -CD y HP- β -CD respectivamente.

Tabla 14. Bandas de absorción infrarroja características (cm^{-1}) para clorambucilo y los complejos formados con ciclodextrinas.

	Banda de IR C = O (cm^{-1})
Clorambucilo	1659.67
DM- β -CD	-----
DM- β -CD-CHL (Mezcla)	1633.15
DM- β -CD-CHL (CP)	1646.41
DM- β -CD-CHL (LIO)	1653.04
TM- β -CD	-----
TM- β -CD-CHL (Mezcla)	1633.15
TM- β -CD-CHL (CP)	1666.30
TM- β -CD-CHL (LIO)	1613.26
HP- β -CD	-----
HP- β -CD-CHL (Mezcla)	1653.04
HP- β -CD-CHL (CP)	1659.67
HP- β -CD-CHL (LIO)	1626.52

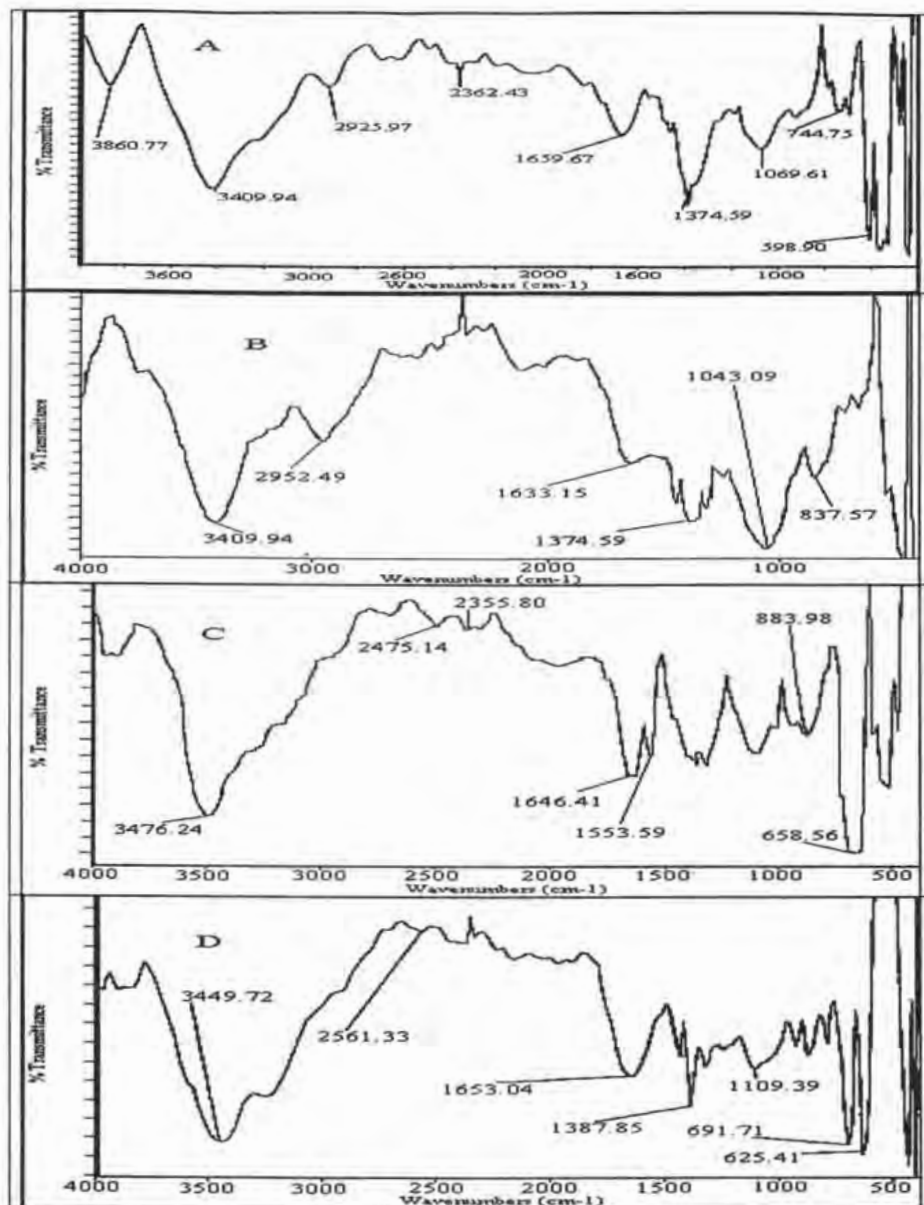


Figura 25. Espectros de absorción infrarroja de los sistemas DM- β -CD : CHL (a) CHL, (b) Mezcla DM- β -CD : CHL (c), DM- β -CD : CHL CP y (d) DM- β -CD : CHL Lio

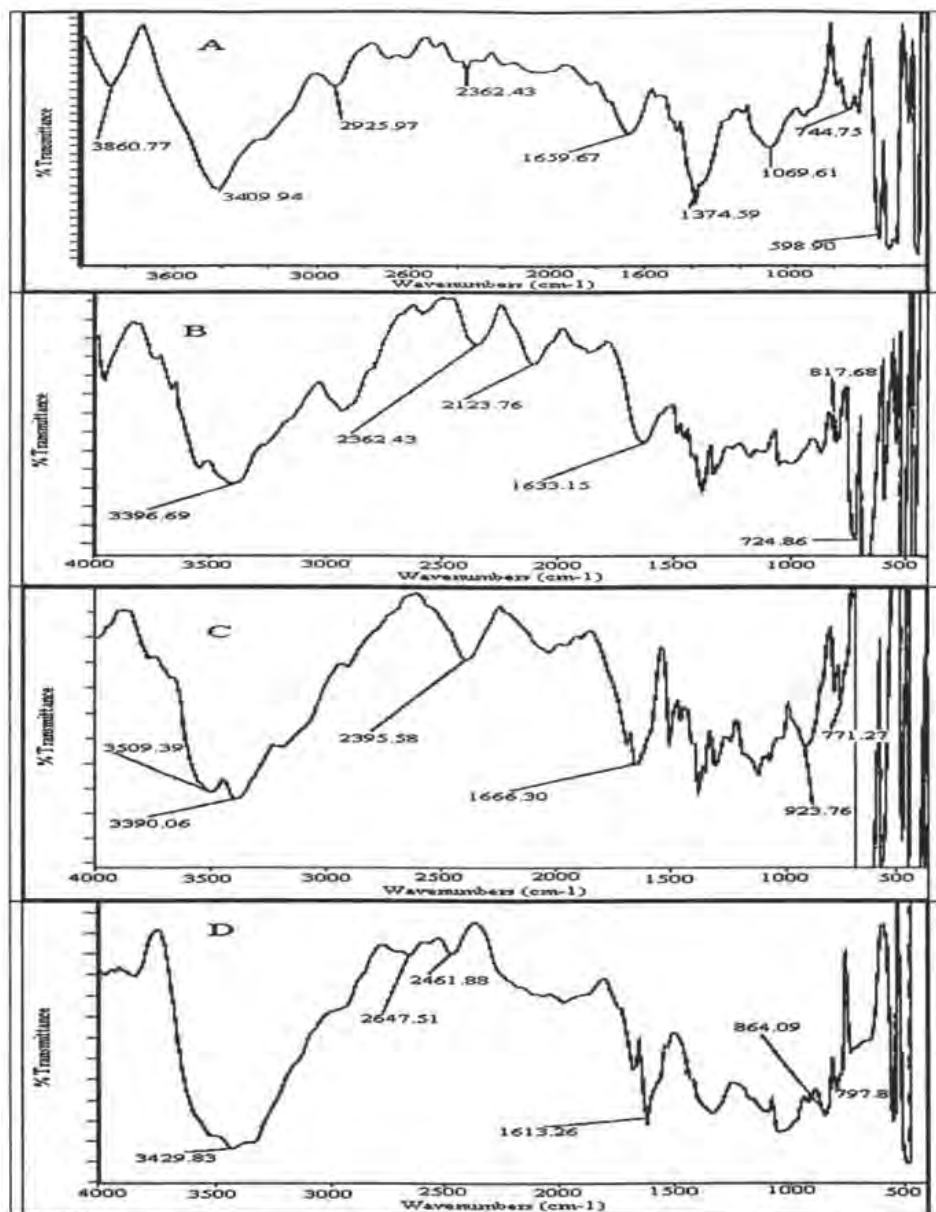


Figura 26. Espectros de absorción infrarroja de los sistemas TM- β -CD: CHL (a) CHL, (b) Mezcla TM- β -CD : CHL, (c) TM- β -CD : CHL CP y (d) TM- β -CD : CHL Lio

En la figura 25, se aprecian los espectros de absorción infrarroja de los sistemas conformados por CHL y DM- β -CD. El CHL tiene una banda de absorción a 1659.67 cm^{-1} correspondiente al grupo carbonilo, el espectro de absorción infrarroja de la mezcla física entre el CHL y la DM- β -CD, muestra la superposición de los espectros correspondientes de CHL y DM- β -CD en esta región. Tanto el espectro del complejo obtenido por co-precipitación, como el espectro del complejo obtenido por liofilización muestran un ensanchamiento de la banda correspondiente al grupo carbonilo, así mismo, el complejo obtenido por co-precipitación y liofilización muestran un ligero desplazamiento de esta banda de 1659.67 a 1646.41 y 1653.04 cm^{-1} respectivamente.

La banda de $2700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ del CHL, muestra un aumento en la intensidad en la mezcla física y desaparece en el complejo obtenido por co-precipitación. (Figura 25)

Todas estas deformaciones indican claramente la presencia de las interacciones CD- CHL.

En la figura 26, se aprecian los espectros de absorción infrarroja de los sistemas conformados por CHL y TM- β -CD, se puede observar que la mezcla física entre la TM- β -CD y el CHL es la superposición de los componentes individuales, sin embargo el espectro del complejo obtenido por precipitación, muestra una marcada diferencia; se puede observar que hay un marcado ensanchamiento y aumento de la intensidad correspondiente a la banda de estrechamiento del grupo carbonilo y un desplazamiento de la misma banda de 1659.67 a 1666.30 cm^{-1} . Además también se observa que hay aumento del ancho e intensidad de la banda de 3400 cm^{-1} .

El espectro de absorción obtenido por co-precipitación presenta en la región de $4000\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ una banda correspondiente a los modos de estiramiento O-H, más ancha que la banda correspondiente a la CD, lo cual indica la formación de nuevos enlaces de hidrógeno en el complejo.

El espectro de absorción del complejo obtenido por liofilización, no muestra diferencia con respecto a la mezcla física.

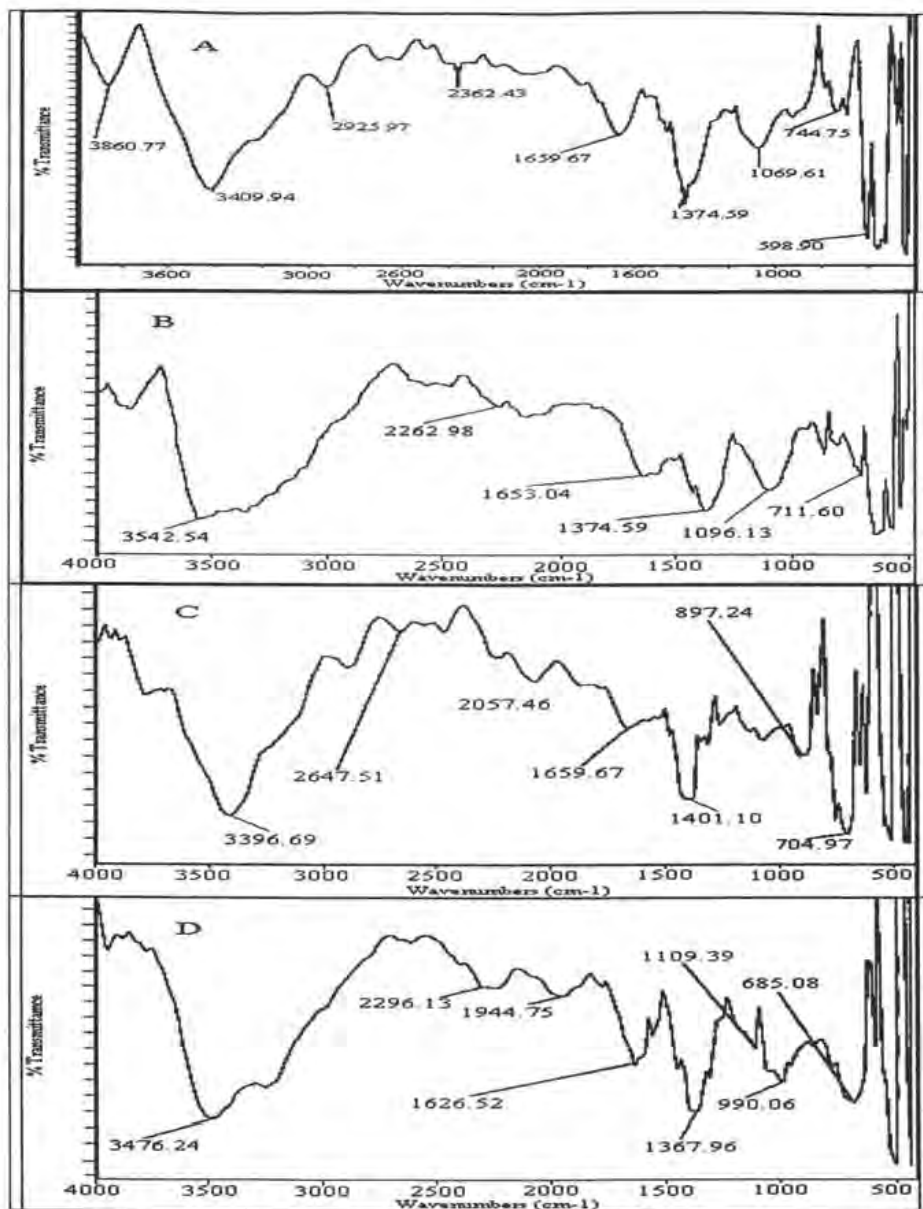
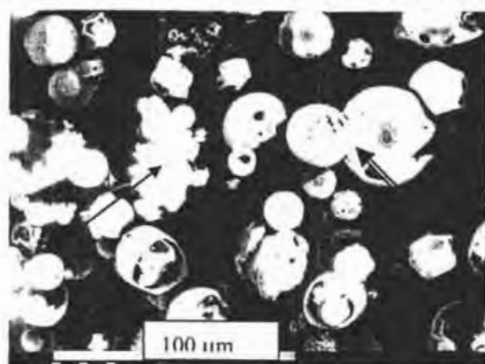


Figura 27. Espectros de absorción infrarroja de los sistemas HP- β -CD : CHL: (a) CHL, (b) Mezcla HP- β -CD : CHL, (c) HP- β -CD : CHL CP y (d) HP- β -CD : CHL Lio

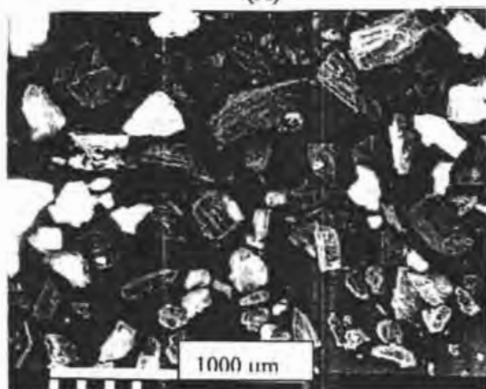
La figura 27 muestra los espectros de absorción infrarroja de los sistemas formados por el CHL y la HP- β -CD. En estos espectros no se observan diferencias entre la mezcla física y los complejos obtenidos por liofilización y co-precipitación.

En la mayoría de los casos la razón CD/fármaco es muy alta, como es el caso del complejo obtenido por liofilización entre la TM- β -CD y el CHL y los complejos obtenidos con la HP- β -CD (tanto el obtenido por liofilización, como el obtenido por co-precipitación) y por lo tanto las bandas características de IR de la CD, no cambian mucho debido a la interacción con la molécula huésped ya que solo una fracción de ésta es perturbada, además puede ocurrir que las bandas de la molécula huésped sea enmascarada por la gran cantidad de CD (Bekers, et al 1991). Se puede observar en particular con los complejos obtenidos con DM- β -CD y el complejo obtenido por co-precipitación con TM- β -CD, el desplazamiento de la banda de absorción del grupo carbonilo del CHL. El desplazamiento de la banda de absorción correspondiente al carbonilo hacia mayores números de onda ha sido atribuido al rompimiento de los puentes de hidrógeno en el cristal y su reemplazo por una asociación menos intensa y asumiendo que el fármaco se encuentra como monómero (Funk et al., 1994). Este mismo desplazamiento pero a números de onda menores ha sido atribuido a la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo carbonilo de el fármaco y los OH de la CD. (Fernández, 2002).

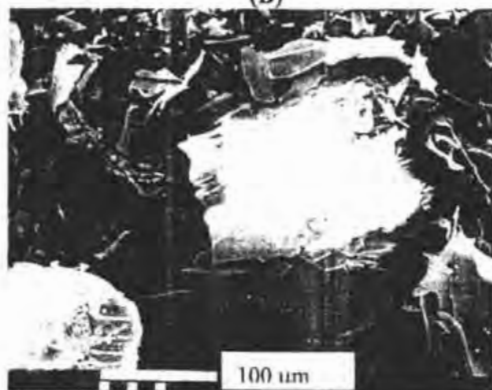
6.3.2.3 Caracterización por microscopía electrónica de barrido



(A)

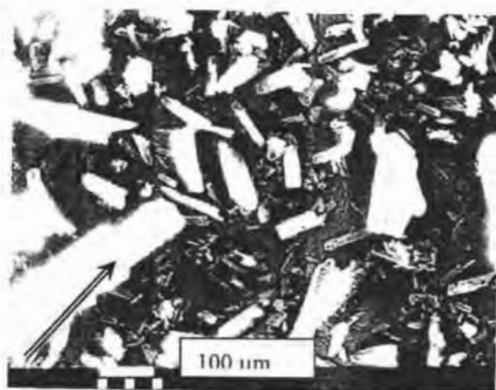


(B)

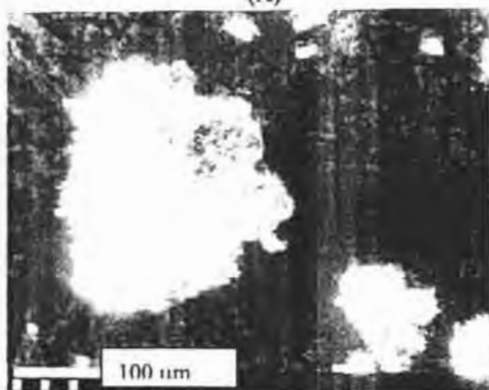


(C)

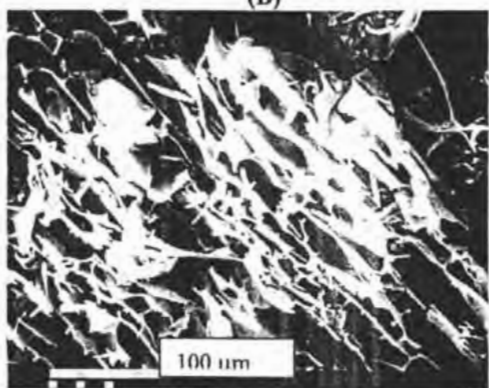
Figura 28. Micrografías electrónicas de: (A) Mezcla física CHL: HP- β -CD, (B) Complejo HP- β -CD:CHL CP (C) Complejo HP- β -CD:CHL Lio. Imágenes tomadas con la asistencia del técnico Rodolfo Robles de la FES-C.



(A)

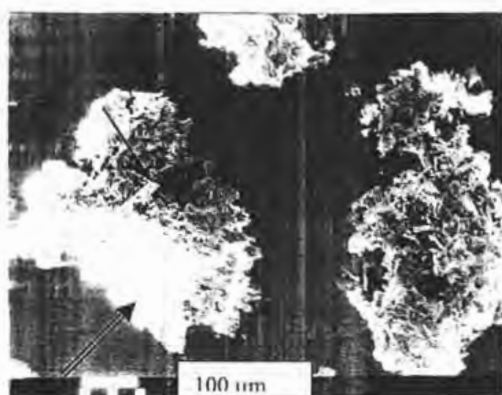


(B)



(C)

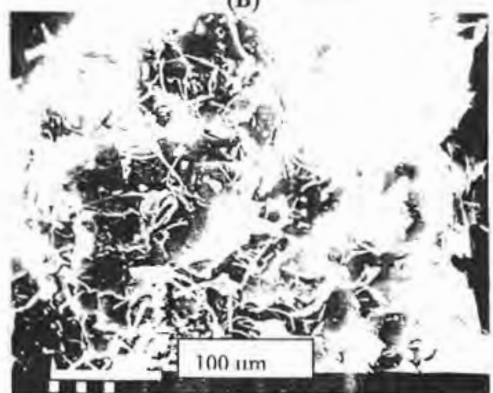
Figura 29. Micrografías electrónicas de: (A) Mezcla física CHL: DM- β -CD, (B) Complejo DM- β -CD:CHL CP (C) Complejo DM- β -CD:CHL Lio. Imágenes tomadas con la asistencia del técnico Rodolfo Robles de la FES-C.



