

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**FORMACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN
DIFENHIDRAMINA- β - CICLODEXTRINA.**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

SALVADOR CHÁVEZ FLORES

ASESORA DE TESIS: MAESTRA BEATRIZ ESPINOSA FRANCO

MÉXICO D.F. A 17 DE ENERO DE 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

AGRADECIMIENTOS:

Quiero agradecer primeramente a DIOS por permitirme finalizar este proyecto y además por darme a una gran familia que en todo momento me ha apoyado.

Quiero agradecer a mi ESPOSA PATY que desde que está a mi lado en cada segundo de mi vida me ha dado su AMOR INCONDIONAL, FUERZA, TERNURA, COMPRENSIÓN, APOYO, PACIENCIA, GRANDES CONSEJOS y sobre todo que la FELICIDAD que me hacer sentir siempre, ha sido mi principal motor para finalizar este proyecto.

Quiero agradecer a mis HIJOS ALEXIS Y LESLIE que con su GRAN AMOR me proporciona la FUERZA para seguir día a día adelante.

Quiero agradecer a mi MADRE que con todo el AMOR que me entrego desde mi niñez logró hacer de mí un hombre con ilusiones, responsabilidad, metas, que ama a DIOS, a la VIDA, a MI FAMILIA y que me enseñó con su gran EJEMPLO que debes agradecer por todo lo que tenemos y lo que logramos.

Quiero agradecer a mi PADRE que físicamente ya no está, pero que todos los días pienso en él como un gran ejemplo ya que en su forma y en sus limitaciones me enseñó a trabajar y esforzarme siempre como lo hizo él hasta el último día.

Quiero agradecer a mis HERMANOS que siempre me dieron su APOYO y CUIDADOS, que hicieron todo lo posible para que yo lograra estudiar y alcanzar mis metas y que aún hasta en estos momentos de mi vida lo siguen haciendo.

Quiero agradecer a la Doctora Beatriz Espinoza Franco por el gran APOYO, PACIENCIA y COMPRESIÓN que me brinda todas las veces que me acerque a ella, muchas gracias por todo.

Quiero agradecer a todos los profesores que en algún momento aportaron su granito de arena para la formación educativa de mi persona.

Al comité de profesores que formaron parte de la revisión de este trabajo.

Al personal del CINVESTAV TEPEPAN que también en su momento formaron parte de este proyecto y que me apoyaron siempre.

Al personal de PERKIN ELMER que me permitieron usar sus equipos para desarrollar este proyecto.

ÍNDICE

| | |
|---------------------------------------------------------------------------|----------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 8 |
| 2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA..... | 9 |
| 2.1 CICLODEXTRINAS..... | 9 |
| 2.1.1 Formación de complejos de inclusión con β - ciclodextina..... | 12 |
| 2.1.2 Requerimientos para la formación de complejos..... | 14 |
| 2.1.3 Geometría Molecular..... | 14 |
| 2.1.4 Polaridad..... | 15 |
| 2.1.5 Medio de preparación..... | 16 |
| 2.1.6 Métodos para determinar la formación de complejos de inclusión..... | 23 |
| 2.1.7 Aplicación farmacéutica..... | 25 |
| 2.1.8 Otras aplicaciones de las β - ciclodextrinas..... | 29 |

| | |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2 ESTABILIDAD..... | 31 |
| 2.3 DIFENHIDRAMINA..... | 39 |
| 2.4 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)..... | 42 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 58 |
| 4. OBJETIVOS..... | 58 |
| 5. HIPOTESIS DEL TRABAJO..... | 59 |
| 6. METODOLOGÍA..... | 60 |
| 6.1 EQUIPOS..... | 61 |
| 6.2 MATERIAL..... | 61 |
| 6.3 REACTIVOS..... | 62 |
| 6.4 DIAGRAMA DE BLOQUES DEL MÉTODO..... | 62 |
| 6.5 MÉTODO..... | 63 |
| 6.5.1 Formación del complejo..... | 63 |

| | |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.5.2 Caracterización del complejo..... | 63 |
| 6.5.3 Desarrollo del método analítico..... | 64 |
| 6.5.4 Validación del método analítico..... | 65 |
| 6.5.5 Estudio de estabilidad..... | 69 |
| 7. RESULTADOS..... | 72 |
| 7.1 Formación del complejo..... | 72 |
| 7.2 Espectros ultravioleta comparativos..... | 72 |
| 7.3 Espectros Infrarrojos comparativos..... | 74 |
| 7.4 Espectros de calorimetría de exploración diferencial..... | 76 |
| 7.5 Validación del Método..... | 78 |
| 7.6 Estudio de Estabilidad..... | 88 |
| 7.7 Cromatogramas comparativos del primer muestreo..... | 89 |
| 7.8 Cromatogramas comparativos del segundo muestreo..... | 92 |

| | |
|------------------------------------------|-----------|
| 8. ANÁLISIS DE RESULTADOS..... | 95 |
| 9. CONCLUSIONES..... | 97 |
| 10. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA..... | 98 |

1. INTRODUCCIÓN

El proveer a un cliente con un medicamento que reúna la máxima calidad, es decir que cumpla con las condiciones de identidad, efectividad, potencia, pureza y sea inocuo durante el período que se encuentra en el mercado y hasta el momento de ser usado, es el objetivo principal que persiguen los estudios de estabilidad.