(A)



(B)



(C)

Figura 30. Micrografías electrónicas de: (A) Mezcla física CHL: TM-β-CD, (B) Complejo TM-β-CD:CHL CP (C) Complejo TM-β-CD:CHL Lio. Imágenes tomadas con la asistencia del técnico Rodolfo Robles de la FES-C.

En las figuras 28, 29 y 30 se muestran las micrografías electrónicas de barrido de las mezclas físicas, así como de los complejos de inclusión obtenidos por co-precipitación y liofilización entre el CHL y la HP- β -CD, DM- β -CD y TM- β -CD respectivamente.

El polvo de HP- β -CD está compuesto por partículas esféricas, en la mezcla física es evidente la presencia de dos componentes, partículas esféricas de HP- β -CD y partículas de fármaco libre.

En la mezcla física de DM- β -CD:CHL, se observan partículas grandes correspondientes a la ciclodextrina, rodeadas de partículas pequeñas correspondientes al CHL.

En la mezcla física de TM- β -CD: CHL se observa aglomerados, en los que se logra distinguir dos componentes.

En las figuras se señala con doble flecha a las CDs y con flecha sencilla al CHL.

Las micrografías de las mezclas físicas muestran la presencia de cristales de fármaco mezclados y con las partículas de CD, revelando que no hay interacción aparente entre ambas especies en el estado sólido, por el contrario, en el caso de los complejos, se observa un cambio drástico en la morfología original del fármaco y de la CD, esta morfología se ve influenciada por el método de preparación.

En los productos obtenidos por co-precipitación y liofilización para los tres sistemas, la morfología original de las materias primas (CDs y CHL) desaparece y no es posible diferenciar dos componentes. En particular en los productos obtenidos por co-precipitación entre el CHL y la HP- β -CD, así como con la TM- β -CD se observa cristalización, en cambio con la DM- β -CD se observa un aglomerado "amorfo" en el que no se logran distinguir dos componentes y es distinto a las materias primas

Todos los productos obtenidos por liofilización se observan como estructuras amorfas con aspecto de láminas, en los que se distingue una sola fase, revelando una aparente interacción en el estado sólido.

Tanto en los productos obtenidos por co-precipitación y liofilización se observa la presencia de un solo componente. El cambio drástico en la forma y aspecto de las partículas obtenidas por co-precipitación y liofilización, indican la presencia de una nueva fase sólida, algunos autores asumen que la modificación de la cristalización puede ser asumida como una prueba de la formación de un nuevo complejo de inclusión (Chao et al., 2003, Fernández et al., 2002). Sin embargo, la morfología del complejo no es el único indicador

de la formación del complejo (Tenjarla, 1998) y puede ser simplemente una consecuencia de un cambio en el hábito cristalino en estos sistemas (Ribeiro et al, 2003).

Por otro lado Ángeles et al, (2002) realizaron estudios de modelaje molecular, para explicar la interacción de la molécula β -ciclodextrina con el clorambucilo y encontrar la conformación más probable del complejo y determinar la orientación de la molécula huésped dentro de la cavidad de la ciclodextrina.

En la figura 31 se observa la conformación más estable del complejo de inclusión en el que se puede apreciar que la porción aromática del CHL se encuentra en el centro de la molécula de la ciclodextrina.

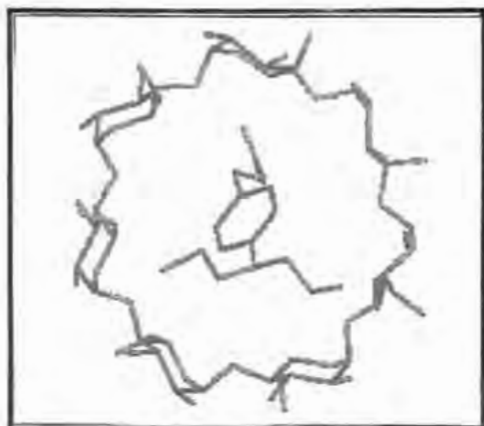


Figura 31. Complejo CHL: β -CD

6.4 EFECTO DE LAS CICLODEXTRINAS SOBRE LA BARRERA DE PERMEABILIDAD DE LA MUCOSA BUCAL.

6.4.1 Efecto de las ciclodextrinas sobre la barrera de permeabilidad de la mucosa bucal por medio de calorimetría diferencial de barrido.

La Calorimetría diferencial de barrido ha sido usada por diversos autores para elucidar el mecanismo de acción de los promotores de absorción.

En este tipo de experimentos es posible observar las transiciones endotérmicas para diversas membranas (bucal, intestinal, nasal, estrato corneo, etc.). La observación de cambios en las temperaturas de transición son una posible indicación de la interacción entre las sustancias aplicadas (e. g., promotores) y los componentes de las membranas. Las membranas lipídicas sufren transiciones de fase termotrópicas, entre una fase de gel ordenado y una fase líquido cristalina. Se sabe que algunas veces la temperatura de fusión (T_M) de la bicapa lipídica se abate por la adición de moléculas extrañas, además se han observado efectos adicionales como el ensanchamiento de la transición, así como cambios en el calor de fusión o entalpía (ΔH).

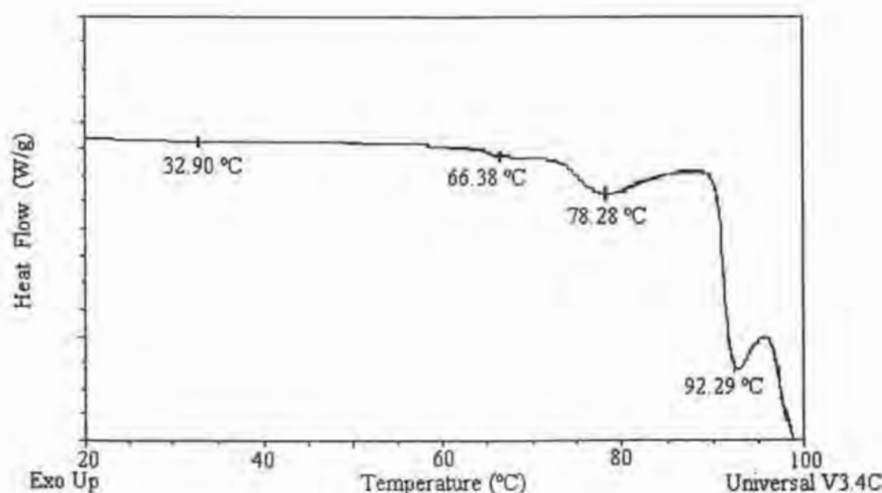


Figura 32. Termograma de la mucosa bucal hidratada.

La figura 32 muestra el termograma obtenido de la mucosa bucal hidratada (30-40%), encontrándose las siguientes transiciones: 32.90, 66.38, 78.27 y 92.29 °C. La transición de fase lipídica a aproximadamente 30°C no se observa en todas las muestras examinadas, otros trabajos indican que esta transición no es fácil de detectar, por esta razón en el presente trabajo, no fue posible determinar el efecto del tratamiento con ciclodextrinas sobre esta transición. La transición a 92°C se considera que representa la desnaturalización de proteínas. En estudios con otras membranas (estrato corneo) se ha reportado que la entalpía (calor de fusión) de esta última transición es muy sensible a los cambios en el contenido de agua del estrato corneo. Cuando éste está por debajo del 20% esta transición se hace muy pequeña o se ausenta, por el contrario cuando el contenido de agua es excesivo se ensancha y no permite ver las demás transiciones, por lo cual es muy importante tener un contenido de agua del 30-40% (Victoria et al., 1997).

La transición que fue reproducible en todos los casos (blancos y tratamientos) fue la que se encuentra alrededor de los 78°C (correspondiente a lípidos), por lo que esta temperatura fue considerada como el principal parámetro para comparar el perfil térmico entre el control y las muestras tratadas (Figura 33).

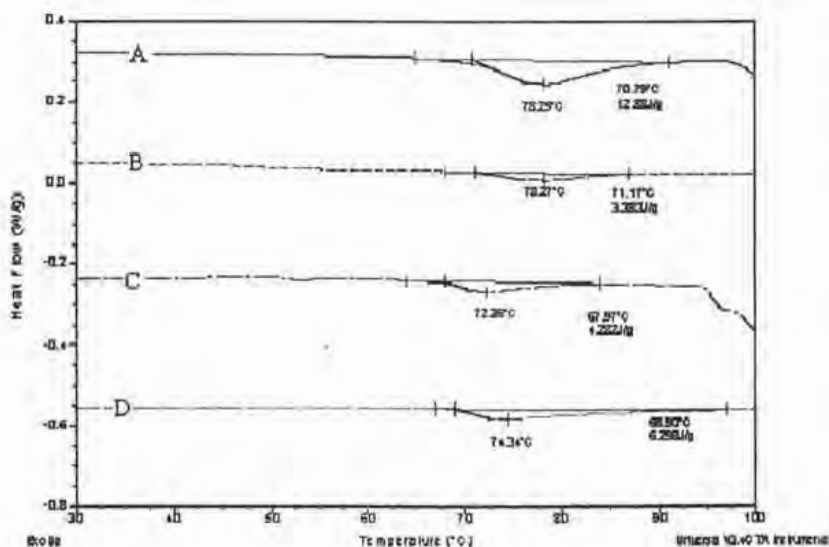


Figura 33. Termogramas de la mucosa bucal porcina con diferentes tratamientos. (A) Sin tratamiento, (B) Tratada con DM-β-CD, (C) Tratada con TM-β-CD y (D) Tratada con HP-β-CD

Como se mencionó en la metodología, se evaluó el efecto de la 2HP- β -CD, DM- β -CD y TM- β -CD al 10% sobre la mucosa bucal de cerdo.

De las calorimetrías realizadas se obtienen los siguientes parámetros termotrópicos: temperatura de fusión (T_M) y la entalpía del proceso (ΔH), la cual es proporcional al área bajo la curva de la transición. En la tabla 15 se resumen estos parámetros para la transición a $\sim 78^\circ\text{C}$.

Tabla 15. Parámetros termotrópicos de la mucosa bucal porcina para la transición a $\sim 78^\circ\text{C}$ (n = 5)

Tratamiento	T_M ($^\circ\text{C}$)	ΔH (J/g)
Control	76.91 ± 1.269	11.846 ± 0.717
DM- β -CD	79.31 ± 3.323	3.706 ± 0.652
TM- β -CD	74.91 ± 3.614	5.493 ± 1.455
2HP- β -CD	73.31 ± 2.667	6.511 ± 1.105

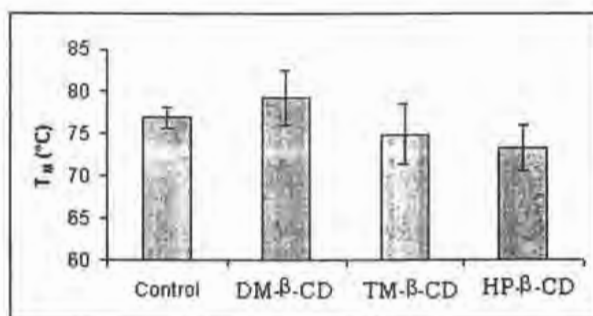


Figura 34. Efecto del tratamiento sobre la T_M de los lípidos de la mucosa bucal porcina (n = 5)

Como se puede observar en la tabla 15 y en la figura 34, hay un desplazamiento de la T_M de los lípidos hacia temperaturas inferiores cuando la mucosa bucal es tratada con TM- β -CD y 2HP- β -CD, estos resultados sugieren que la incorporación de estos compuestos en la mucosa bucal resulta en una disminución del orden de los lípidos.

La transición lipídica involucra la disminución del ordenamiento de los lípidos con respecto a su estado natural, una disminución en la T_M y un ensanchamiento de la curva refleja la transición térmica hacia un estado menos ordenado, más heterogéneo (Golden et al., 1987). Para el caso de la DM- β -CD se observa el efecto contrario, es decir hay un desplazamiento de la T_M , hacia temperaturas mayores, un resultado similar se encontró en el estudio de la interacción de modelos de biomembranas (liposomas de 1-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) con DM- β -CD (Puglis et al., 1996). De acuerdo a la literatura existen dos posibles mecanismos por los que ocurre esto: a) la actividad del agua disminuye en la presencia de solutos, causando que la T_M se desplace hacia valores más altos y b) que la parte de los carbohidratos pueda estabilizar la bicapa por medio de puentes de hidrógeno con los lípidos. La DM- β -CD, tiene un cierto número de grupos metilo, los cuales pueden interactuar con la bicapa lipídica a través de interacciones hidrofóbicas a nivel de las cabezas de DPPC, permitiendo la formación de puentes de hidrógeno con las moléculas de fosfolípidos.

Vitoria et al. (1997) encontraron que la HP- β -CD causa una disminución de la T_M (muy pequeña) sugiriendo fluidización de la bicapa lipídica del estrato corneo o bien disrupción (Victoria et al., 1997).

Se realizó un análisis de varianza para determinar si existían diferencias en los cambios de T_M inducidos por el tratamiento con las ciclodextrinas (el análisis estadístico se encuentra en el anexo IV). Del análisis de varianza de los cambios de T_M podemos concluir que no existe diferencia significativa entre los tratamientos ($F_{Calculada} = 4.09$ y $F_{Tablas} = 5.29$, con una probabilidad (p) del 99%), así mismo se realizó el análisis de varianza para el cambio absoluto de T_M (diferencia entre cada tratamiento y el control) y no se encontró diferencia significativa ($F_{Calculada} = 4.63$ y $F_{Tablas} = 6.93$, $p = 99\%$).

Además de analizar el desplazamiento de T_M es importante también analizar el área bajo la curva de la transición lipídica, es decir observar si hay cambios en el calor de fusión o entalpía (ΔH) de los lípidos para definir si hay una posible extracción de éstos por parte de las ciclodextrinas estudiadas.

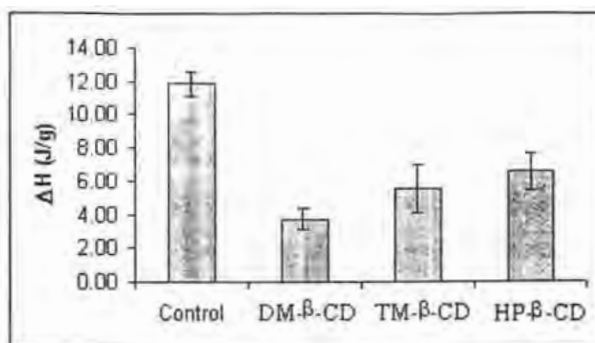


Figura 35. Efecto del tratamiento sobre el calor de fusión de la temperatura de transición de los lípidos de la mucosa bucal porcina. (n = 5)

En la tabla 15 y en la figura 35 se observa que el tratamiento con las ciclodextrinas origina una disminución de la entalpía lo cual sugiere que las CDs causan extracción de componentes lipídicos de la mucosa bucal y se observa claramente que ésta disminución está en función del tipo de ciclodextrina estudiada, encontrándose la siguiente tendencia $DM-\beta-CD > TM-\beta-CD > HP-\beta-CD$, del análisis de varianza podemos concluir que existe una diferencia significativa entre los tratamientos ($F_{Calculada} = 57.31$ y $F_{Tablas} = 5.29$ $p = 99\%$). De la prueba de Duncan se obtuvo que no existe diferencia significativa ($p = 99\%$) entre los siguientes tratamientos: $TM-\beta-CD$ y la $HP-\beta-CD$, $DM-\beta-CD$ y la $TM-\beta-CD$. Se encontraron resultados similares en los estudios de la interacción de modelos de biomembranas de DPPC con ciclodextrinas (Puglisis et al., 1996). Estos resultados se pueden explicar por la habilidad que tienen estas sustancias (ciclodextrinas) de interactuar con los fosfolípidos de membrana causando desorganización y/o extracción de fosfolípidos, y la mayor o menor extracción se debe en parte al tamaño de la cavidad de la ciclodextrina y a la formación de complejos estables entre éstas y los lípidos de membrana.

6.4.2 Efecto de las ciclodextrinas sobre la barrera de permeabilidad de la mucosa bucal por medio de espectroscopia infrarroja

Otra técnica biofísica utilizada por muchos investigadores para estudiar la interacción y/o posible mecanismo de acción de sustancias promotoras de absorción es la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés), la cual puede ser útil en la elucidación de la estructura molecular del estrato corneo o mucosas.

Los espectros de FTIR de $2600\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ de la mucosa bucal a temperatura ambiente se muestran en la figura 36. Son de particular interés las bandas cercanas a 2850 y 2920 cm^{-1} , correspondientes al estrechamiento simétrico y asimétrico respectivamente de las uniones C-H, pertenecientes a los lípidos de la mucosa bucal.

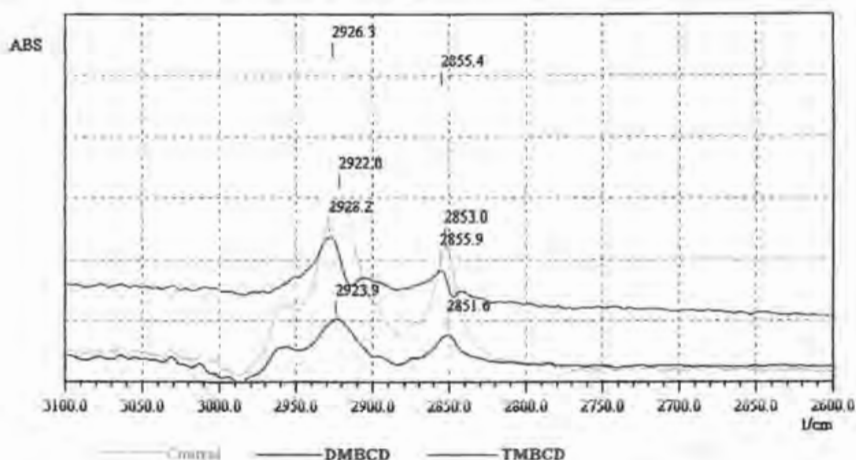


Figura 36. Espectros de absorción Infrarroja de la mucosa bucal de cerdo con y sin tratamiento.

Los resultados presentados en la figura 36 permiten comparar el espectro de absorción infrarroja en la región de estrechamiento, para una muestra no tratada (Control) con los espectros de las muestras tratadas con las diferentes ciclodextrinas estudiadas.

Se ha reportado que la fluidización de los lípidos del estrato corneo está asociada al cambio en el número de onda o en el ensanchamiento de las bandas, tanto asimétricas como simétricas correspondientes a las cadenas alquílicas de los lípidos del estrato corneo y que una disminución en las áreas bajo la curva de éstas bandas puede ser indicativo de la

extracción de lípidos, lo que implica incremento en el desorden de la bicapa y contribuye al aumento de permeabilidad de la piel (Naik et al., 1997).

Tabla 16. Números de onda para las bandas simétricas (2850cm^{-1}) y asimétricas (2920cm^{-1}) de los lípidos de la mucosa bucal ($\mu \pm \text{S.D}$, $n = 6$)

Tratamiento	No. onda cm^{-1} (2850)	No. onda cm^{-1} (2920)
Control	2853.80 ± 1.318	2923.73 ± 2.096
DM- β -CD	2851.96 ± 0.441	2924.13 ± 0.383
TM- β -CD	2855.90 ± 0.316	2928.28 ± 0.376
HP- β -CD	2855.08 ± 0.376	2925.56 ± 1.178

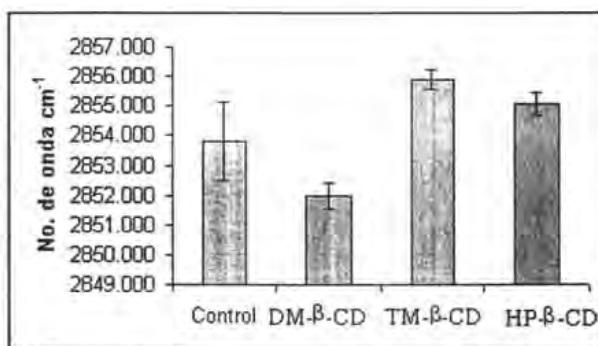


Figura 37. Números de onda para las bandas de estiramiento simétricas de los lípidos de la mucosa bucal.

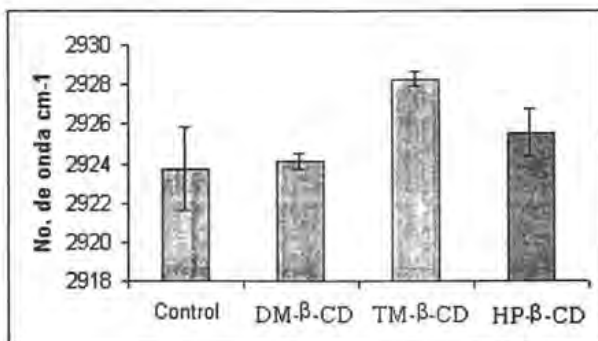


Figura 38. Números de onda para las bandas de estiramiento asimétricas de los lípidos de la mucosa bucal.

De la tabla 16 y de las gráficas 37 y 38 se observa que hay un desplazamiento de las bandas simétricas y asimétricas hacia números de onda mayores (con excepción de la DM-β-CD en la banda simétrica donde el desplazamiento es hacia frecuencias menores), lo cual puede sugerir un incremento en la fluidez de los lípidos de la mucosa bucal. Al realizar el análisis de varianza se encontró diferencia significativa entre los tratamientos sobre el desplazamiento de las bandas ($F_{Calculada} = 32.47$ y $F_{Tablas} = 4.94$, $p = 99\%$ para las bandas simétricas y $F_{Calculada} = 16.76$ y $F_{Tablas} = 4.94$, $p = 99\%$ para las bandas asimétricas). De la prueba de Duncan se obtuvo que existe diferencia significativa entre todos los tratamientos (para el desplazamiento de las bandas simétricas) $p = 99\%$, excepto entre los tratamientos HP-β-CD y TM-β-CD. Y para el caso de las bandas asimétricas se encontró diferencia significativa entre todos los tratamientos excepto entre los tratamientos HP-β-CD y el control. Se determinó el área bajo la curva de las bandas simétricas y asimétricas, para determinar la posible extracción de lípidos de la mucosa bucal por parte de las ciclodextrinas. Estos resultados se muestran en la tabla 17 y en las gráficas 39 y 40.

Tabla 17. Áreas bajo la curva de la región simétrica y asimétrica de los lípidos de la mucosa bucal ($\mu \pm S.D$, $n = 6$)

Tratamiento	Área de la banda simétrica (2850cm ⁻¹)	Área de la banda asimétrica (2920cm ⁻¹)
Control	2.9507 ± 0.4597	4.6682 ± 0.6952
DM-β-CD	0.3088 ± 0.0386	0.3935 ± 0.0461
TM-β-CD	0.4915 ± 0.0979	1.0197 ± 0.2321
HP-β-CD	2.3772 ± 0.5133	3.6463 ± 0.3910

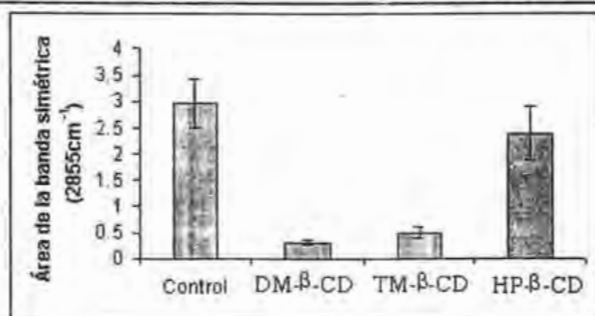


Figura 39. Área bajo la curva de la banda de estiramiento simétrico de los lípidos de la mucosa bucal.

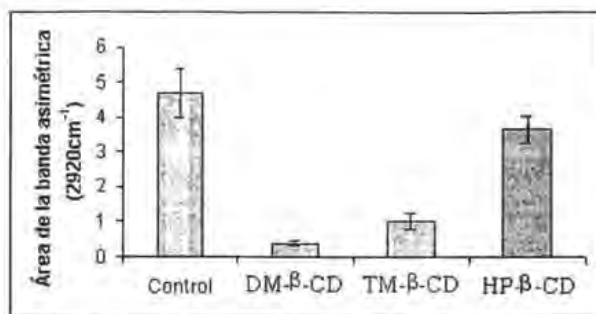


Figura 40. Área bajo la curva de la banda de estiramiento asimétrico de los lípidos de la mucosa bucal.

Como se observa en la tabla 17 y en las figuras 39 y 40, las ciclodextrinas provocan la disminución del área bajo la curva tanto de la región de estiramiento simétrico (2850cm^{-1}) como en la región de estiramiento asimétrico (2920cm^{-1}), por lo cual podemos inferir que las ciclodextrinas estudiadas extraen componentes lipídicos de la mucosa bucal, el efecto está en función del tipo de ciclodextrina teniendo la siguiente tendencia: $\text{DM-}\beta\text{-CD} > \text{TM-}\beta\text{-CD} > 2\text{HP-}\beta\text{-CD}$. Del análisis de varianza se encontró que existe diferencia significativa entre los tratamientos ($F_{\text{Calculada}} = 87.19$ y $F_{\text{Tablas}} = 4.94$, $p = 99\%$ para las bandas simétricas y $F_{\text{Calculada}} = 145.92$ y $F_{\text{Tablas}} = 4.94$, $p = 99\%$ para las bandas asimétricas). De la prueba de Duncan se obtuvo que existe diferencia significativa ($p = 99\%$) entre todos los tratamientos excepto entre los tratamientos $\text{TM-}\beta\text{-CD}$ y $\text{DM-}\beta\text{-CD}$, tanto para el área de la banda simétrica, como para el área de la región asimétrica.

Estos resultados presentan paralelismo con lo encontrado en otras biomembranas. Por medio de estudios de microscopía electrónica se observó que la $\text{HP-}\beta\text{-CD}$ causa cambios significativos a la estructura lamelar del estrato corneo sugiriendo la extracción de lípidos (Victoria et al. 1997).

Comparando los resultados obtenidos en la calorimetría diferencial de barrido y la espectroscopia de absorción infrarroja se observa una buena correlación entre ellos, el efecto ya sea en el calor de fusión de los lípidos y/o en la absorción (AUC) en el espectro de infrarrojo en la región lipídica muestran la misma tendencia: $\text{DM-}\beta\text{-CD} > \text{TM-}\beta\text{-CD} > \text{HP-}\beta\text{-CD}$.

Las ciclodextrinas incrementan la solubilidad del colesterol por la formación de complejos de inclusión. El incremento en la solubilidad del colesterol es dependiente del tipo de CD y el grado de sustitución de ésta. DM- β -CD y RM- β -CD (CD metilada al azar) incrementan en un mayor grado la solubilidad del colesterol que la HP- β -CD. Estudios *in vivo* muestran que la DM- β -CD y RM- β -CD provocan mayor liberación de colesterol de la membrana de la mucosa nasal que la HP- β -CD, estos resultados están en concordancia con los resultados de solubilidad, pues la HP- β -CD al 5% solubiliza una menor cantidad de colesterol que la DM- β -CD al 2% (Martín et al., 1995). La variación en el contenido de colesterol, así como la perturbación de los lípidos de membrana, puede conducir a la pérdida de funcionalidad de la membrana. La mucosa bucal de cerdo tiene un contenido de colesterol del 13.6%, 7.8% de sulfato de colesterol y 5.9% de ésteres de colesterol, por lo que la extracción de éste es muy importante para las propiedades de barrera de la mucosa (Xiang et al., 2002). Otros investigadores han sugerido que las ciclodextrinas pueden extraer lípidos de la mucosa gastrointestinal, facilitando la absorción de fármacos. Por medio de estudios *in vitro*, se ha demostrado que las CDs son capaces de extraer componentes de membrana (colesterol, fosfolípidos y proteínas) de eritrocitos humanos, formando complejos de inclusión en el compartimento acuoso, la extracción de este material por parte de las ciclodextrinas depende del tamaño de la cavidad (Ohtani et al., 1994).

6.5 PERMEACIÓN *IN VITRO* DEL CLORAMBUCILO Y SUS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS A TRAVÉS DE MUCOSA BUCAL DE CERDO.

El propósito de realizar permeaciones *in vitro* en la liberación transdérmica y/o transmucosal es entender y predecir la liberación y absorción de una molécula a través de la piel y/o mucosas al interior del organismo vivo. Se asume que la permeación del compartimiento del donador (mucosa) al reservorio (serosa) en una celda de difusión es representativa de la permeación de la superficie de la mucosa a la cama vascular *in vivo*.

La elección de la especie animal es un punto muy importante para lograr resultados más cercanos a la realidad, la mucosa bucal seleccionada debe ser estructuralmente comparable con la mucosa bucal humana. Debido a las similitudes morfológicas (tiene un epitelio no queratinizado igual que la mucosa bucal humana, similar contenido de lípidos) y a la comparable permeabilidad al agua, la mucosa bucal porcina se considera el modelo más adecuado para el estudio de permeación de fármacos (Nava et al., 2003).

Otro factor importante es la composición de la fase receptora (fuerza iónica, pH, reguladores, aditivos, etc.) ya que puede afectar el resultado de estos experimentos, de manera particular la acumulación de p.a de baja solubilidad acuosa en la fase receptora puede dar resultados engañosos, ya que la concentración puede exceder las condiciones sink, causando que el flujo disminuya. En base a esto para, mantener la solubilidad y estabilidad química del CHL se utilizó como fase receptora una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, conteniendo una concentración del 5% (p/v) de M-β-CD con un grado de sustitución de 5.1

La permeación a través de la mucosa bucal puede ser considerada como un proceso de difusión pasiva y puede ser descrita por la ecuación de la ley de Fick:

$$J_s = (dQ_r/dt)(1/A) \dots \dots \dots (4)$$

Donde J_s es el flujo a través de la mucosa bucal en el estado estable ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$), dQ_r es el cambio en la cantidad de material que pasa a través de la membrana al interior del compartimento receptor (μg), A es el área activa de difusión (cm^2) y dt es el cambio en tiempo (h). El flujo del clorambucilo a través de la mucosa bucal fue calculado a partir de la cantidad de fármaco permeada en función del tiempo (Tabla 18).

6.5.1 Efecto de la ciclodextrina sobre el flujo de clorambucilo

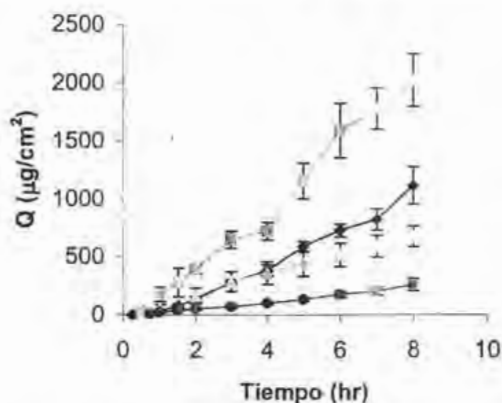


Figura 41. Cinética de permeación del CHL y sus complejos de inclusión obtenidos por co-precipitación. -♦-CHL, -■- DM-β-CD, -▲- TM-β-CD y -●- HP-β-CD

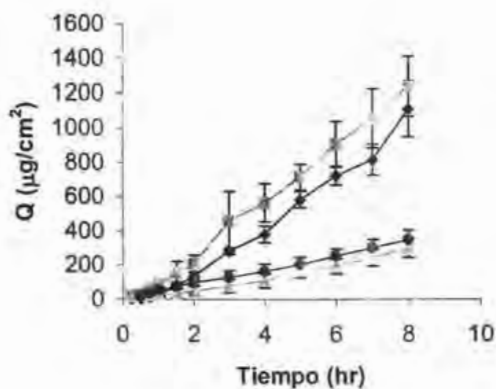


Figura 42. Cinética de permeación del CHL y sus complejos de inclusión obtenidos por liofilización. -♦-CHL, -■- DM-β-CD, -▲- TM-β-CD y -●- HP-β-CD

En la figura 41 y 42 se muestra el perfil de permeación del clorambucilo y sus complejos de inclusión obtenidos por co-precipitación y liofilización respectivamente con DM-β-CD, TM-β-CD y HP-β-CD, así mismo en la figura 43 se muestra la cantidad acumulada a las 8 horas y en la tabla 1 el flujo.

En la figura 41 se observa que la permeación del CHL se incrementa cuando se encuentra como complejo de inclusión con DM- β -CD. Sin embargo los complejos formados con TM- β -CD y HP- β -CD muestran una disminución en la permeación del clorambucilo. Al realizar el análisis estadístico de la cantidad acumulada a las 8 horas se observan diferencias significativas entre los complejos con diferentes CDs y el CHL solo. ($F_{\text{tablas}} = 5.95$, $F_{\text{Calculada}} = 102.3$, $\alpha = 0.01$) Encontrándose el siguiente orden CHL-DM- β -CD (2022.24 ± 228.91) > CHL solo (1109.1 ± 162.36) > CHL-TM- β -CD (670.72 ± 89.06) > CHL-HP- β -CD (254.05 ± 54.9). Esta misma relación se observa en el flujo del clorambucilo. (Tabla 18)

En la figura 42 se puede apreciar que la formación del complejo por liofilización con DM- β -CD favorece ligeramente la permeación de CHL a través de mucosa bucal, sin embargo al realizar la prueba de Duncan no se encontró diferencia significativa entre este y la permeación de CHL solo. Los complejos formados con TM- β -CD y HP- β -CD presentan una marcada disminución en la permeación del CHL, estadísticamente significativa ($F_{\text{tablas}} = 65.8$, $F_{\text{Calculada}} = 6.22$, $\alpha = 0.01$) con respecto a CHL y al complejo formado con DM- β -CD. El orden encontrado en este caso es el siguiente: CHL-DM- β -CD > CHL solo > CHL-HP- β -CD > CHL-TM- β -CD

Tabla 18. Efecto del método de preparación del complejo y tipo de ciclodextrina sobre el flujo de clorambucilo a través de mucosa bucal.

Ciclodextrina	Método de preparación del complejo.	Flujo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)
Ninguna		$136,71 \pm 15,10$
DM- β -CD	Co-precipitación	$270,1 \pm 160,3$
DM- β -CD	Liofilización	$160,4 \pm 20,93$
TM- β -CD	Co-precipitación	$84,75 \pm 8,25$
TM- β -CD	Liofilización	$38,27 \pm 0,92$
HP- β -CD	Co-precipitación	$29,16 \pm 6,75$
HP- β -CD	Liofilización	$41,82 \pm 5,82$

En la figura 41 y 42 se aprecia el efecto del tipo de ciclodextrina sobre la permeación del CHL a través de mucosa bucal de cerdo, independientemente del método empleado en la elaboración del complejo, la DM- β -CD favorece la permeación del CHL, mientras que la TM- β -CD y la HP- β -CD la disminuyen. Estos resultados concuerdan con los encontrados por otros autores. Sinswat y Tengamnuay (2003) encontraron que la actividad promotora en

la mucosa nasal de DM- β -CD es mayor que la de HP- β -CD. Shao et al., (1994) encontraron que la incorporación de 10% (p/v) de DM- β -CD a 0.5 mg/ml de insulina incrementó la biodisponibilidad de ésta, sin embargo la adición de HP- β -CD a la misma concentración no mejoró significativamente la biodisponibilidad de la misma. El flujo del complejo hidrocortisona-HP- β -CD a través de una membrana sintética fue encontrado 10-15 veces menor que las moléculas de hidrocortisona libre (Loftsson et al., 1991).

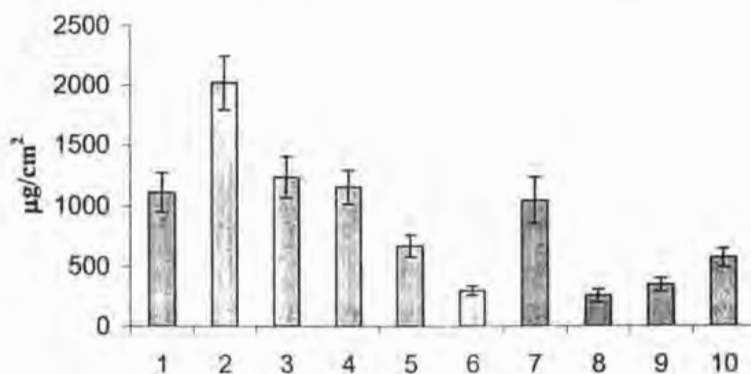


Figura 43. Cantidad acumulada de CHL a las 8h, (1) CHL, (2) Co-precipitado DM- β -CD, (3) Liofilización DM- β -CD, (4) Pre-tratamiento DM- β -CD, (5) Co-precipitado TM- β -CD, (6) Liofilización TM- β -CD, (7) Pre-tratamiento TM- β -CD, (8) Co-precipitado HP- β -CD, (9) Liofilización HP- β -CD, (10) Pre-tratamiento HP- β -CD.

6.5.2 Efecto del método de preparación del complejo sobre el flujo de clorambucilo

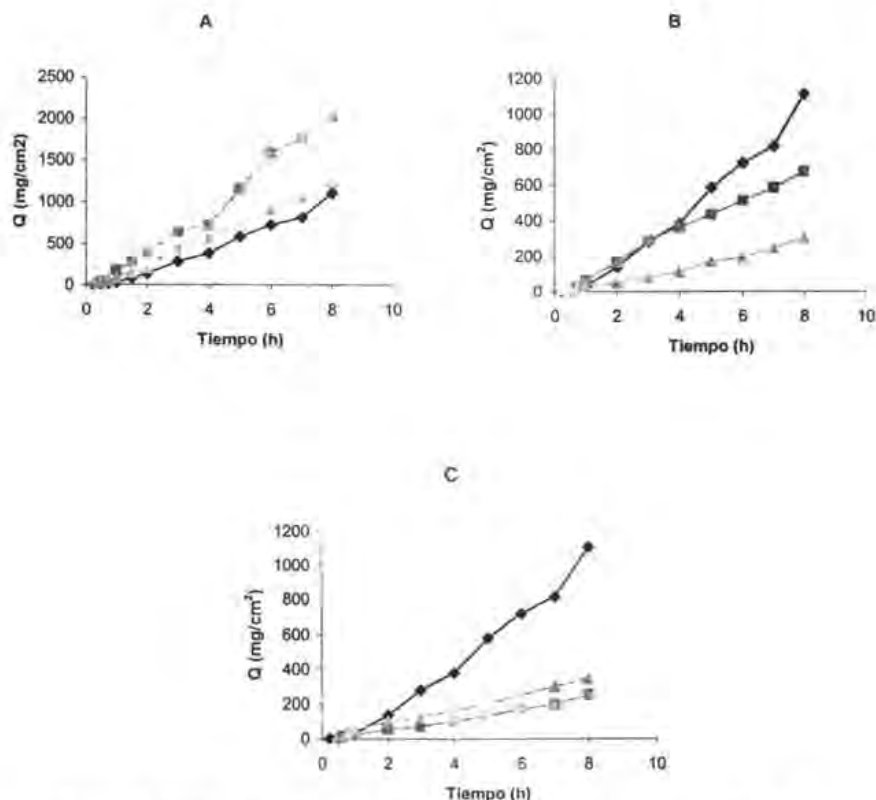


Figura 44. Cinética de permeación del CHL y sus complejos de inclusión obtenidos con (A) DM-β-CD, (B) TM-β-CD y (C) HP-β-CD. -◆- CHL, -■- Co-precipitación -▲- Liofilización.

En la figura 44 se observa el efecto del método de preparación del complejo sobre la permeación del CHL, en el caso de la DM-β-CD (figura 44, A) se observa que el complejo obtenido por co-precipitación presenta una mayor permeación que el complejo obtenido por liofilización (Prueba de intervalos múltiples de Duncan,) y este a su vez mayor que el CHL solo (estadísticamente no significativo).

En el caso de la TM-β-CD (figura 44, B) se observa una marcada disminución de la permeación de CHL independientemente del método utilizado para obtener los complejos, encontrándose el siguiente orden: CHL > Co-precipitación > Liofilización

(estadísticamente significativo, prueba de intervalos múltiples de Duncan), aunque la diferencia es mayor con el método de liofilización.

La formación de complejos entre el CHL y la HP- β -CD, (figura 44, C) al igual que con la TM- β -CD no favorece la permeación del principio activo, se observa el siguiente orden: CHL > Liofilización > Co-precipitación, estadísticamente significativo entre CHL y ambos métodos, sin embargo entre co-precipitación y liofilización no se encontró diferencia significativa, es decir la permeación del CHL en este caso es independiente del método de preparación.

En el caso de DM- β -CD y TM- β -CD se observa la misma tendencia, la permeación es mayor para el complejo formado por co-precipitación, que por liofilización, se ha reportado que existe una clara tendencia de que el complejo de inclusión genuino muestra una mejor biodisponibilidad que los productos obtenidos por liofilización (Pedersen, 1997).

El complejo genuino muestra un fenómeno de super-saturación mientras que el producto liofilizado no. La razón por la cual el complejo real, causa super-saturación es debido a que se disuelve más lentamente, por lo que solo una pequeña concentración del fármaco en la solución es necesaria para causar super-saturación de acuerdo al diagrama de solubilidad, por el contrario el grado de disolución del producto liofilizado es alto, por lo que se necesita una elevada concentración de fármaco para causar super-saturación en el medio de disolución, esto significa que el elevado grado de disolución de la CD evita que se presente el fenómeno de super-saturación del fármaco. El mecanismo mencionado anteriormente podría operar porque en el complejo genuino, la CD podría ser parte de un cristal fármaco-CD con una baja solubilidad en agua, mientras que en el producto liofilizado las moléculas de CDs a menudo se encuentran en un estado amorfo. Mientras se espera un grado de disolución bajo para la CD en el complejo real, un alto grado de disolución es esperado para el producto liofilizado, simplemente debido a las diferencias en estado sólido de la CD en los distintos tipos de complejos de inclusión (Sclafani, 1995).



Figura 45. Liberación y absorción del fármaco a partir del complejo de inclusión. (Modificada de http://club.telepolis.com/jjtorres/doc/USC/ciclodextrinas_imagenes.htm)

En la figura 45 se describen gráficamente los eventos que ocurren antes de la absorción del fármaco incluido en la cavidad de la CD, ya que los complejos no penetran la piel y/o las mucosas con facilidad, se tiene que dar el proceso de liberación del fármaco a partir del complejo.