La Difenhidramina, fórmula condensada $C_{17}H_{21}NO \cdot HCl$, es un polvo blanco o casi blanco, su peso molecular es de 291.82, su punto de fusión es de 166 a 170 °C, 100 mg son solubles en 1 mL de agua, en 1 mL de etanol, de 5-10 mg en 1 mL acetona, muy soluble en éter y benceno.

Las soluciones de este fármaco en agua, dimetilformamida, etanol al 95% y acetona son estables por 24 horas en condiciones normales de laboratorio.

UV máx. (en HCL 0.1N) es 254 nm, 260nm.

UV máx. (En etanol al 95%) es 253nm, 258nm, y 268nm.

El pH en solución acuosa al 5% es de 4-6.

El pKa a 25 °C es 9.0.

Es un inductor del sueño con propiedades antihistamínicas, anticolérgicas y sedantes, se absorbe rápidamente con máxima actividad en alrededor de 1 hora y una vida media de 3 a 9 horas.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos producidos por la degradación enzimática del almidón mediante la acción de la enzima ciclodextrin-glucosiltransferasa, son cristalinas, homogéneas y no higroscópica, son capaces de formar complejos de inclusión con diversos principios activos. Estos complejos tienen propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a las del principio activo o a las ciclodextrinas, estos complejos son usados para incrementar la solubilidad y rango de disolución, disminuir la volatilidad, modificar la irritación local e incrementar la estabilidad del fármaco.

La β -ciclodextrina es la más estudiada, se ha encontrado que es posible incluir dentro de ella a compuestos de diferente tamaño, formando compuestos más estables. Las moléculas de algunos fármacos tienden a interaccionar favorablemente con ellas

El presente trabajo muestra la formación de un Complejo de Inclusión de Difenhidramina - β -ciclodextrina.

La formación del complejo de inclusión 1:1 de Difenhidramina - β -ciclodextrina, se realizó pulverizando y mezclando los polvos por un tiempo de 45 minutos, posteriormente se caracterizó el complejo por análisis con espectroscopia Ultra Violeta (UV), Infrarrojo (IR), y por Calorimetría de Exploración Diferencial (DSC).

Al comprobar que la formación del complejo fue favorable se adaptó y validó un método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para analizar las muestras que serían sometidas a un estudio de estabilidad comparativo de Difenhidramina y Complejo a temperaturas de 20, 40, 60 °C, con una Humedad Relativa del 75%.

Los resultados obtenidos muestran que no existe degradación de la Difenhidramina complejada a las temperaturas de 20, 40. y 60 °C, pero la Difenhidramina sola sufre una degradación significativa a 40, y 60 °C.

Por lo tanto se comprueba que al formar el complejo con la β -ciclodextrina se incrementa la estabilidad de la Difenhidramina.

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 CICLODEXTRINAS

Las ciclodextrinas son sustancias cristalinas, homogéneas y no higroscópicas, con macroanillos, constituidos por uniones de glucopiranosas. La α -ciclodextrina se conocen como schardinger's α -dextrin, ciclomaltohexasosa, ciclohexaglucan, ciclohexamilasa, α C.D, ACD y C6A, compuesta de seis uniones de glucopiranosas. La β -ciclodextrina se conocen como schardinger's β -dextrin, ciclomaltoheptasosa, cicloheptaglucan, cicloheptaamilasa, β CD y C7A, compuesta de siete uniones de glucopiranosas. La γ -ciclodextrina, son conocidas como schardinger's, γ -dextrin, ciclomaltooctosa, ciclooctaglucan, ciclooctaamilasa, γ -CD, GCD y C8A, compuesta de ocho uniones de glucopiranosas.

Las ciclodextrinas son capaces de formar complejos de inclusión con fármacos. Estos complejos tienen propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a los fármacos o a las ciclodextrinas, estos complejos son usados para incrementar la solubilidad y rango de disolución, disminuir la volatilidad, modificar la irritación local e incrementar la estabilidad de fármacos.

En 1950 Schlenk reporta estabilización de ácidos insaturados con ciclodextrinas, en los años 60 se estabilizó el ácido linoleico, y el estradiol. En 1971 Hayaishi reporta estabilización de prostaglandinas con CDS, en 1987 el primer producto de marca con ciclodextrinas es el Prostarmon E tabletas que contienen 0.5 mg. de prostaglandinas E2 con 6mg de β -ciclodextrina (β -CD). Otro producto es el Protavasin que contiene 20mg. de prostaglandinas E1 y 646.7 mg de α -ciclodextrina (α -CD).