El proceso de disolución del complejo es muy rápido. La complejación del fármaco por parte de la CD no interfiere con su actividad ya que el proceso es rápidamente reversible. En solución acuosa el complejo fármaco:CD se está formando y disociando continuamente con tiempos de vida media del rango de milisegundos, una vez estando libre el fármaco, este es absorbido (Mosher y Thompson, 2002), lo anterior ocurre cuando el complejo es diluido, sin embargo cuando el fármaco se administra por la vía transmucosal, trasdérmica u ocular la dilución es mínima, bajo estas condiciones el fármaco puede ser desplazado de la cavidad de la CD por moléculas lipofílicas endógenas, tales como, colesterol, triglicéridos, fosfolípidos etc. (Stella et al., 1999) o si el complejo se encuentra localizado muy cercano a la membrana biológica lipofílica (tal como la superficie de la piel) el fármaco puede ser transferido a la matriz por la cual este tiene mayor afinidad. Esto podría

explicar en parte el porque la DM- β -CD favorece la permeación del CHL, ya que se vio que esta CD extrae lípidos de membrana.

Las membranas biológicas son lipofílicas por lo que solo moléculas relativamente lipofílicas pueden penetrar a través de ellas, sin embargo como ya se mencionó, la absorción a través de mucosas se da por un proceso de difusión pasiva, la cual requiere para que se de, una alta concentración de fármaco (alta actividad termodinámica del fármaco) en la fase acuosa exterior a la membrana (lágrimas o saliva) o vehículo acuoso. En otras palabras, para una exitosa formulación el fármaco debe ser hidrosoluble y al mismo tiempo liposoluble, lo cual se puede lograr a través de la complejación del fármaco con la CD (Másson et al, 1999, Ceschel et al, 2002).

De la figura 45, se puede apreciar que al aumentar la cantidad de ciclodextrina, el proceso de disociación es desplazado (ley de acción de masas) hacia la formación del complejo, disminuyendo de esta forma la cantidad de fármaco libre y por lo tanto la permeación, este fenómeno es lo que puede explicar el motivo por el cual la formación de complejos con TM- β -CD y HP- β -CD no favorece, si no por el contrario disminuye la permeación de CHL a través de mucosa bucal, independientemente del método de preparación. En estos complejos la eficiencia de encapsulamiento es baja, por lo que la ciclodextrina se encuentra en una mayor proporción, de la tabla 12 (eficiencia de encapsulamiento) se puede observar para el complejo TM- β -CD:CHL las siguientes relaciones molares 1.13:1 y 3.76:1 para el complejo obtenido por co-precipitación y liofilización respectivamente y para la HP- β -CD:CHL de 6:1 y 6.8:1 respectivamente. El flujo es debido a las moléculas de fármaco libre, con el incremento de la cantidad de CD, el fármaco asociado incrementa y las moléculas disociadas disponibles para la difusión disminuyen, causando la disminución de la permeación del CHL.

Este fenómeno no se observó para el caso de la DM- β -CD, ya que tanto para el complejo obtenido por co-precipitación y liofilización el flujo del CHL se vio favorecido, la relación molar de estos complejos es 1:1.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, se encontró que el flujo de diclofenaco incrementa conforme aumenta la concentración de HP- β -CD hasta una relación 2:1 (CD-Diclofenaco) y disminuye con una mayor concentración de HP- β -CD. Shaker et

al., (2003) observó que la complejación de corticosterona con HP- β -CD disminuyó la actividad termodinámica del fármaco y no se observó incremento en el flujo.

El aumento en la permeación óptima es obtenido cuando se utiliza la cantidad de CD suficiente para solubilizar casi todo el fármaco en el vehículo. Babu et al. (2004) estudiaron el efecto de HP- β -CD y PM- β -CD sobre la permeación transdérmica de bupranolol (BPL, figura 46). A bajas concentraciones de CD, cuando el BPL se encuentra en suspensión, el flujo se va incrementando con el incremento de la concentración de CD, pero cuando el BPL se encuentra en solución el flujo disminuye con el incremento en la concentración de CD. Cuando el BPL se encuentra en suspensión las CDs proveen una alta concentración de fármaco libre que es liberado rápidamente del complejo, conduciendo a un mayor flujo, cuando aumenta la concentración de CD disminuye la concentración de fármaco libre en solución debido a la alta afinidad del BPL hacia las moléculas de CD, como resultado el complejo permea mucho más lento que el BPL libre.

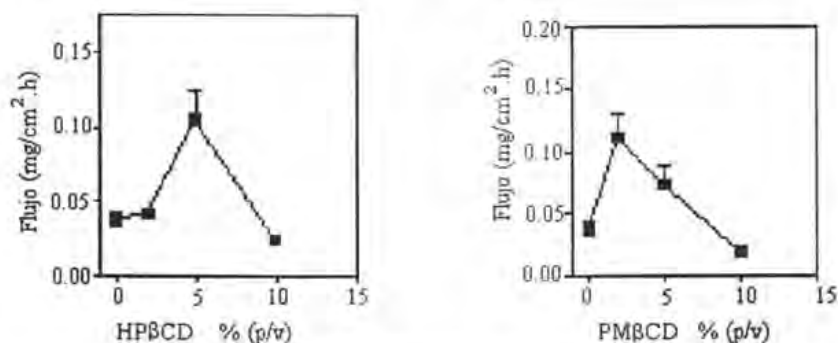


Figura 46. Efecto de HP- β -CD y PM- β -CD sobre el flujo de bupranolol (Tomada de Babu., et al 2004)

Este mismo fenómeno fue observado por Loftsson et al., (1991) al evaluar el efecto de la HP- β -CD sobre la liberación de hidrocortisona a través de una membrana semipermeable.

El efecto promotor de la DM- β -CD sobre la permeación de CHL es posiblemente debido al efecto combinado de solubilización del CHL y a la reducción de la función de barrera de la mucosa bucal, como ya se explicó la DM- β -CD causa extracción de componentes lipídicos de la mucosa bucal.

6.5.3 Efecto del pre-tratamiento con CDs sobre la permeación de CHL

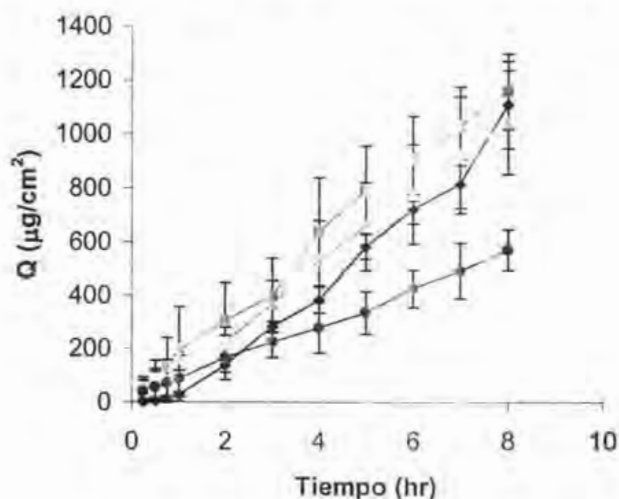


Figura 47. Cinética de permeación del CHL utilizando como promotor las ciclodextrinas -♦-CHL, -■-DM-β-CD, -▲-TM-β-CD y -●- HP-β-CD

En la figura 47 y en la tabla 19, se observa que el pre-tratamiento (1hr) con DM-β-CD y TM-β-CD al 10%, aumentan ligeramente la permeación de CHL (estadísticamente no significativo, prueba de intervalos múltiples de Duncan), sin embargo el pre-tratamiento con HP-β-CD al 10% disminuye marcadamente la permeación de CHL (estadísticamente significativo, prueba de intervalos múltiples de Duncan).

Tabla 19. Efecto del pre-tratamiento con CDs sobre el flujo de CHL.

Solución	J (µg/cm ² .h)
Pre-tratamiento Regulador de fosfatos pH 7,4	136,71 ± 15,10
DM-β-CD (10%)	145,11 ± 14,69
TM-β-CD (10%)	130,98 ± 32,49
HP-β-CD (10%)	65,98 ± 23,84

Los resultados obtenidos concuerdan con lo encontrado con otros autores, Babu et al. (2004) encontró que el pre-tratamiento con HP-β-CD al 10% no incrementa el flujo de

Brupanolol (BPL), la permeación de BPL aumenta con el pre-tratamiento con HP- β -CD al 5%, pero disminuye cuando la concentración de la CD es aumentada al 10%.

El pre-tratamiento de la piel con M- β -CD y γ -CD incrementa dos veces el flujo de Tenoxicam (TEM) comparada con los valores sin pre-tratamiento, pero este incremento en la absorción se atribuye a la hidratación de la piel porque se obtiene el mismo resultado cuando la piel se pre-trata con regulador de fosfatos.

De acuerdo con Loftsson et al. (1999) el pre-tratamiento con CDs usualmente no aumenta la permeabilidad del fármaco, Arima et al. (1998) reportaron un insuficiente pre-tratamiento de M- β -CD, además Williams et al. (1999) mostraron claramente que el pre-tratamiento con β -CD y HP- β -CD no aumentan la permeación transdérmica de un fármaco lipofílico (estradiol) y un fármaco hidrofílico (5-Fluorouracilo). Mientras que Okamoto et al. encontraron un incremento en la absorción con el pre-tratamiento de M- β -CD para el ácido sulfanílico.

Williams et al. (1996) encontraron que el pre-tratamiento de la piel con β -CD y HP- β -CD reducen la permeación de tolueno a través del estrato corneo humano. En el caso del pre-tratamiento con CDs, el fármaco puede incrementar su permeabilidad cutánea si no forma un complejo de inclusión. Esto puede sugerir que el método usado para asegurar el efecto de las CDs puede influir en el perfil de permeación piel-fármaco.

Los estudios en los que el pre-tratamiento con CDs aumenta el flujo de algunos p.a., utilizan concentraciones elevadas de CD y tiempos de pre-tratamiento también altos (4h). Vollmer et al. (1994) observaron que el pre-tratamiento de piel de rata con DM- β -CD (20%; 4h) produce el incremento del flujo de liarozole 10 veces.

6.5.4 Cantidad retenida en la mucosa bucal porcina después de la permeación de CHL.

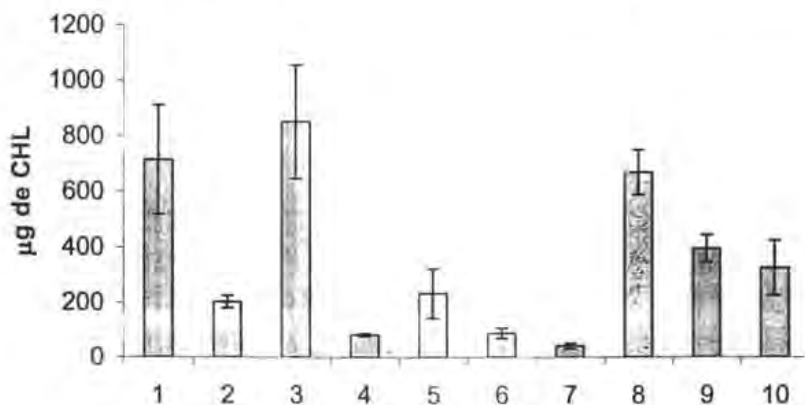


Figura 48. CHL retenido en la mucosa bucal, (1) CHL, (2) Co-precipitado DM- β -CD, (3) Co-precipitado TM- β -CD, (4) Co-precipitado HP- β -CD, (5) Liofilización DM- β -CD, (6) Liofilización TM- β -CD, (7) Liofilización HP- β -CD, (8) Pre-tratamiento DM- β -CD, (9) Pre-tratamiento TM- β -CD y (10) Pre-tratamiento HP- β -CD.

En la figura 48 se observa la cantidad de CHL retenido en la mucosa bucal, una vez terminada la permeación. Se observa para el caso de los complejos formados por el método de co-precipitación que hay una marcada influencia en la cantidad de p.a. retenido en la mucosa, siendo mayor para el complejo CHL: TM- β -CD cp (estadísticamente no significativo con respecto a CHL y significativo con respecto al complejo CHL: HP- β -CD cp y al complejo CHL: DM- β -CD cp, Prueba de intervalos múltiples de Duncan, Anexo 9.5.) La baja cantidad retenida de CHL cuando se encuentra formando un complejo con la DM- β -CD, probablemente es debido, a que la formación de este complejo favoreció la permeación de CHL a través de la mucosa bucal y casi todo el CHL paso a la fase receptora, por el contrario, se ha reportado que la retención de acetato de dexametazona (DMA) por parte de la piel disminuye cuando está en forma de complejo, en contraste con el aumento de la permeabilidad (Lopez et al., 2000), la cantidad retenida de CHL en el complejo formado con HP- β -CD (también muy baja) es debido a que en este complejo la cantidad de CD es mucho mayor que la cantidad de CHL, por lo que la liberación del CHL a partir de la CD es muy baja. En el caso de los productos obtenidos por liofilización la

cantidad de CHL retenida en los 3 complejos con las diferentes CDs es muy baja (significativamente menor que con respecto a CHL). La mayor cantidad retenida de CHL cuando se encuentra formando un complejo con TM- β -CD, es debido probablemente al aumento de la solubilidad del CHL, Tenjarla et al., (1998) reportaron que la cantidad de miconazol retenida en la piel de ratón es 8.4 veces mayor cuando el p.a. se encuentra como complejo HP- β -CD: miconazol que de una solución de miconazol, solo debido a la solubilidad aumentada del fármaco en presencia de las CDs.

En el caso del pre-tratamiento la cantidad de CHL retenido en la mucosa sigue la siguiente tendencia: CHL > Pre-tratamiento con DM- β -CD > Pre-tratamiento con TM- β -CD > Pre-tratamiento con HP- β -CD, aunque no existe diferencia estadísticamente significativa entre CHL y Pre-tratamiento con DM- β -CD, ni entre Pre-tratamiento con TM- β -CD y Pre-tratamiento con HP- β -CD (Prueba de intervalos múltiples de Duncan)

VII. CONCLUSIONES

DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS PUEDE CONCLUIRSE LO SIGUIENTE:

Las tres ciclodextrinas estudiadas aumentan linealmente la solubilidad del clorambucilo (diagrama de solubilidad A_L) en regulador de fosfatos pH 7.4 y 37°C en función de la concentración de las mismas, en el siguiente orden DM- β -CD > TM- β -CD > HP- β -CD.

Los estudios de solubilidad nos permitieron determinar la constante de unión aparente, mostrando que el valor de esta es dependiente del tipo de ciclodextrina: CHL: DM- β -CD ($1067.54M^{-1}$) > CHL: TM- β -CD ($520.76 M^{-1}$) > CHL: HP- β -CD ($49.97M^{-1}$).

La estabilidad química del clorambucilo en regulador de fosfatos pH 7.4 y 37°C se ve favorecida en la presencia de ciclodextrinas, siendo este efecto dependiente del tipo y concentración de la ciclodextrina. A una concentración de CD del 8.7% se tiene que la TM- β -CD reduce la constante de hidrólisis por un factor de 35, mientras que la DM- β -CD y la HP- β -CD reducen dicha constante por un factor de 18 y 20 respectivamente.

La constante de degradación de pseudo primer orden disminuye hiperbólicamente con el incremento de la concentración de ciclodextrinas, mostrando una cinética de saturación.

Se logró aislar el complejo de inclusión del clorambucilo con las ciclodextrinas estudiadas por el método de co-precipitación, a partir de una solución de etanol que contenía un exceso de CHL. Tanto con la DM- β -CD, como con la TM- β -CD se logró aislar el complejo con un alto rendimiento y eficiencia de encapsulamiento. Con la HP- β -CD se obtuvo el complejo con bajo rendimiento y eficiencia de encapsulamiento.

El método de liofilización permite obtener un alto rendimiento, sin embargo los complejos aislados tienen una baja eficiencia de encapsulamiento.

La caracterización por DSC, IR y Microscopía electrónica de los polvos obtenidos, nos permiten concluir que los productos obtenidos por el método de co-precipitación corresponden a la formación de un complejo real.

La caracterización de los polvos obtenidos por liofilización nos hace concluir que la complejación no fue total y que los cambios en los Termogramas, IRs y micrografías pueden ser debidos a la formación de una dispersión sólida amorfa, o al enmascaramiento por parte del exceso de ciclodextrina.

Las ciclodextrinas disminuyen las propiedades de barrera de la mucosa bucal porcina:

Los estudios de DSC muestran que hay extracción de componentes lipídicos de la mucosa bucal porcina, ya que se observa una disminución de la entalpía de fusión a 78°C, la cual corresponde a lípidos de membrana, esta extracción es dependiente del tipo de CD siguiendo la siguiente tendencia: DM-β-CD > TM-β-CD > HP-β-CD

Los estudios de FTIR/ATR indican que hay extracción de lípidos por parte de las ciclodextrinas estudiadas de la mucosa bucal porcina, al haber una disminución en las áreas de los picos correspondientes a las cadenas alquilas de los lípidos de la mucosa bucal localizados en 2920 y 2850 cm⁻¹. La extracción es dependiente del tipo de CD, teniendo el siguiente orden DM-β-CD > TM-β-CD > HP-β-CD

De los datos obtenidos de las permeaciones se concluye lo siguiente:

Independientemente del método empleado en la elaboración del complejo, la DM-β-CD favorece la permeación del CHL a través de mucosa bucal de cerdo, mientras que la TM-β-CD y la HP-β-CD la disminuyen.

El efecto promotor de la DM-β-CD es posible debido al efecto combinado de solubilización del CHL y a la reducción de la función de barrera de la mucosa bucal.

La permeación de CHL es mayor para los complejos formados por co-precipitación que por liofilización, debido a la alta proporción de CD que se encuentra en los productos liofilizados.

El pre-tratamiento de la mucosa bucal con DM- β -CD y TM- β -CD, aumenta ligeramente la permeación de CHL a través de mucosa bucal, mientras que el pre-tratamiento con HP- β -CD la disminuye.

VIII. REFERENCIAS

- Angeles, E., Nava, G., Molecular Modeling Interaction of Cyclodextrin with Chlorambucil" XVIIth International Symposium on Medicinal Chemistry, September 1-5, 2002, Spain.
- Apte, S., Ugwu, S., Revisión y clasificación de nuevos excipientes en los medicamentos parenterales, *Pharm. Technology en español*, 1:2 (2003) 17-24
- Arima, H., Miyaji, T., Irie, T., Hirayama, F., Uekama, K., Enhancing effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on cutaneous penetration and activation of ethyl 4-biphenyl acetate in hairless mouse skin. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 6 (1998) 53-59
- Aungst, B., Rogers, J., Comparison of the effects of various transmucosal absorption promoters on buccal insulin delivery. *Int. J. Pharm.* 53 (1998) 227-235
- Babu, R., Pandit, J., Effect of cyclodextrins on the complexation and transdermal delivery of bupranolol through rat skin, *Int. J. Pharm.* 271 (2004) 155-165
- Backensfeld, T., Muller, B., Wiese, M., Seydel, J., Effect of cyclodextrin derivatives on indomethacin stability in aqueous solution, *Pharm. Res.* 7:5 (1990) 484-490
- Bekers, O., Uijtendaal, E., Beijnen, J., Bult, A., Underberg, W., Cyclodextrins in the pharmaceutical field, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1991, 17(11), 1503-1549
- Beldarraín, A., Aplicaciones de la calorimetría diferencial de barrido al estudio de la estabilidad de las proteínas, *Biocología aplicada*, 18 (2001) 10-16
- Bettinetti, G., Mura, P., Faucci, T., Sorrenti, M., Setti, M., Interaction of naproxen with noncrystalline acetyl- β - and acetyl cyclodextrins in the solid and liquid state., *E.J.Pharm. Scs.*, 15 (2002) 21-29
- Beyer, U., Wohlschiegel, B., Schütte, T., Unger, C., Frahm, A., Kratz, F., Synthesis of transferrin and albumin conjugates of the anticancer drugs chlorambucil, doxorubicin and daunorubicin, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 4, (1996) S111
- Castellanos, J., Mucosa Bucal, *Revista ADM*, 59 (2002) 73
- Calabresi, P., Chabner, B., Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas en Goodman and Gilman, *Las fases farmacológicas de la terapéutica*, 9 edición, volumen II. 1301-1308
- Ceschel, G., Mora, P., Borgia, S., Maffei, P., Ronchi, C., Skin permeation study of dehydroepiandrosterone (DHEA) compared with its α -cyclodextrin complex form., *J. Pharm. Sci.*, 91:11 (2002) 2399-2406

- Chabner, B., Allegra, C., Curt, G., Calabresi, P., Fármacos Antineoplásicos en Goodman and Gilman, Las fases farmacológicas de la terapéutica, 9 edición, volumen II. 1309-1317
- Chao, J., Li, J., Meng, D., Huang, S., Preparation and study on the solid inclusion complex of sparfloxacin with HP- β -cyclodextrin, *Spectrochimica Acta Part A*, 59 (2003) 705-711
- Chatterji, D., Yeager, R., Gallelli, J., Kinetics of chlorambucil hydrolysis using high-pressure liquid chromatography, *J. Pharm. Sci.*, 71 (1982) 50-54
- Chidambaram, N., Srivatsava, A., Buccal drug delivery systems, *Drug Development and industrial Pharmacy*, 21(9), (1995) 1009-1036
- Coe, P., Markou, M., Tatlow, J., Synthesis of 4-[4'-bis(2''-chloroethyl) aminophenyl]-3-(difluoromethyl) butanoic acid [3-(difluoromethyl) chlorambucil], *J. Fluorine Chemistry* 89 (1998) 183-188
- Davies, I., Allanson, J., Causon, Rapid determination of the anti-cancer drug chlorambucil (LeukeranTM) and its phenyl acetic mustard metabolite in human serum and plasma by automated solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatography B*, 732 (1999) 173-184
- Duchene, D., Wouessidjewe, D., Ponchel, G., Cyclodextrins and carrier systems, *J. Control. Rel.*, (1999) 62, 263-268
- Ehrsson, H., Eksborg, S., Wallin, I., Nilsson, S., Degradation of chlorambucil in aqueous solution, *J. Pharm. Sci.*, (1980) 1091-1094
- Fauci, M., Mura, P., Effect of water-soluble polymers on naproxen complexation with natural and chemical modified β -cyclodextrins, *Drug Develop. Ind. Pharm.* 27:9 (2001) 909-917
- Fernandes, C., Vieira, T., Veiga, F., Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of nicardipine cyclodextrins inclusion compounds, *E. J. Pharm. Sci.*, 15 (2002) 79-88
- Funk, O., Schwabe, L., Fromming, K., Freeze-dried preparations of ketoprofen and heptakis-(2, 6-O-dimetil)- β -cyclodextrin, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 20 (1994) 1957-1969
- Ganem-Quintanar, A., Falsong-Rieg, F., Buri, P., Contribution of lipid components to the permeability barrier of oral mucosa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 44 (1997) 107-120
- Ganem-Quintanar, A., Kalia, Y., Falsong-Rieg, F., Buri, P., Mechanisms of oral permeation enhancement, *Int. J. Pharm.*, 156 (1997) 127-142

- Ganem, A., Quintanar, D., La mucosa bucal como vía alterna para la administración de fármacos, *Informaceutico*, 7:6 (2001) 25-28
- García-Zubiri, I., González-Gaitano, G., Sánchez, M., Isasi, J., FTIR study of dibenzofuran-2-carboxylic acid and its complexes with β -cyclodextrin., *Vibrational spectroscopy*, 2003, In Press.
- Ginés, J., Arias, M., Pérez-Martínez, J., Moyano, J., Morillo, E., Sánchez-Soto, P., Determination of the stoichiometry of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid- β -cyclodextrin complexes in solution and in solid state, *Thermochimica*, 321 (1998) 53-58
- Giordano, F., Novak, C., Moyano, J., Termal análisis of cyclodextrins and their inclusión compounds, *Termochimica Acta*, 2001, 380, 123-151
- Golden, G., Mckie, J., Potts, R., Role of stratum corneum lipid fluidity in transdermal drug flux, *J. Pharm. Scs.*, 76 (1987) 25-28
- Granero, G., Longhi, M., Termal Análisis and Spectroscopic Characterization of Interactions between a Naphthoquinone derivative with HP- β -CD or PVP. *Pharm. Dev. Techn.* 7:3 (2002) 381-390
- Green, A., Guillory, K., Heptakis (2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin complexation with the antitumor agent chlorambucil, *J. Pharm. Scs.* 78 (1989) 427-431
- Green, A., Miller, E., Guillory, K., Physical properties of the complexes formed between heptakis (2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin, β -cyclodextrin, and chlorambucil., *J. Pharm. Scs.* 80:2 (1991) 186-189
- Halmos, T., Santarromana, M., Antonakis, K., Scherman, D., Synthesis of glucose-chlorambucil derivatives and their recognition by the human GLUT1 glucose transporter, *Eur. J. Pharmco.* 318 (1996) 477-484
- Harris, D., Robinson, J., Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity, *J. Pharm. Sciences*, 81(1), (1992) 1-10
- Hoogstraate, J., Wertz, W., Drug delivery via the buccal mucosa, *PSTT*, 1 (1998) 309-316.
- Horton, J., Roy, G., Piper, J., Hounten, B., Awasthi Y., Mitra, S., Alaoui-Jamali, M., Boldogh, I., Singhal, S., Characterization of a chlorambucil-resistant human ovarian carcinoma cell line overexpressing glutathione S-transferase m, *Biochemical Pharmacology*, 58 (1999) 693-702

- Hovinen, K., Reinikainen, P., Vilpo, L., S epala, E., Vilpo, J., Kinetics of chlorambucil in vitro: effects of fluid matrix, human gastric juice, plasma proteins and red cells, *Chemico-Bio. Interactions* 103 (1997) 187-198
- Iglesias-Guerra, F., Candela, J., Bautista, J., Alcludia, F., Vega-P erez, J., Alkylating agents from sugar. Alkyl hexopyranoside derivatives as carrier systems for chlorambucil, *Carbohydrate Research*, 316 (1999) 71-84
- Ikeda, Y., Motoune, S., Matsuoka, T., Arima, H., Hirayama, F., Uekama, K., Inclusion Complex Formation of captopril with α - and β -Cyclodextrins in Aqueous Solution: NMR Spectroscopic and Molecular Dynamic Studies., *J. Pharm. Sci.*, 91 (2002) 2390-2398
- Imbert, D., Cullander, C., Buccal mucosa in vitro experiments I. Confocal imaging of staining and MTT assays for the determination of tissue viability. *J. Control. Release*, 58 (1999) 39-50
- Jacobsen, J., Deurs, B., Pedersen, M., Rassing, M., TR146 cells grown on filters as a model for human buccal epithelium: I. Morphology, growth, barrier properties, and permeability, *Int. J. Pharm.*, 125 (1995) 165-184
- Jacques, Y., Pierre, B., *Muqueuse buccale et syst emes th erapeutique bioadh esifs*, Editions M edecine et Hygi ene, 1998
- Junginger, H., Hoogstraate, J., Verhoef, C., Recent advances in buccal drug delivery and absorption- in vitro and in vivo studies, *J. Controlled Release* 62 (1999) 149-159
- Karayianni, V., Mioglou, E., Iakovidou, Z., Mourelatos, D., Fousteris, M., Koutsourea, A., Arsenou, E., Nikolaropoulos, S., *Mutation Research* 535 (2003) 79-86
- Kurosaki, I., Takatori, T., Nishimura, H., Nacayama, T., Kimura, T., Regional variation in oral mucosal drug absorption: Permeability and degree of keratinization in hamster oral cavity, *Pharm. Research*, 8(10), (1991), 1297-1301
- Lambert, D., Rationale and applications of lipids as prodrug carriers, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 11 Suppl. 2 (2000) S15-S27
- Larucea, E., Arellano, A., Santoyo, S., Ygartua, P., Interaction of tenoxicam with cyclodextrins and its influence on the in vitro percutaneous penetration of the drug, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2001, 27(3), 251-260

Leroux, J., Allémann, E., Doelker, E., Gurny, R., New Approach for the preparation of nanoparticles by emulsification-diffusion method, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41, 1, (1995) 14-18

Lloyd, A., *Monitor: progress and profiles*, PSTT, 1998, 1(3), 136-139

Löf, K., Hovinen, J., Reinikainen, P., Vilpo, L., Seppälä, E., Vilpo J., Kinetics of chlorambucil in vitro: effects of fluid matrix, human gastric juice, plasma proteins and red cells, *Chemico-Biological Interactions* 103 (1997) 187-198

Lofsson, T., Björnsdóttir, S., Pálsdóttir, G., Bodor, N., The effects of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the solubility and stability of chlorambucil and melphalan in aqueous solution, *Int. J. Pharm.* 57 (1989) 63-72

Lofsson, T., Brewster, M., Pharmaceutical applications of cyclodextrins. I. Drug solubilization and stabilization, *J. Pharm. Sci.*, 1996 85(10), 1017-1025

Lofsson, T., Masson, M., Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice, *Int. J. Pharm.*, 2001, 225, 15-30

Lofsson, T., Olafsdottir, B., Bodor, N., The effects of cyclodextrin on transdermal delivery of drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 37 (1991) 30-33

Lopez, R., Collett, J., Bentley, V., Influence of cyclodextrin complexation on the in vitro permeation and skin metabolism of dexamethasone., *Int. J. Pharm.*, 200 (2000) 127-132

Ma, D., Rajewski, R., Vander Velde, D., Stella, V., Comparative effects of (SBE)₇M- β -CD y HP- β -CD on the stability of two Anti-neoplastic Agents, Melphalan and Carmustine, *J. Pharm. Sci.*, 89:2 (2000) 275-287

Manolikar, M., Sawant, M., Study of solubility of isoproturon by its complexation with β -cyclodextrin, *Chemosphere* 51 (2003) 811-816

Másson, M., Loftsson, T., Másson, G., Stefánsson, E., Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing, *J. Control. Rel.*, 1999, 59, 107-118

Másson, M., Loftsson, T., Jónsdóttir, S., Fridriksdóttir, H., Petersen, D., Stabilisation of ionic drugs through complexation with non-ionic and ionic cyclodextrins, *Int. J. Pharm.*, 164 (45-55)

Menard, F., Dedhiya, M., Rodees, C., Potential pharmaceutical applications of a new beta cyclodextrin derivative, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1988, 14(11), 1529-1547

- Merkle, H., Wolany, G., Buccal delivery for peptide drugs, *J. Controlled Release*, 21 (1992) 155-164
- Mi, F., Lin, Y., Wu, Y., Shyu, S., Tsai, Y., Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug-delivery system: phase-separation, degradation and release behavior, *Biomaterials*, 23 (2002) 3257-3267
- Mitchell, T., Kendall, M., Bellhouse, B., A ballistic study of micro-particle penetration to the oral mucosa, *Int. J. Impact Engineering*, 28 (2003) 581-599
- Mosher, G., Thompson, D., Complexation and cyclodextrins, *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, (2002) 531-552
- Mura, P., Zerrouk, N., Faucci, T., Maestrelli, F., Chemtob, C., Comparative study of ibuprofen complexation with amorphous β -cyclodextrin derivatives in solution and in the solid state, *Eur. J. Pharm. Bio.* 54 (2002) 181-191
- Myrdal, P., Yalkowsky, S., Solubilization of drugs in aqueous media., *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, 2002, 2458-2480
- Nair, M., Chien, Y., Buccal delivery of progestational steroids: I. Characterization of barrier properties and effect of penetrant hydrophilicity, *Int. J. Pharm.*, 89 (1993) 41-49
- Nava, G., Tamayo, D., Villalobos, R., Quintanar, G., Ganem, R., Absorción de fármacos a través de mucosa bucal, *Informacéutico* 10 (2003) 12-22
- Nielsen H., Rassing M., TR146 cells grown on filters as a model of human bucal epithelium:IV. Permeability of water, mannitol, testosterone and β -adrenoceptor antagonists. Comparison to human, monkey and porcine bucal mucosa., *Int. J. Pharm* 194 (2000) 155-167
- Nielsen, H., Verhoef, J., Ponc, M., Rømer, M., TR146 cells grown on filters as a model of human bucal epithelium: permeability of fluorescein isothiocyanate-labelled dextrans in the presence of sodium glycocholate, *J. Controlled Release*, 60 (1999) 223-233
- Nozaki, Y., Ohta, M., Chien, Y., Transmucosal controlled systemic delivery of isosorbide dinitrate: in vivo/in vitro correlation. *J. Control. Release*. 43 (1997) 105-114
- Orienti, I., Cerchiara, T., Zecchi, V., Arias, M., Gines, J., Moyano, J., Rabasco, A., Complexation of ursodeoxycholic acid with β -cyclodextrin-choline dichloride coprecipitate, *Int. J. Pharm.*, 190 (1999) 139-153

- Ou, D., Ueda, H., Nagase, H., Endo, T., Nagai, T., Some pharmaceutical properties of 2,3,6-partially Methylated- β -cyclodextrin and its solubilizing and stabilizing abilities, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1994, 24(12), 2005-2016
- Paci, A., Rieutord, A., Brion, F., Prognon, P., Separation methods for alkylating antineoplastic compounds, *J. Chromatography B*, 764 (2001) 255-287
- Palmieri, G., Galli-Angeli, D., Giovannucci, G., Martelli, S., Inclusión of methoxybutropate in β - and hydroxypropyl β -cyclodextrins: comparison of preparation methods, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 23 (1997) 27-37
- Pedersen, M., The bioavailability difference between genuine cyclodextrin inclusion complexes and freeze-dried or ground drug cyclodextrin simples may be due to supersaturation differences, *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 23:3 (1997) 331-335
- Peralta-Zaragoza, O., Bahena-Román, M., Díaz-Benítez, C., Madrid-Marina, V., Regulación del ciclo celular y desarrollo del cáncer: Perspectivas terapéuticas, *Salud Publica Mex.* 39 (1997) 451-462
- Perdomo-López, I., Rodríguez-Pérez, A., Izquierdo-Peiro, J., White, A., Estrada, E., Villa, T., Torres-Labandeira, J., Effect of cyclodextrins on the solubility and antimycotic activity of sertaconazole: Experimental and computational Studies, *J. Pharm. Sci.*, 91 (2002) 2408-2415
- Phita, J., Amorphous Water-Soluble Derivatives of Cyclodextrins: Nontoxic Dissolution Enhancing Excipients, *J. Pharm. Sci.*, 74 (1985) 987-990
- Pitha, J., Harman, M., Michel, M., Hydrophilic cyclodextrin derivatives enable effective oral administration of steroidal hormones. *J. Pharm. Scs.*, 75 (1986) 165-167
- Pralhad, T., Rajendrakumar, K., Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003
- Puglisis, G., Fresta, M., Ventura, C., Interaction of natural and modified β -cyclodextrins with a biological membrane model of dipalmitoylphosphatidylcholine, *J. Colloid and interface science*, 180(1996) 542-547
- Qi, H., Sikorski, C., Controlled delivery using cyclodextrin technology, *American Chemical Society*, 9 (1999) 13-129

- Rajewski, R., Stella, V., Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery, *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85(11), 1142-1169
- Rathbone, M., Hadgraft, J., Absorption of drugs from the human oral cavity, *Int. J. Pharm.*, 74 (1991) 9-24
- Rathbone, M., Tucker, I., Mechanisms, barriers and pathways of oral mucosal drug permeation, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 12 (1993) 41-60
- Rathbone, M., Human buccal absorption. II. A comparative study of the buccal absorption of some parahydroxybenzoic acid derivatives using the buccal absorption test and buccal perfusion cell, *Int. J. Pharm.*, 74 (1991) 18 9-194
- Redenti, E., Szente, L., Szejtli, J., Cyclodextrin complexes of salts of acidic drugs. Thermodynamic properties, structural features, and pharmaceutical applications, *J. Pharm. Sci.*, 2001, 90(8), 979-986
- Ribeiro, L., Ferreira, D., Veiga, F., Physicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vinpocetine complexation with B-cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivative in solution and solid state, *Eur. J. Pharm. Sci.* (2003) 1-14
- Saah, M., Wu, W., Eberst, K., Marvanyos, E., Bodor, N., Desing, synthesis, and pharmacokinetic evaluation of a chemical delivery system for drug targeting to lung tissue, *J. Pharm. Sci.*, 85:5 (1996) 496-504
- Sciafani, J., P., Hansen, E., Cettina, M., Nightingale, J., A protocol for the assessment of receiver solution additive-induced skin permeability changes. An example with γ -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* 124 (1995) 213-217
- Senel, S., Hincal, A., Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations., *J. Controlled release*, 72 (2001) 133-144
- Shaker, D., Ghanem, A., Li, S., Warner, K., Hashem, F., Higuchi, W., Mechanistic studies of the effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on in vitro transdermal permeation of corticosterone through hairless mouse skin, *Int. J. Pharm.* 253 (2003) 1-11
- Shao, Z., Li, Y., Chermak, T., Mitra, A., Cyclodextrin as mucosal absorption promoters of insulin. II. Effects of β -cyclodextrin derivatives on α -chymotryptic degradation and enteral absorption of insulin in rats., *Pharm. Res.* 11:8 (1994) 1174-1179
- Shojaei, A., Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: A review, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 1 (1998) 15-30

- Singh, M., Sharma, R., Banerjee, U, Biotechnological applications of cyclodextrins, 2002, 20, 341-359
- Sinswat, P., Tengamnuay, P., Enhancing effect of chitosan on nasal absorption of salmon calcitonin in rats: comparison with hydroxypropyl and dimethyl- β -cyclodextrins, *Int. J. Pharm.* 257 (2003) 15-22
- Spamer, E., Muller, D., Wessels, P., Venter, J., Characterization of the complex of furosemide with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutyl ether-7- β -cyclodextrin, *E. J. Pharm. SCs.*, 16 (2002) 247-253
- Squier, C., Kremer, M., Wertz, P., Continuous flow mucosal cells for measuring the in-vitro permeability of small tissue samples, *J. Pharm. Sciences*, 86 (1997) 82-84
- Stella, V., Rao, V., Zannou, E., Zia, V., Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes, *Adv. Drug, Delivery Reviews*, 1999, 36, 3-16
- Stella, V., Rajewski, R., Cyclodextrins: Their future in drug formulation and delivery, *Pharm. Res.*, 1997, 14(5), 556-567
- Szente, L., Szejtli, J., Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development, *Adv. Drug, Delivery Reviews*, 1999, 36, 17-28
- Sun, C., Wirsching, P., Janda, K., Syntheses of dendritic linkers containing chlorambucil residues for the preparation of antibody-multidrug immunoconjugates, *Bioorganic And Medicinal Chemistry Letters* 12 (2002) 2213-2215
- Tenjarla, S., Puranajoti, P., Kasina, R., Mandal, T., Preparation, Characterization, and Evaluation of Miconazole-Cyclodextrin Complexes for improved oral ant topical delivery, *J. Pharm. Sci.*, 87:4 (1998) 425-429
- Thompson, I., Bijl, P., Wyk, C., Eyk, A., A comparative light-microscopic, electron-microscopic and chemical study of human vaginal and buccal epithelium, *Arch. Oral. Biol.*, 46 (2001) 1091-1098
- Tsutsumi, K., Obata, K., Takayama, K., Isowa, K., Nagai, T., Permeation of several drugs through keratinized epithelial-free membrane of hamster cheek pouch, *Int. J. of Pharm.* 177 (1999) 7-14
- Veiga, F., Fernandez, C., Maincent, P., Influence of the Preparation Method on the Physicochemical Properties of Tolbutamide/Cyclodextrin Binary Systems., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 27 (6) 523-532, 2001

Ventura, C., Puglisi, G., Giammona, G., Bottino, F., Comparative study on inclusion compounds of 4-Biphenylacetic acid with β -cyclodextrin, hydroxypropylated- β -cyclodextrins and methylated- β -cyclodextrins, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 20 (1994) 2245-

Veuillez, F., Kalia, Y., Jacques, Y., Desuses, J., Buri, P., Factors and strategies for improving bucal absorption of peptides, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 51 (2001) 93-109

Vianna, R., Bentley, V., Ribeiro, G., Carvalho, F., Neto, A., Oliveira, D., Collett, J., Formation of cyclodextrin inclusion complexes with corticosteroids: their characterization and stability, *Int. J. Pharm.* 167 (1998) 205-213

Vitoria, M., Bentley, L., R., Wilson, S., Collett, J., Characterization of the influence of some cyclodextrins on the stratum corneum from the hairless mouse., *J. Pharm. Pharmacol.*, 49 (1997) 397-402

Wells, N., Basso, A., Bradley, M., Solid-Phase dendrimer synthesis, *Biopolymers (Peptide Sci.)* 47 (1998) 381-396

Wells, X., Bender, V., Francis, C., He-Williams, H., Manthey, M., Moghaddam, M., Reilly, W., Whittaker, R., Tris and the ready production of drug-fatty acyl conjugates, *Drug Development Research* 46 (1999) 302-308

Wittman, M., Kadow, J., Vyas, D., Lee, F., Rose, W., Long, B., Fairchild, C., Johnston, K., Synthesis and antitumor activity of novel paclitaxel-chlorambucil hybrids, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 11 (2001) 811-814

Vollmer, U., Muller, B., Peeters, J., Mesens, J., Willfert, B., Peters, T., A study of the percutaneous absorption enhancing effects of cyclodextrin derivatives in rats, *J. Pharm. Pharmacol.*, 46 (1994) 19-22

Xiang, J., Fang, X., Li, X., Transbuccal delivery of 2',3'-dideoxycytidine: in vitro permeation study and histological investigation, *Int. J. Pharm.* 231 (2002) 57-66

Yamahara, H., Suzuki, T., Mizobe, M., Noda, K., *J. Pharm. Sciences*, 79:11 (1990) 963-967

Zia, V., Rajewski, R., Stella, V., Thermodynamics of binding of neutral molecules to solfobutyl ether β -cyclodextrins (SBE-b-CDs): the effect of total degree of substitution, *Pharm. Res.*, 17:8 (2000) 936-941

Zia, V., Rajewski, R., Stella, V., Effect of cyclodextrin charge on complexation of neutral and charged substrates: comparison of (SBE)_{7M}- β -CD to HP- β -CD, Pharm. Res., 18:5 (2001) 667-673

Páginas WEB consultadas

www.cerestar.com

http://club.telepolis.com/jjtorres1/doc/USC/ciclodextrinas_imagenes.htm

www.linfoma.net/v2/home2.php?p=7

http://www.aqfu.org.uy/nueva/revistas/29/revista_N29_noviembre_2000_electroforesis_ca_pilar_04.htm

<http://www.whfreeman.com/life/update/>

www.inegi.gob.mx

IX ANEXOS

9.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN

9.1.1 Curvas de calibración obtenidas por HPTLC, para la cuantificación de CHL en las pruebas de solubilidad, estabilidad y eficiencia de encapsulamiento.

Se realizaron curvas de calibración con diferentes concentraciones de las ciclodextrinas estudiadas, ya que se sabe que la absorción de un fármaco cambia con el incremento de la concentración de ciclodextrina.

9.1.1.1 Curva de calibración de CHL en regulador de fosfatos pH 7.4 (C1)

ng de CHL	Área promedio (n=3)
21,6	927,10
86,4	1360,13
172,8	2787,47
259,2	4018,07
345,6	5060,83
432,0	5889,23
518,4	7015,57
Pendiente	12,5804
Ordenada al origen	565,8200
R ²	0,9946
C.V	2,2856

9.1.1.2 Curvas de calibración de CHL en regulador de fosfatos pH 7.4 con diferentes concentraciones de DM- β -CD

	1.7 % (Curva 2)	2.5 % (Curva 3)	5.0 % (Curva 4)	8.7 % (Curva 5)
ng de CHL	Área promedio (n=3)	Área promedio (n=3)	Área promedio (n=3)	Área promedio (n=3)
72,92	1434,83	1326,87	1282,60	1403,86667
145,83	2747,20	2665,97	2576,37	2686
218,75	4047,43	4035,17	3666,47	4047,23333
291,67	5188,40	5226,37	4799,3	5288,13333
364,58	6448,80	6525,40	6030,13333	6335,93333
437,5	7468,77	7638,20	7254,65	7326,075
Pendiente	16,62	17,369	16,204	16,38
Ordenada	314,34	137,02	132,79	334,34
R ²	0,9993	0,9995	0,9997	0,9981
C.V	2,16930779	2,448043709	2,63809444	2,35780616

Se realizó un análisis de varianza para determinar si existe diferencia significativa entre las pendientes de las distintas curvas de calibración.

Ho: No hay diferencia significativa entre las pendientes obtenidas con diferentes concentraciones de DM- β -CD.

H1: Si hay diferencia significativa entre las pendientes obtenidas con diferentes concentraciones de DM- β -CD.

% DM- β -CD	Pendiente			total	promedio
0,0	12,5596	12,4515	12,7301	37,7413	12,5804
1,7	16,8343	17,1732	17,1065	51,1140	17,0380
2,5	17,4642	17,6744	17,5192	52,6578	17,5526
5,0	15,2898	15,9495	15,9419	47,1812	15,7271
8,7	15,1085	15,2950	14,8898	45,2933	15,0978

Análisis de varianza de un factor ($\alpha = 0.01$)

Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{Calculada}	F _{Tablas} ($\alpha = 0.01$)
Entre tratamientos	45.8001	4	11.45	230.4795	5,99
Error (dentro de tratamientos)	0.4967	10	0.04967		
Total	46.2969	14			

Dado que $F_{cal} (230.47) > F_{crit} (5.99)$, existe diferencia significativa entre las distintas curvas de calibración con diferentes cantidades de DM- β -CD. Para determinar entre que curvas de calibración se realizó la prueba de intervalos múltiples de Duncan, se encontró que existe diferencias significativa entre todas las curvas de calibración, por lo que la presencia de diferentes concentraciones de DM- β -CD, afecta la respuesta analítica del CHL.

Prueba de intervalos múltiples de Duncan ($\alpha = 0.01$)

Comparaciones	$M_1 - M_2$		Rango mínimo significativo
C1 vs C5	4,9722	>	0,08213622
C1 vs C4	2,4548	>	0,08081144
C1 vs C2	1,8255	>	0,07832748
C1 vs C3	0,5146	>	0,07418755
C3 vs C5	4,4576	>	0,08081144
C3 vs C4	1,9402	>	0,07832748
C3 vs C2	1,3109	>	0,07418755
C2 vs C5	3,1466	>	0,07832748
C2 vs C4	0,6293	>	0,07418755
C4 vs C5	2,5174	>	0,07418755

C1= Curva 1, C2 Curva 2 C3 Curva 3 C4 Curva 4, C5 Curva 5.

M_1 = Media 1, M_2 = Media 2

9.1.1.3 Curvas de calibración de CHL en regulador de fosfatos pH 7.4 con diferentes concentraciones de TM- β -CD.

	0,06% (Curva 2)		1,18% (Curva 3)		2,50% (Curva4)
ng de CHL	Área promedio (n=3)	ng de CHL	Área promedio (n=3)	ng de CHL	Área promedio (n=3)
21,4	1062,03	21,2	838,30		
85,6	1713,73	84,8	1217,27	83,2	1660,13
171,2	3266,73	169,6	2340,97	166,4	3080,80
256,8	4565,87	254,4	3421,60	249,6	4442,03
342,4	5439,40	339,2	4578,93	332,8	5772,13
428,0	6357,13	424,0	5604,33	416	6851,13
513,6	7755,33	508,8	6930,90	499,2	7854,67
Pendiente	13,52		12,71		14,98
Ordenada	795,68		291,05		582,11
R ²	0,9938		0,9949		0,9953
C.V.	2,26		2,38		2,88

5,00% (Curva 5)		8,70% (Curva 6)
Área promedio (n=3)	ng de CHL	Área promedio (n=3)
1637,57	75,6	1650,43
3142,60	151,2	3171,13
4505,57	226,8	4565,17
5549,67	302,4	5637,10
6808,53	378	6817,83
8232,13	453,6	8086,43
9073,43	529,2	8925,10
15,531		16,018
594,27		706,56
0,9963		0,9948
1,68		2,14

Se realizó un análisis de varianza para determinar si existe diferencia significativa entre las pendientes de las distintas curvas de calibración.

Ho: No hay diferencia significativa entre las pendientes obtenidas con diferentes concentraciones de TM- β -CD.

H1: Si hay diferencia significativa entre las pendientes obtenidas con diferentes concentraciones de TM- β -CD.

% TM- β -CD	Pendiente			total	promedio
0,00	12,5596	12,4515	12,7301	37,7413	12,5804
0,06	13,2189	13,6713	13,6658	40,5560	13,5187
1,18	12,4190	12,7342	12,9627	38,1159	12,7053
2,50	14,5172	15,2508	15,1637	44,9318	14,9773
5,00	15,4221	15,1444	16,0267	46,5933	15,5311
8,70	15,9076	15,8402	16,3067	48,0545	16,0182

Análisis de varianza de un factor ($\alpha = 0.01$)

Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	$F_{Calculada}$	$F_{Tablas} (\alpha = 0.01)$
Entre tratamientos	33,0007	5	6,6001	67,1895	5,06
Error (dentro de tratamientos)	1,1788	12	0,0982		
Total	34,1795	17			

Dado que $F_{cal} (67.1895) > F_{crit} (5.06)$, existe diferencia significativa entre las distintas curvas de calibración con diferentes cantidades de TM- β -CD. Para determinar entre que curvas de calibración se realizó la prueba de intervalos múltiples de Duncan, se encontró que existe diferencias significativa entre todas las curvas de calibración (excepto entre la curva con 0.0% de CD y la curva con 1.18% de CD), por lo que la presencia de diferentes concentraciones de TM- β -CD, afecta la respuesta analítica del CHL.

Prueba de intervalos múltiples de Duncan ($\alpha = 0.01$)

Comparaciones	$M_1 - M_2$		Rango mínimo significativo
C6 vs C1	3,4377	>	0,1585
C6 vs C3	3,3129	>	0,1559
C6 vs C2	2,4995	>	0,1532
C6 vs C4	1,0409	>	0,1490
C6 vs C5	0,4871	>	0,1415
C5 vs C1	2,9507	>	0,1559
C5 vs C3	2,8258	>	0,1532
C5 vs C2	2,0124	>	0,1490
C5 vs C4	0,5538	>	0,1415
C4 vs C1	2,3968	>	0,1532
C4 vs C3	2,2720	>	0,1490
C4 vs C2	1,4586	>	0,1415
C2 vs C1	0,9382	>	0,1490
C2 vs C3	0,8134	>	0,1415
C3 vs C1	0,1249	<	0,1415

C1= Curva 1, C2 Curva 2 C3 Curva 3 C4 Curva 4, C5 Curva 5, C6 Curva 6.

M_1 = Media 1, M_2 = Media 2

9.1.1.4 Curvas de calibración de CHL en regulador de fosfatos pH 7.4 con diferentes concentraciones de HP- β -CD.

	5,00% (Curva 2)	8,70% (Curva 3)	10,00% (Curva 4)
ng de CHL	Área promedio (n=3)	Área promedio (n=3)	Área promedio (n=3)
27,77	731,4667	504,4667	730,0667
55,54	1474,7333	1092,9333	1556,2667
83,31	2314,6667	1625,3000	2372,5667
111,07	3301,8000	2434,3000	3168,0667
138,84	4349,8000	2838,6000	4087,1667
166,61	5305,5333	3427,3667	4593,5000
	6008,1000		5207,3000
Pendiente	21,2578	27,29286529	32,8308103
Ordenada	-78,8889	70,5952381	-291,504762
R ²	0,9951	0,994046681	0,997221103
C.V.	8,0572	2,893246719	3,324562581

Se realizó un análisis de varianza para determinar si existe diferencia significativa entre las pendientes de las distintas curvas de calibración.

Ho: No hay diferencia significativa entre las pendientes obtenidas con diferentes concentraciones de HP- β -CD.

H1: Si hay diferencia significativa entre las pendientes obtenidas con diferentes concentraciones de HP- β -CD.

% HP- β -CD	Pendiente			total	promedio
0,00	12,5596	12,4515	12,7301	37,7413	12,5804
5.0	34,5430	33,4279	30,5215	98,4924	32,8308
8.7	21,6014	24,1372	22,9593	68,6979	22,8993
10.0	27,2328	27,5688	27,0770	81,8786	27,2929

Análisis de varianza de un factor ($\alpha = 0.01$)

Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{Calculada}	F _{Tablas} ($\alpha = 0.01$)
Entre tratamientos	661,2154	3	220,4051	146,8437	7,59
Error (dentro de tratamientos)	12,0076	8	1,5010		
Total	673,2230	11			

Dado que $F_{cal} (146.84) > F_{crit} (7.59)$, existe diferencia significativa entre las distintas curvas de calibración con diferentes cantidades de HP- β -CD. Para determinar entre que curvas de calibración se realizó la prueba de intervalos múltiples de Duncan, se encontró que existe diferencias significativa entre todas las curvas de calibración, por lo que la presencia de diferentes concentraciones de HP- β -CD, afecta la respuesta analítica del CHL.

Prueba de intervalos múltiples de Duncan ($\alpha = 0.01$)

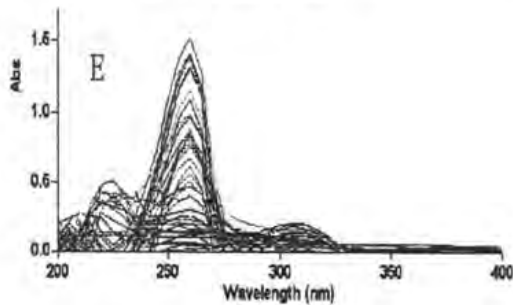
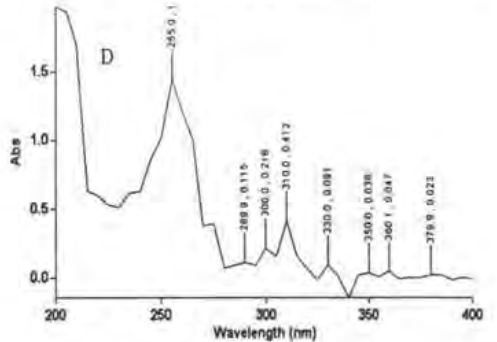
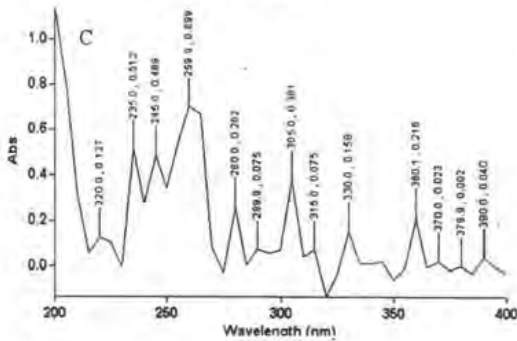
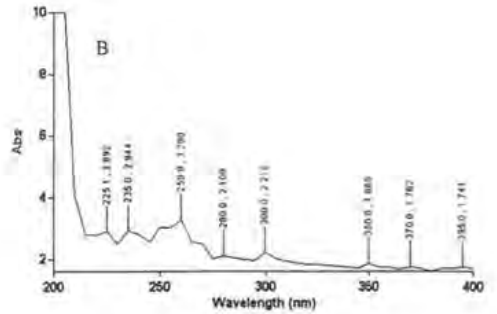
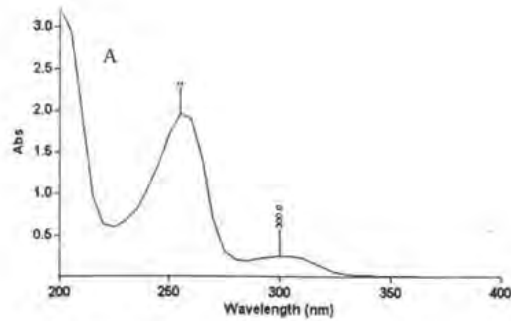
Comparaciones	$M_1 - M_2$		Rango mínimo Significativo
C2 vs C1	20,2504	>	2,5716
C2 vs C3	9,9315	>	2,5016
C2 vs C4	5,5379	>	2,3715
C4 vs C3	14,7124	>	2,5016
C4 vs C2	4,3936	>	2,3715
C3 vs C1	10,3189	>	2,3715

C1= Curva 1, C2 Curva 2 C3 Curva 3 C4 Curva 4.

M_1 = Media 1, M_2 = Media 2

9.1.2 Curvas de calibración obtenidas por espectroscopia UV-VIS, en solución reguladora de fosfatos pH 7.4, con diferentes concentraciones de M- β -CD, a 255 nm, en contacto con mucosa bucal durante 8 h, utilizadas para la cuantificación de CHL durante las permeaciones.

Se decidió cuantificar las permeaciones por espectrofotometría, debido a que es un método mucho más rápido que el de HPTLC, por éste último método las muestras se tenían que congelar y posteriormente descongelar para su análisis, además el tiempo de aplicación en las placas de silica (con el aplicador automático del equipo) era muy largo (aproximadamente 3 horas) y debido a toda esta manipulación el fármaco se degrada, mientras que por espectrofotometría las muestras una vez obtenidas se filtran, diluyen y analizan inmediatamente después de ser obtenidas. Para verificar que este manipuleo no degradaba significativamente al clorambucilo, se determinó su espectro de absorción ultravioleta a través del tiempo, observándose que al degradarse aparecen otros máximos de absorbancia que no corresponden con el espectro del fármaco puro; Cada muestra se escaneo para verificar la ausencia de otros máximos de absorbancia. Para verificar que el CHL no se degradaba en el transcurso de la permeación se escaneo todas las muestras obteniéndose el espectro de absorción correspondiente al CHL sin degradarse (Figuras inferiores).



A) Espectro de absorción UV del CHL, B) Espectro de absorción UV del CHL después de 3 horas, C) Espectro de absorción UV del CHL después de 4 H, D) Espectro de absorción UV del CHL después de 2 horas y E) Espectro de absorción UV del CHL durante la permeación. (Todos los espectros son en medio acuoso y en la presencia de ciclodextrina).

9.1.2.1 Curva de calibración de CHL en regulador de fosfatos pH 7.4.

Concentración de CHL (µg/ml)	Absorbancia Promedio (n=3)
2,6	0,1425
5,2	0,2650
7,8	0,3928
13,0	0,6547
19,2	0,8370
20,3	0,8725
24,8	0,9942
40,0	1,7201
pendiente	0,0408
ordenada	0,0561
R ²	0,9933
C.V.	2,3381

9.1.2.2 Curvas de calibración de CHL en regulador de fosfatos pH 7.4, con diferentes concentraciones de M-β-CD.

Concentración de CHL (µg/ml)	3.5 mg/ml (Curva 2)	0,39 mg/ml (Curva 3)	Concentración de CHL (µg/ml)	50 mg/ml (Curva 4)
	Absorbancia promedio (n=3)	Absorbancia promedio (n=3)		Absorbancia promedio (n=3)
1,04	0,0672	0,0560	2,67	0,2568
2,59	0,1443	0,1154	3,21	0,3183
6,48	0,3416	0,3051	4,81	0,4171
11,66		0,5369	6,30	0,4926
12,95	0,5721	0,5945	8,50	0,6023
15,55	0,7158	0,6847	12,50	0,8251
19,43	0,9858	0,9118	14,44	0,9266
25,91	1,3303			
pendiente	0,0498	0,0457		0,0552
ordenada	0,0032	0,0024		0,1347
R ²	0,9909	0,9977		0,9971
C.V.	6,2241	4,4478		2,2398

Se realizó un análisis de varianza para determinar si existe diferencia significativa entre las pendientes de las distintas curvas de calibración.

Ho: No hay diferencia significativa entre las pendientes obtenidas con diferentes concentraciones de M-β-CD.

H1: Si hay diferencia significativa entre las pendientes obtenidas con diferentes concentraciones de M-β-CD.

M-β-CD (mg/ml)	Pendiente			total	promedio
0.0	0,0396	0,0418	0,0421	0,1235	0,0412
3.5	0,0449	0,0454	0,0469	0,1372	0,0457
0.39	0,0500	0,0505	0,0489	0,1494	0,0498
50.0	0,0553	0,0564	0,0540	0,1656	0,0552

Análisis de varianza de un factor ($\alpha = 0.01$)

Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{Calculada}	F _{Tablas} ($\alpha = 0.01$)
Entre tratamientos	3,24E-04	3	1,07E-04	85,1583129	7,59
Error (dentro de tratamientos)	1,0062E-05	8	1,2578E-06		
Total	3,31E-04	11			

Dado que $F_{cal} (85.15) > F_{crit} (7.59)$, existe diferencia significativa entre las distintas curvas de calibración con diferentes cantidades de M-β-CD. Para determinar entre que curvas de calibración se realizó la prueba de intervalos múltiples de Duncan, se encontró que existe diferencias significativa entre todas las curvas de calibración, por lo que la presencia de diferentes concentraciones de M-β-CD, afecta la respuesta analítica del CHL.

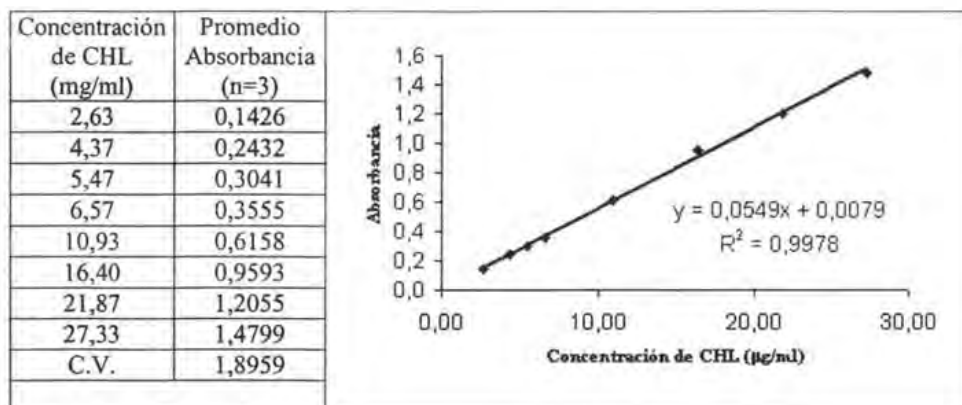
Prueba de intervalos múltiples de Duncan ($\alpha = 0.01$)

Comparaciones	$M_1 - M_2$		Rango mínimo significativo
C4 vs C1	0,0141	>	1,724E-05
C4 vs C2	0,0095	>	1,677E-05
C4 vs C3	0,0054	>	1,590E-05
C3 vs C1	0,0041	>	1,677E-05
C3 vs C2	0,0041	>	1,590E-05
C2 vs C1	0,0046	>	1,590E-05

C1= Curva 1, C2 Curva 2 C3 Curva 3 C4 Curva 4.

M_1 = Media 1, M_2 = Media 2

9.1.2.3 Curva de calibración de CHL en metanol, en contacto con mucosa bucal durante 8 h. Utilizada para la cuantificación de CHL extraído de la mucosa bucal porcina después de las permeaciones.



Nota. El CHL es estable en metanol

9.2 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LA SOLUBILIDAD

	DM- β -CD (mg CHL/mL)	TM- β -CD (mg CHL/mL)	HP- β -CD (mg CHL/mL)
%CD			
2,5	0,1910	3,1944	
5	1,31707	5,8109	0,1006
7,5	2,5654	7,4462	
8,7		8,6592	0,3411
10	3,4828	9,3285	0,4758
12,5	4,7739		0,6054
15			0,7254

Análisis de Varianza

Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{Calculada}	F _{Tablas} ($\alpha = 0.01$)
Entre grupos	108,4473	2	54,2236	17,4407	6,93
Dentro de grupos	37,3083	12	3,1090		
Total	145,7556	14			

9.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ESTABILIDAD DEL CHL CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CICLODEXTRINA.

9.3.1 Análisis estadístico de la k_{obs} obtenido con diferentes concentraciones de DM- β -CD

% DM- β -CD	Pendiente				Totales	Promedio
0,00%	-3,5046	-3,1815	-2,9961	-3,1035	-12,7857	-3,1964
2,50%	-0,1882	-0,1851	-0,1841	-0,1829	-0,7403	-0,1851
5,00%	-0,1834	-0,1771	-0,1782	-0,1716	-0,7102	-0,1776
8,70%	-0,1819	-0,1708	-0,2151	-0,1970	-0,7648	-0,1912
					-15,0010	-0,9376

Análisis de Varianza

Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	$F_{Calculada}$	$F_{Tablas} (\alpha = 0.01)$
Entre tratamientos	27,2137	3	9,0712	749,9787	8,02
Error (dentro de tratamientos)	0,1451	12	0,0121		
Total	27,3588	15			

Prueba de intervalos múltiples de Duncan

Comparaciones	Diferencia de medias		Rasgos mínimos significativos
0,0 % vs 5,0 %	3,0189	>	0,00129
0,0 % vs 2,5 %	3,0114	>	0,00125
0,0 % vs 8,7 %	3,0052	>	0,00119
8,7 % vs 5,0 %	0,0136	>	0,00125
8,7 % vs 2,5 %	0,0061	>	0,00119
2,5 % vs 5,0 %	0,0075	>	0,00119

9.3.2 Análisis estadístico de la k_{obs} obtenido con diferentes concentraciones de HP- β -CD

% HP-b-CD	Pendiente				Totales	Promedio
0,00%	-3,5046	-3,1815	-2,9961	-3,1035	-12,7857	-3,1964
5,00%	-0,2960	-0,2843	-0,2710	-0,2702	-1,1215	-0,2804
8,70%	-0,1873	-0,1831	-0,1827	-0,1844	-0,7375	-0,1844
10,00%	-0,1503	-0,1548	-0,1582	-0,1828	-0,6461	-0,1615
					-15,2908	-0,9557

Análisis de Varianza

Variación	SS	g.l	MS	F _{Calculada}	F _{Tablas} ($\alpha = 0.01$)
Entre tratamientos	26,8105	3	8,9368	739,3373	8,02
Error (dentro de tratamientos)	0,1451	12	0,0121		
Total	26,9555	15			

Prueba de intervalos múltiples de Duncan

Comparaciones	Diferencia de medias		Rasgos mínimos significativos
0,0 % vs 10,0 %	3,0349	>	0,00129
0,0 % vs 8,7 %	3,0121	>	0,00125
0,0 % vs 5,0 %	2,9161	>	0,00119
5,0 % vs 10,0 %	0,1189	>	0,00125
5,0 % vs 8,7 %	0,0960	>	0,00119
8,7 % vs 10,0 %	0,0228	>	0,00119

9.3.3 Análisis estadístico de la k_{obs} obtenido con diferentes concentraciones de TM- β -CD

% TM- β -CD	Pendiente				Totales	Promedio
0,00%	-3,5046	-3,1815	-2,9961	-3,1035	12,7857	-3,1964
0,06%	-1,5856	-1,7127	-1,5694	-1,4770	-6,3446	-1,5861
1,25%	-0,5642	-0,5697	-0,5262	-0,5540	-2,2141	-0,5535
2,50%	-0,2440	-0,2562	-0,2309	-0,2362	-0,9673	-0,2418
5,00%	-0,1207	-0,0967	-0,1170	-0,1128	-0,4473	-0,1118
8,70%	-0,0870	-0,0811	-0,0877	-0,1108	-0,3667	-0,0917
					23,1256	-0,9636

Análisis de Varianza

Variación	SS	g.l	MS	F _{Calculada}	F _{Tablas} ($\alpha = 0.01$)
Entre tratamientos	30,1920	5	6,0384	622,8947	4,25
Error (dentro de tratamientos)	0,1745	18	0,0097		
Total	30,3665	23			

Prueba de intervalos múltiples de Duncan

Comparaciones	Diferencia de medias		Rasgos mínimos significativos
0,0% vs 8,7%	3,1048	>	0,1976
0,0% vs 5,0%	3,0846	>	0,1946
0,0% vs 2,5%	2,9546	>	0,1911
0,0% vs 1,25%	2,6429	>	0,1863
0,0% vs 0,06%	1,6103	>	0,1775
0,06% vs 8,7%	1,4945	>	0,1946
0,06% vs 5,0%	1,4743	>	0,1911
0,06% vs 2,5%	1,3443	>	0,1863
0,06% vs 1,25%	1,0326	>	0,1775
1,25% vs 8,7%	0,4618	>	0,1911
1,25% vs 5,0%	0,4417	>	0,1863
1,25% vs 2,5%	0,3117	>	0,1775
2,5% vs 8,7%	0,1502	<	0,1863
2,5% vs 5,0%	0,1300	<	0,1775
5,0% vs 8,7%	0,0201	<	0,1775

9.4 ANÁLISIS DE VARIANZA DEL EFECTO DE LAS CDS SOBRE LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE LA MUCOSA BUCAL.

9.4.1 Análisis de varianza del efecto de las CDs sobre el desplazamiento del punto de fusión de los lípidos de membrana de la mucosa bucal.

Temperatura de fusión (°C)					
	Control	DM-β-CD	TM-β-CD	HP-β-CD	
1	78.25	79.34	80.4	74.3	
2	78.27	77.82	72.78	74.34	
3	75.76	84.9	76.83	70.27	
4	76.51	78.27	72.29	76.71	
5	75.76	76.21	72.26	70.94	
Totales	384.55	396.54	374.56	366.56	1522.21
Promedio	76.91	79.308	74.912	73.312	76.1105

Análisis de Varianza del efecto de las CDs sobre el desplazamiento del punto de fusión de los lípidos de membrana de la mucosa bucal.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{Calculada}	F _{Tablas} ($\alpha = 0.01$)
Tipo de CD	100.66	3	33.55	4.088	5.29
Error	131.32	16	8.21		
Total	231.98	19			

Conclusión: No hay diferencia significativa.

9.4.2 Análisis de varianza del efecto de las CDs sobre el calor de fusión de los lípidos de membrana de la mucosa bucal.

Calor de fusión					
	control	DM-β-CD	TM-β-CD	HP-β-CD	
1	12.52	4.386	6.759	7.665	
2	12.68	4.259	4.231	6.298	
3	11.61	3.595	4.765	5.417	
4	11.36	3.531	7.353	7.66	
5	11.06	2.762	4.359	5.516	
Totales	59.23	18.533	27.467	32.556	137.786
Promedio	11.846	3.7066	5.4934	6.5112	6.8893

Análisis de Varianza del efecto de las CDs sobre el calor de fusión de los lípidos de membrana de la mucosa bucal.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{Calculada}	F _{Tablas} ($\alpha = 0.01$)
Tipo de CD	183.95	3	61.32	57.32	5.29
Error	17.12	16	1.07		
Total		19			

$F_{Calculada} > F_{Tablas}$, por lo que se realizó la prueba de intervalos múltiples de Duncan para determinar entre que grupos existe diferencia significativa.

Intervalos múltiples de Duncan

Comparaciones	Diferencia de medias		Rango mínimo significativo
Control vs DM- β -CD	8.14	>	2.058
Control vs TM- β -CD	6.353	>	2.007
Control vs HP- β -CD	5.335	>	1.91
HP- β -CD vs DM- β -CD	2.805	>	2.007
HP- β -CD vs TM- β -CD	1.018	<	1.91
TM- β -CD vs DM- β -CD	1.787	<	1.91

9.4.3 Análisis de varianza del efecto de las CDs sobre el número de onda (cm^{-1}) simétrico

No. de onda(cm^{-1}) simétrico					
	control	DM- β -CD	TM- β -CD	HP- β -CD	
1	2852.5	2852.5	2855.9	2855.4	
2	2853.5	2851.6	2855.9	2855.4	
3	2853.5	2852	2855.9	2854.9	
4	2852.5	2851.6	2856.4	2855.4	
5	2855.4	2852.5	2855.9	2854.5	
6	2855.4	2851.6	2855.4	2854.9	
Totales	17122.8	17111.8	17135.4	17130.5	68500.5
Promedio	2853.8	2851.96667	2855.9	2855.08333	2854.1875

Análisis de Varianza para los datos de No. de onda de la región simétrica

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	$F_{Calculada}$	$F_{Tablas} (\alpha = 0.01)$
Tipo de CD	52.90	3	17.63	32.47	4.94
Error	10.86	20	0.54		
Total	63.77	23			

$F_{Calculada} > F_{Tablas}$, por lo que se realizó la prueba de intervalos múltiples de Duncan para determinar entre que grupos existe diferencia significativa.

Intervalos múltiples de Duncan

Comparaciones	Diferencia de medias		Rango mínimo significativo
TM- β -CD vs DM- β -CD	3.93	>	1.302
TM- β -CD vs Control	2.1	>	1.27
TM- β -CD vs HP- β -CD	0.82	<	1.21
HP- β -CD vs DM- β -CD	3.12	>	1.27
HP- β -CD vs Control	1.282	>	1.21
Control vs DM- β -CD	1.832	>	1.21

9.4.4 Análisis de varianza del efecto de las CDs sobre el número de onda (cm^{-1}) asimétrico

No. de onda(cm^{-1}) Asimétrico					
	control	DM- β -CD	TM- β -CD	HP- β -CD	
1	2922	2923.9	2928.2	2925.8	
2	2923.4	2923.9	2928.7	2925.8	
3	2922.9	2923.9	2928.2	2926.8	
4	2921.5	2923.9	2927.7	2926.3	
5	2926.3	2924.4	2928.2	2923.4	
6	2926.3	2924.8	2928.7	2925.3	
Totales	17542.4	17544.8	17569.7	17553.4	70210.3
Promedio	2923.73333	2924.13333	2928.28333	2925.56667	2925.42917

Análisis de Varianza para los datos de No. de onda de la región asimétrica

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{Calculada}	F _{Tablas} ($\alpha = 0.01$)
Tipo de CD	76.32	3	25.447	16.77	4.94
Error	30.35	20	1.52		
Total	106.67	23			

$F_{Calculada} > F_{Tablas}$, por lo que se realizó la prueba de intervalos múltiples de Duncan para determinar entre que grupos existe diferencia significativa.

Intervalos múltiples de Duncan

Comparaciones	Diferencia de medias		Rango mínimo significativo
TM- β -CD vs Control	4.55	>	2.18
TM- β -CD vs DM- β -CD	4.15	>	2.12
TM- β -CD vs HP- β -CD	2.72	>	2.02
HP- β -CD vs Control	1.83	<	2.12
HP- β -CD vs DM- β -CD	1.43	<	2.02
DM- β -CD vs Control	0.4	<	2.02

9.4.5 Análisis de varianza del efecto de las CDs sobre el área de la región simétrica

Área REGIÓN SIMÉTRICA					
	Control	DM- β -CD	TM- β -CD	HP- β -CD	
1	3.593	0.268	0.406	2.41	
2	3.214	0.305	0.559	3.265	
3	2.372	0.304	0.643	1.76	
4	2.852	0.352	0.478	2.53	
5	2.517	0.268	0.378	2.081	
6	3.156	0.356	0.485	2.186	
Totales	17.704	1.853	2.949	14.232	36.738
Promedio	2.95066667	0.30883333	0.4915	2.372	1.53075

Análisis de Varianza para los datos del área de la región simétrica

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	$F_{Calculada}$	$F_{Tablas} (\alpha= 0.01)$
Tipo de CD	31.78	3	10.59	87.20	4.94
Error	2.43	20	0.12		
Total	34.21	23			

$F_{Calculada} > F_{Tablas}$, por lo que se realizó la prueba de intervalos múltiples de Duncan para determinar entre que grupos existe diferencia significativa.

Intervalos múltiples de Duncan

Comparaciones	Diferencia de medias		Rango mínimo significativo
Control vs DM- β -CD	2.64	>	0.62
Control vs TM- β -CD	2.46	>	0.60
Control vs HP- β -CD	0.58	>	0.57
HP- β -CD vs DM- β -CD	2.06	>	0.60
HP- β -CD vs TM- β -CD	1.88	>	0.57
TM- β -CD vs DM- β -CD	0.18	<	0.57

9.4.6 Análisis de varianza del efecto de las CDs sobre el área de la región asimétrica

Área de la región asimétrica (2920 cm ¹)					
	control	DM- β -CD	TM- β -CD	HP- β -CD	
1	4.344	0.413	0.819	2.992	
2	4.446	0.393	0.743	3.971	
3	4.017	0.347	1.31	3.887	
4	4.124	0.377	1.004	3.939	
5	5.427	0.357	1.275	3.362	
6	5.651	0.474	0.967	3.727	
Totales	28.009	2.361	6.118	21.878	58.366
Promedio	4.66816667	0.3935	1.01966667	3.64633333	2.43191667

Análisis de Varianza para los datos del área de la región asimétrica

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	$F_{\text{Calculada}}$	$F_{\text{Tablas}} (\alpha = 0.01)$
Tipo de CD	75.75	3	25.25	145.92	4.94
Error	3.46	20	0.17		
Total	79.21	23			

$F_{\text{Calculada}} > F_{\text{Tablas}}$, por lo que se realizó la prueba de intervalos múltiples de Duncan para determinar entre que grupos existe diferencia significativa.

Intervalos múltiples de Duncan

Comparaciones	Diferencia de medias		Rango mínimo significativo
Control vs DM- β -CD	4.27	>	0.74
Control vs TM- β -CD	3.65	>	0.72
Control vs HP- β -CD	1.02	>	0.68
HP- β -CD vs DM- β -CD	3.25	>	0.72
HP- β -CD vs TM- β -CD	2.63	>	0.68
TM- β -CD vs DM- β -CD	0.63	<	0.68

9.5 PERMEACIONES

9.5.1 Resultados numéricos de las permeaciones realizadas

9.5.1.1 Permeaciones realizadas con CHL

Q acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Promedio	D. E.	% Error (c.v.)
0.25	0	0	0	0	0	0	0
0.5	9.7223	7.3633	7.2547	0.0000	6.0851	4.2135	69.2423
0.75	27.9464	14.1432	14.7321	8.1705	16.2480	8.3432	51.3489
1	23.4630	21.4670	43.7675	29.5658	29.5658	10.0751	34.0768
1.5	82.0799	77.0943	98.0678	64.6313	80.4683	13.8388	17.1978
2	127.7271	148.2192	162.8670	105.8223	136.1589	24.8340	18.2390
3	264.4683	300.5499	295.4213	264.4133	281.2132	19.4800	6.9271
4	312.1071	420.9734	404.5010	387.3852	381.2417	48.0865	12.6131
5	558.0221	651.6713	573.5961	549.5037	583.1983	46.7259	8.0120
6	741.3318	766.2295	642.3072	737.8919	721.9401	54.5694	7.5587
7	755.0078	894.9418	719.9159	890.4869	815.0881	90.7910	11.1388
8	950.5594	1242.7335	987.7933	1255.3292	1109.1038	162.3693	14.6397

Intervalo de tiempo utilizado para la regresión 1 –7 horas.

r^2	0.9721	0.9949	0.9906	0.992
b	-127.33	-145.17	-66.458	-163.05
m ($\mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{h}$)	131.62	150.59	117.7	146.92

Área promedio de la celda 0.8244 cm^2

Flujo

$$J = 136.7075 \pm 15.1017 \mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{h}$$

Todas las permeaciones se realizaron por sextuplicado y se eligieron aquellas celdas que presentaban un comportamiento parecido.

9.5.1.2 Permeaciones realizadas con el complejo CHL: DM- β -CD obtenido por el método de coprecipitación.

Q acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Promedio	D.E	% error (c.v)
0.5	10.8094	39.6343	39.6343	32.6757	30.6884	13.6526	41.7823
1	126.1092	125.8690	252.1583	207.8866	178.0058	62.7242	30.1723
1.5	234.0226	127.7306	413.0676	340.5449	278.8414	124.7226	36.6244
2	373.2231	377.1865	448.2280	369.5322	392.0425	37.5872	10.1716
3	581.2732	631.7169	750.4097	618.6595	645.5148	73.1243	11.8198
4	705.5808	659.6411	827.4263	682.1543	718.7006	74.8712	10.9757
5	1077.7230	1019.0222	1368.2545	1128.0287	1148.2571	153.2805	13.5884
6	1451.2464	1386.3602	1917.3399	1580.7106	1583.9143	236.5102	14.9623
7	1712.2624	1669.5053	2044.4099	1685.4708	1777.9121	178.5389	10.5928
8	2155.1758	1788.0780	2272.3372	1873.3807	2022.2429	228.9188	12.2196

Intervalo de tiempo utilizado para la regresión 1 –8 horas (quitando el valor de la hora 4).

r^2	0.9913	0.9916	0.9904	0.9904
b	-184.53	-136.71	-98.224	-80.979
m ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	275.96	246.93	305.58	251.93

Área promedio de la celda 0.8244 cm^2

Flujo

$$J = 270.1 \pm 26.8338 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$$

9.5.1.3 Permeaciones realizadas con el complejo CHL: DM- β -CD obtenido por el método de liofilización.

Q acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Promedio	D.E	% error (c.v)
0.25	22.0804	24.3326	6.5851	17.6661	9.6622	54.6936178
0.5	35.9206	48.9787	18.9762	34.6252	15.0432	43.4457129
0.75	56.9031	77.2149	42.2911	58.8030	17.5393	29.827151
1	82.4192	115.4258	57.3945	85.0798	29.1070	34.2114192
1.5	152.6854	222.1056	88.2677	154.3529	66.9345	43.3645932
2	174.1712	267.4411	183.7699	208.4607	51.3035	24.6106281
3	421.6295	646.9483	300.3987	456.3255	175.8608	38.5384512
4	552.5742	683.6724	459.7190	565.3219	112.5196	19.9036341
5	726.9204	783.8230	636.4658	715.7364	74.3125	10.3826597
6	925.0880	1030.2008	762.7799	906.0229	134.7260	14.8700463
7	1111.1043	1189.5248	862.6196	1054.4162	170.6661	16.1858347
8	1303.5029	1368.5953	1044.4048	1238.8343	171.4975	13.8434558

Intervalo de tiempo utilizado para la regresión 1 –8 horas (quitando el valor de la hora 4).

r^2	0.9929	0.9976	0.9944
b	-82.362	-48.903	-72.248
m ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	168.03	176.37	136.68

Área promedio de la celda 0.8244 cm^2

Flujo

$$J = 160.36 \pm 20.927 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$$

9.5.1.4 Permeaciones realizadas con el complejo CHL: TM- β -CD obtenido por el método de coprecipitación.

Q acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Promedio	D.E	% error (c.v)
0.5		10.7309	11.5380	3.6389	8.6360	4.3464	50.3287
0.75	37.1692	33.4071	29.8771	13.5325	28.4965	10.4109	36.5339
1	101.3890	58.2812	33.2982	50.3481	60.8292	28.9793	47.6405
2	259.6506	171.0815	111.5004	122.9457	166.2946	67.3790	40.5178
3	408.1810	277.0201	214.8893	239.4064	284.8742	86.0842	30.2183
4	498.0017	348.3249	283.2730	312.9716	360.6429	95.3552	26.4403
5	589.0008	426.8326	342.6470	385.4942	435.9937	107.6397	24.6884
6	659.9075	488.8384	448.1017	447.9428	511.1976	100.9898	19.7555
7	720.1385	535.1102	514.8070	571.3153	585.3428	92.8534	15.8631
8	800.9155	612.1144	614.2981	655.5589	670.7218	89.0670	13.2793

Intervalo de tiempo utilizado para la regresión 1-8 horas.

r^2	0.9694	0.9831	0.9969	0.9949
b	73.65	21.257	-46.213	-36.205
m ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$)	95.777	76.321	81.459	85.434

Área promedio de la celda 0.8244 cm^2

Flujo

$$J = 84.7478 \pm 8.2450 \mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$$

9.5.1.5 Permeaciones realizadas con el complejo CHL: TM- β -CD obtenido por el método de liofilización.

Q acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Promedio	D. E.	% Error (c.v.)
0.25	11.7513	17.7528	11.5658	22.6845	15.9386	5.3371	33.4853
0.5	15.3431	23.1154	20.0712	23.6811	20.5527	3.8178	18.5756
0.75	20.3450	35.2185	24.0531	25.7362	26.3382	6.3341	24.0490
1	21.6434	37.7902	25.8034	29.9194	28.7891	6.8865	23.9206
1.5	29.0521	47.7073	31.1012	32.2941	35.0387	8.5512	24.4050
2	45.4834	67.6328	44.0382	38.5829	48.9343	12.8149	26.1880
3	71.4833	92.2379	80.2349	65.7984	77.4386	11.5152	14.8701
4	97.1895	115.5241	108.3611	117.3183	109.5982	9.1328	8.3330
5	160.3215	188.0160	162.1332	162.9739	168.3612	13.1499	7.8105
6	192.5724	204.5676	189.8627	185.5236	193.1316	8.1581	4.2241
7	226.9408	261.1403	248.8046	244.3012	245.2967	14.1569	5.7713
8	260.3671	301.2327	352.7584	286.0886	300.1117	38.9411	12.9755

Intervalo de tiempo utilizado para la regresión 1.5 - 7 horas.

r^2	0.9855	0.9755	0.989	0.9859
b	-32.983	-16.118	-34.812	-37.716
m ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	36.98	38.233	38.885	38.976

Área promedio de la celda 0.8244 cm^2

Flujo

$$J = 38.2685 \pm 0.9205 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$$

9.5.1.6 Permeaciones realizadas con el complejo CHL: HP- β -CD obtenido por el método de coprecipitación.

Q acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Promedio	D.E	% error (c.v)
0.75	10.63827	8.41137	12.47788	11.42495	10.7381	1.7245	16.0601
1	20.20344	19.95735	23.71053	24.90466	22.1940	2.4908	11.2229
1.5	38.350759	36.090244	41.045627	52.763728	42.0626	7.4161	17.6311
2	54.132677	46.705655	53.920208	67.855792	55.6536	8.8370	15.8786
3	63.802733	71.692347	63.025471	87.764729	71.5713	11.4837	16.0451
4	96.777205	109.195917	93.447618	107.673667	101.7736	7.8355	7.6990
5	123.645194	160.554387	123.522822	127.855588	133.8945	17.8870	13.3591
6	157.726390	207.549163	176.434472	148.505480	172.5539	26.0634	15.1045
7	181.314548	244.280850	209.364567	166.855859	200.4540	34.1338	17.0282
8	242.836595	315.991475	272.274390	185.118830	254.0553	54.9124	21.6144

Intervalo de tiempo utilizado para la regresión 1-7 horas.

r^2	0.9911	0.9863	0.9687	0.982
b	-5.4547	-28.286	-12.672	16.448
m ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	26.427	38.045	30.029	22.122

Área promedio de la celda 0.8244 cm^2

Flujo

$J = 29.1558 \pm 6.7503 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$

9.5.1.7 Permeaciones realizadas con el complejo CHL: HP- β -CD obtenido por el método de liofilización.

Q acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Promedio	D.E	% error (c.v)
0.5	21.8396	16.2223	14.7253	17.5957	3.7508	21.3163
0.75	48.0026	29.9554	29.6227	35.8602	10.5169	29.3275
1	73.5841	49.1703	42.5196	55.0913	16.3568	29.6902
1.5	104.7460	68.1821	56.5957	76.5079	25.1317	32.8485
2	132.3486	89.7258	70.5216	97.5320	31.6441	32.4448
3	167.1730	126.3446	91.2041	128.2406	38.0199	29.6474
4	206.5696	162.2348	122.2086	163.6710	42.1988	25.7827
5	248.4937	200.3639	165.9786	204.9454	41.4479	20.2239
6	299.9462	244.8552	211.5018	252.1011	44.6652	17.7172
7	357.8993	284.2076	263.0147	301.7072	49.8041	16.5074
8	413.0187	317.5143	313.3735	347.9688	56.3729	16.2005

Intervalo de tiempo utilizado para la regresión horas.

r^2	0.9921	0.9982	0.9836
b	17.913	4.9797	-6.3216
m ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	48.428	39.587	37.44

Área promedio de la celda 0.8244 cm^2

Flujo

$$J = 41.8183 \pm 5.823931 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$$

9.5.1.8 Permeaciones realizadas DM-β-CD como pretratamiento.

Q acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Promedio	D.E
0.25	75.0704927	77.0842431	4.60340517	52.2527137	41.2777936
0.5	137.413751	115.687084	7.66138147	86.9207388	69.4949374
0.75	222.752115	162.859565	9.87540014	131.829027	109.778389
1	340.599287	223.719504	23.1704727	195.829755	160.541713
2	444.912448	306.808775	156.977334	302.899519	144.007358
3	555.275799	350.251767	288.213352	397.91364	139.765261
4	863.9385	573.668173	475.268703	637.625125	202.07405
5	981.183577	706.523908	689.94083	792.549438	163.572242
6	1086.69362	848.497307	792.755693	909.315541	156.121811
7	1197.84613	952.873309	938.228777	1029.6494	145.84656
8	1315.81898	1112.59832	1046.44168	1158.28633	140.380121

Intervalo de tiempo utilizado para la regresión horas.

r^2	0.9803	0.9916	0.9912
b	111.05	48.348	-90.318
m ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	160	130.63	144.71

Área promedio de la celda 0.8244 cm^2

Flujo

$$J = 145.1133 \pm 14.6892 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$$

9.5.1.9 Permeaciones realizadas TM- β -CD como pretratamiento.

Q acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Promedio	D.E
0.25	68.9338536	83.1572901	1.64407328	8.62590445	40.5902804	41.4481075
0.5	111.798132	121.70752	9.93020259	13.1635467	64.1498504	60.8895653
0.75	150.487195	144.110759	15.6954195	16.5284167	81.7054475	75.7863682
1	217.419245	180.714406	128.477226	127.198905	163.452446	43.7720454
2	298.795757	228.659967	164.462709	191.133261	220.762924	58.3069962
3	466.649062	316.585006	274.185606	413.779144	367.799705	88.0754397
4	715.088263	385.959315	446.847033	578.961013	531.713906	146.40723
5	848.550478	532.692823	510.50539	737.446023	657.298679	163.376596
6	930.888591	625.301864	607.794703	943.355241	776.8351	185.291134
7	1038.51182	714.085109	767.72225	1168.28091	922.150021	216.994181
8	1129.39619	909.282641	863.481378	1274.11166	1044.06797	192.336169

Intervalo de tiempo utilizado para la regresión horas.

r^2	0.9858	0.9832	0.992	0.9936
b	55.653	51.661	-37.863	-84.413
m ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	143.05	97.973	112.19	170.7

Área promedio de la celda 0.8244 cm^2

Flujo

$$J = 130.9782 \pm 32.4853 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$$

9.5.1.10 Permeaciones realizadas HP- β -CD como pretratamiento.

Q acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Promedio	D.E
0.25	81.7052702	7.94635417	0.98644397	67.0260901	39.4160396	40.8977132
0.5	114.205311	10.5013658	2.01672989	100.788779	56.8780463	58.8079592
0.75	147.72833	13.2317453	3.34782032	122.413092	71.6802469	74.0330566
1	183.360148	25.1786778	8.90478799	139.659055	89.2756672	85.5536431
2	274.909455	117.716864	85.7598635	185.352601	165.934696	83.6769903
3	303.871449	212.494644	175.249574	199.662615	222.819571	56.1995265
4	416.979307	253.896063	232.698868	207.070444	277.66117	94.831399
5	432.850825	344.276251	324.536801	238.391081	335.013739	79.7989009
6	474.743061	460.391666	445.831819	321.251091	425.554409	70.5301674
7	508.885619	593.775331	518.066918	345.918839	491.661677	104.342504
8	612.82694	644.133295	553.699945	470.799466	570.364912	76.2360312

Intervalo de tiempo utilizado para la regresión horas.

r^2	0.9717	0.9902	0.9925	0.9698
b	133.4	-66.086	-69.151	94.44
m				35.724
($\square\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$)	58.656	88.704	80.829	

Área promedio de la celda 0.8244 cm^2

Flujo

$$J = 65.9807 \pm 23.8421 \mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$$

9.5.2 Análisis estadístico de los estudios de permeación in vitro del clorambucilo y de sus complejos de inclusión.

9.5.2.1 Comparación estadística de la cantidad de principio activo acumulado en el compartimento receptor a las 8 horas durante las permeaciones realizadas con CHL y sus complejos de inclusión con ciclodextrinas obtenidos por co-precipitación.

Muestras	CHL	CHL-DM-β-CD	CHL-TM-β-CD	CHL-HP-β-CD	suma
celda 1	950,5594	2155,1758	800,9155	242,8365	4149,4872
celda 2	1242,7335	1788,078	612,1144	315,9914	3958,9173
celda 3	987,7933	2272,3372	614,2981	272,2743	4146,7029
celda 4	1255,3292	1873,3807	655,5589	185,1188	3969,3876
Totales	4436,4154	8088,9717	2682,8869	1016,221	16224,495

Análisis de Varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{Calculada}	F _{Tablas} (α = 0.01)
Tipo de CD	6883818,13	3	2294606,04	102,30544	5,95
Error	269147,688	12	22428,974		
Total	7152965,81	15			

Ho: No hay diferencia significativa entre las cantidades de CHL acumulada en el compartimento receptor a las 8 Hs., durante las permeaciones.

H1: Si hay diferencia significativa entre las cantidades de CHL acumulada en el compartimento receptor a las 8 Hs., durante las permeaciones.

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{crítica}$ no se rechaza Ho

Si $F_{cal} > F_{crítica}$ se rechaza Ho

Dado que $102.30 > 5.95$ se rechaza Ho y por lo tanto si hay diferencia significativa entre las cantidades de CHL acumulado en el compartimento receptor a las 8Hs., durante las permeaciones de CHL y sus complejos de inclusión obtenidos por co-precipitación.

Prueba de Duncan

Cantidad acumulada de CHL a las 8hs.

	CHL	CHL-DM- β -CD	CHL-TM- β -CD	CHL-HP- β -CD
Promedio	1109,1038	2022,2429	670,7218	254,05525
D.E.	162,3638	228,9188	89,067	54,9124

Comparaciones	Diferencia de medias		Rango mínimo significativo	Diferencia significativa
CHL-DM- β -CD vs CHL-HP- β -CD	1768,18765	>	350,445559	Si
CHL-DM- β -CD vs CHL-TM- β -CD	1351,5211	>	340,71096	Si
CHL-DM- β -CD vs CHL	913,1391	>	323,488208	Si
CHL vs CHL-HP- β -CD	855,04855	>	340,71096	Si
CHL vs CHL-TM- β -CD	438,382	>	323,488208	Si
CHL-TM- β -CD vs CHL-HP- β -CD	416,66655	>	323,488208	Si

9.5.2.2 Comparación estadística de la cantidad de principio activo acumulado en el compartimento receptor a las 8 horas durante las permeaciones realizadas con CHL y sus complejos de inclusión con ciclodextrinas obtenidos por liofilización.

Muestras	CHL	CHL-DM- β -CD	CHL-TM- β -CD	CHL-HP- β -CD	suma
celda 1	950,5594	1303,5029	260,3671	413,0187	2927,4481
celda 2	1242,7335	1368,5953	301,2327	317,5143	3230,0758
celda 3	987,7933	1044,4048	352,7584	313,3735	2698,33
celda 4	1255,3292		286,0886	347,9688	1889,3866
Totales	4436,4154	3716,503	1200,4468	1391,8753	10745,2405

Análisis de Varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{Calculada}	F _{Tablas} ($\alpha = 0.01$)
Tipo de CD	2671828,03	3	890609,344	65,8295989	6.22
Error	148819,117	11	13529,0106		
Total	2820647,15	14			

Ho: No hay diferencia significativa entre las cantidades de CHL acumulada en el compartimento receptor a las 8 Hs., durante las permeaciones.

H1: Si hay diferencia significativa entre las cantidades de CHL acumulada en el compartimento receptor a las 8 Hs., durante las permeaciones.

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{critica}$ no se rechaza H_0

Si $F_{cal} > F_{critica}$ se rechaza H_0

Dado que $65.829 > 6.22$ se rechaza H_0 y por lo tanto si hay diferencia significativa entre las cantidades de CHL acumulado en el compartimento receptor a las 8Hs., durante las permeaciones de CHL y sus complejos de inclusión obtenidos por liofilización.

Prueba de Duncan

Cantidad acumulada de CHL a las 8hs.

	CHL	CHL-DM- β -CD	CHL-TM- β -CD	CHL-HP- β -CD
Promedio	1109,1038	1238,8343	300,1117	347,9688
D.E.	162,3638	171,4975	38,9411	56,3729

Comparaciones

Comparaciones	Diferencia de medias		Rango mínimo significativo	Diferencia significativa
CHL-DM- β -CD vs CHL-TM- β -CD	938,7226	>	288,737011	Si
CHL-DM- β -CD vs CHL-HP- β -CD	890,8655	>	280,262549	Si
CHL-DM- β -CD vs CHL	129,7305	<	265,734901	No
CHL vs CHL-TM- β -CD	808,9921	>	280,262549	Si
CHL vs CHL-HP- β -CD	761,135	>	265,734901	Si
CHL-HP- β -CD vs CHL-TM- β -CD	47,8571	<	265,734901	No

9.5.2.3 Comparación estadística de la cantidad de principio activo acumulado en el compartimento receptor a las 8 horas durante las permeaciones realizadas con CHL y las permeaciones realizadas utilizando las CDs como pretratamiento.

Muestras	CHL	DM- β -CD	TM- β -CD	HP- β -CD	suma
celda 1	950,5594	1315,8189	1129,3961	612,82694	4008,60134
celda 2	1242,7335	1112,5983	909,2826	644,1332	3908,7476
celda 3	987,7933	1046,4416	863,4813	553,6999	3451,4161
celda 4	1255,3292		1274,1166	470,7994	3000,2452
Totales	4436,4154	3474,8588	4176,2766	2281,45944	14369,0102

Análisis de Varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	$F_{Calculada}$	$F_{Tablas} (\alpha = 0.01)$
Tipo de CD	842348,796	3	280782,932	12,508444	6.22
Error	246922,18	11	22447,4709		
Total	1089270,98	14			

H_0 : No hay diferencia significativa entre las cantidades de CHL acumulada en el compartimento receptor a las 8 Hs., durante las permeaciones.

H_1 : Si hay diferencia significativa entre las cantidades de CHL acumulada en el compartimento receptor a las 8 Hs., durante las permeaciones.

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{critica}$ no se rechaza H_0

Si $F_{cal} > F_{critica}$ se rechaza H_0

Dado que $12.508 > 6.22$ se rechaza H_0 y por lo tanto si hay diferencia significativa entre las cantidades de CHL acumulado en el compartimento receptor a las 8Hs., durante las permeaciones de CHL y las permeaciones realizadas utilizando las CDs como pretratamiento.

Prueba de Duncan

Cantidad acumulada de CHL a las 8hs.

	CHL	DM- β -CD	TM- β -CD	HP- β -CD
Promedio	1109,1038	1158,2863	1044,0679	570,3649
D.E.	162,3638	140,3801	192,3361	76,236

Comparaciones	Diferencia de medias		Rango mínimo significativo	Diferencia significativa
DM- β -CD vs HP- β -CD	587,9214	>	371,923093	Si
DM- β -CD vs TM- β -CD	114,2184	<	361,007112	No
DM- β -CD vs CHL	49,1825	<	342,294	No
CHL vs HP- β -CD	538,7389	>	361,007112	Si
CHL vs TM- β -CD	65,0359	<	342,294	No
TM- β -CD vs HP- β -CD	473,703	>	342,294	Si

9.5.2.4 Comparación estadística de la cantidad de principio activo acumulado en el compartimento receptor a las 8 horas durante las permeaciones realizadas con CHL y sus complejos de inclusión con DM- β -CD

Muestras	CHL	Co-precipitación	Liofilización	Pretratamiento	Suma
celda 1	950,5594	2155,1758	1303,5029	1315,8189	5725,057
celda 2	1242,7335	1788,078	1368,5953	1112,5983	5512,0051
celda 3	987,7933	2272,3372	1044,4048	1046,4416	5350,9769
celda 4	1255,3292	1873,3807			3128,7099
Totales	4436,4154	8088,9717	3716,503	3474,8588	19716,7489

Análisis de Varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F _{Calculada}	F _{Tablas} ($\alpha = 0.01$)
Tipo de CD	2139453,421	3	713151,14	21,3174467	6.55
Error	334538,724	10	33453,8724		
Total	2473992,145	13			

Ho: No hay diferencia significativa entre las cantidades de CHL acumulada en el compartimento receptor a las 8 Hs., durante las permeaciones.

H1: Si hay diferencia significativa entre las cantidades de CHL acumulada en el compartimento receptor a las 8 Hs., durante las permeaciones.

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{crítica}$ no se rechaza Ho

Si $F_{cal} > F_{crítica}$ se rechaza Ho

Dado que $21.317 > 6.55$ se rechaza Ho y por lo tanto si hay diferencia significativa entre las cantidades de CHL acumulado en el compartimento receptor a las 8Hs., durante las permeaciones de CHL y sus complejos de inclusión con DM- β -CD.

Prueba de Duncan

Cantidad acumulada de CHL a las 8hs.

	CHL	Co-precipitación	Liofilización	Pretratamiento
Promedio	1109,1038	2022,2429	1238,8343	1158,2863
D.E.	162,3638	228,9188	171,4975	140,3801

Comparaciones	Diferencia de medias		Rango mínimo significativo	Diferencia significativa
CP vs CHL	913,1391	>	482,043709	Si
CP vs Pre-tratamiento	863,9566	>	467,226792	Si
CP vs Lio	783,4086	>	442,531929	Si
Lio vs CHL	129,7305	<	467,226792	No
Lio vs Pre-tratamiento	80,548	<	442,531929	No
Pre-tratamiento vs CHL	49,1825	<	442,531929	No

9.5.2.5 Comparación estadística de la cantidad de principio activo acumulado en el compartimento receptor a las 8 horas durante las permeaciones realizadas con CHL y sus complejos de inclusión con TM- β -CD

Muestras	CHL	Co-precipitación	Liofilización	Pretratamiento	Suma
celda 1	950,5594	800,9155	260,3671	1129,3961	3141,2381
celda 2	1242,7335	612,1144	301,2327	909,2826	3065,3632
celda 3	987,7933	614,2981	352,7584	863,4813	2818,3311
celda 4	1255,3292	655,5589	286,0886	1274,1166	3471,0933
Totales	4436,4154	2682,8869	1200,4468	4176,2766	12496,0257

Análisis de Varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F _{Calculada}	F _{Tablas} ($\alpha = 0.01$)
Tipo de CD	1681089,48	3	560363,159	30,7861936	5,95
Error	218421,218	12	18201,7682		
Total	1899510,69	15			

Ho: No hay diferencia significativa entre las cantidades de CHL acumulada en el compartimento receptor a las 8 Hs., durante las permeaciones.

H1: Si hay diferencia significativa entre las cantidades de CHL acumulada en el compartimento receptor a las 8 Hs., durante las permeaciones.

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{crítica}$ no se rechaza H_0

Si $F_{cal} > F_{crítica}$ se rechaza H_0

Dado que $30.786 > 5.95$ se rechaza H_0 y por lo tanto si hay diferencia significativa entre las cantidades de CHL acumulado en el compartimento receptor a las 8Hs., durante las permeaciones de CHL y sus complejos de inclusión con TM- β -CD.

Prueba de Duncan

Cantidad acumulada de CHL a las 8hs.

	CHL	Co-precipitación	Liofilización	Pretratamiento
Promedio	1109,1038	670,7218	300,1117	570,3649
D.E.	162,3638	89,067	38,9411	76,236

Comparaciones	Diferencia de medias		Rango mínimo significativo	Diferencia significativa
CHL vs Lio	808,9921	>	315,698593	Sí
CHL vs Pre-tratamiento	538,7389	>	306,929188	Si
CHL vs CP	438,382	>	291,414086	Si
CP vs Lio	370,6101	>	306,929188	Si
CP vs Pre-tratamiento	100,3569	<	291,414086	No
Pre-tratamiento vs Lio	270,2532	<	291,414086	No

9.5.2.6 Comparación estadística de la cantidad de principio activo acumulado en el compartimento receptor a las 8 horas durante las permeaciones realizadas con CHL y sus complejos de inclusión con HP- β -CD

Muestras	CHL	Co-precipitación	Liofilización	Pretratamiento	suma
celda 1	950,5594	242,8365	413,0187	612,82694	2219,24154
celda 2	1242,7335	315,9914	317,5143	644,1332	2520,3724
celda 3	987,7933	272,2743	313,3735	553,6999	2127,141
celda 4	1255,3292	185,1188	347,9688	470,7994	2259,2162
Totales	4436,4154	1016,221	1391,8753	2281,45944	9125,97114

Análisis de Varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F _{Calculada}	F _{Tablas} ($\alpha = 0.01$)
Tipo de CD	1759005,86	3	586335,286	62,8614638	5,95
Error	111929,042	12	9327,42019		
Total	1870934,9	15			

Ho: No hay diferencia significativa entre las cantidades de CHL acumulada en el compartimento receptor a las 8 Hs., durante las permeaciones.

H1: Si hay diferencia significativa entre las cantidades de CHL acumulada en el compartimento receptor a las 8 Hs., durante las permeaciones.

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{crítica}$ no se rechaza Ho

Si $F_{cal} > F_{crítica}$ se rechaza Ho

Dado que $62.8614 > 5.95$ se rechaza Ho y por lo tanto si hay diferencia significativa entre las cantidades de CHL acumulado en el compartimento receptor a las 8Hs., durante las permeaciones de CHL y sus complejos de inclusión con HP- β -CD.

Prueba de Duncan

Cantidad acumulada de CHL a las 8hs.

	CHL	Co-precipitación	Liofilización	Pretratamiento
Promedio	1109,1038	254,05525	347,9688	570,3649
D.E.	162,3638	54,9124	56,3729	76,236

Comparaciones	Diferencia de medias		Rango mínimo significativo	Diferencia significativa
CHL vs CP	855,04855	>	225,993854	Si
CHL vs Lio	761,135	>	219,716247	Si
CHL vs Pre-tratamiento	538,7389	>	208,609711	Si
Pre-tratamiento vs CP	316,30965	>	219,716247	Si
Pre-tratamiento vs Lio	222,3961	>	208,609711	Si
Lio vs CP	93,91355	<	208,609711	No