Otros ejemplos de fármacos químicamente inestables que formaron complejos de inclusión con ciclodextrinas para aumentar su estabilidad son anfotericin B, anatól, benzaldeido, bufadienolide,

camfor, carmofur, cloramfenicol, clorpromazina, clofibrato, dipiridamol, mentol, midenton, nitroglicerina, derivado de N-nitrosourea, propantelin, tetrahidrocannala- ubridecarenone etc.

La estabilidad física de algunos fármacos, primeramente de fármacos volátiles se ven incrementados por la complejación.

Se ha demostrado que los complejos se forman en proporción 1:1 fármaco-ciclodextrinas en base en las propiedades de los fármacos y también de las ciclodextrinas.

Las moléculas de algunos fármacos tienden a interaccionar favorablemente con la β -ciclodextrina porque tiene un diámetro de cavidad de 6 Å en donde se realiza el acomodamiento de grupos aromáticos de dichos fármacos. En contraste el diámetro de la cavidad de la α -ciclodextrina es muy pequeño y poco favorable para formar complejos de inclusión, Tabla 1. Se han observado también interacciones de algunos fármacos con la γ -ciclodextrina, sin embargo el costo de estas es muy grande por lo tanto económicamente no es favorable para la formación de complejos de inclusión.

(1 - 4)

La formación de complejos es un método de encapsulación molecular similar al método moderno de microencapsulación.

La justificación y beneficio del uso de ciclodextrinas o de sus derivados son esencialmente determinadas por la formulación y por la ruta de administración, por ese motivo se manejan, compuestos de inclusión en forma sólida, fármacos y soluciones de ciclodextrinas.

La adición de ciclodextrinas trae como beneficios:

- Proporcionar una estabilidad física del fármaco.
- Aumentar la solubilidad y biodisponibilidad de fármacos poco solubles.
- Disminuir la volatilidad de los fármacos.
- Transformación de formas farmacéuticas líquidas a sólidas.
- Eliminación de incompatibilidad entre el fármaco y los otros excipientes de la formulación.

Por lo tanto el uso de las ciclodextrinas es recomendable para atacar algunos de los problemas existentes dentro de la industria farmacéutica. (1, 2, 5,6)

TABLA 1 Características de alfa, beta y gama – ciclodextrinas.

| Tipo de ciclodextrina | α | β | γ |
|------------------------------------|------------|-------------|-------------|
| # de glucosas unidas | 6 | 7 | 8 |
| Peso molecular | 972 | 1135 | 1297 |
| Solubilidad en agua 100 mL | 4.5 | 1.85 | 23.2 |
| Rotación óptica | 150 + 0.5 | 162.5 + 0.5 | 177.4 + 0.5 |
| Diámetro de la cavidad | 4.7 – 5.3 | 6.0 – 6.5 | 7.5 – 8.3 |
| Diámetro de la periferia | 14.6 + 0.4 | 15.4 + 0.4 | 17.5 + 0.4 |
| Volumen aprox. en 1 mol de CD (mL) | 104 | 1257 | 427 |
| Formas de los cristales | hexagonal | monocíclica | cuadrático |
| pk a 25 ° C | 12.33 | 12.20 | 12.00 |

2.1.1 Formación de complejos de inclusión con β -CD

El proceso de inclusión es el resultado de la capacidad de un compuesto con ciertas características estructurales y estéricas, como de polaridad, para “englobar” especialmente a un segundo componente. El compuesto que es incluido (sustrato) está situado en la cavidad de la molécula ocluyente (ligando) sin afectar significativamente la estructura de éste. A la especie formada se le llama complejo de inclusión, complejo molecular, complejación, asociación molecular o Enlace, considerándose sinónimos. Este complejo surge a partir de las dos especies unidas

Mediante un enlace no covalente y presenta una estequiometria substrato-ligando definida. De acuerdo a este tipo de interacción, una característica de un complejo de inclusión es la posibilidad de establecer un equilibrio de disociación-asociación cuando se encuentren en solución.

Se llama substrato a la especie que interactúa y cuyas propiedades físicas o químicas serán observadas experimentalmente. El ligando es la molécula que interactúa con la primera y cuya concentración será la variable independiente en el proceso experimental de formación del complejo. Este tipo de nomenclatura será únicamente operacional y no tiene implicación acerca de la interacción o de las propiedades del complejo.

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

De acuerdo con las características que presentan los complejos se han clasificado de diferentes formas, dependiendo de la estructura del ligando y del espacio libre de éste, puede tener forma de rejilla, de un canal o una capa. Otro criterio de clasificación puede ser el número de moléculas que participan en la formación del complejo, dividiéndose en polimoleculares y monomoleculares, de los primeros los más conocidos son los formados con urea, y los monomoleculares son los formados con ciclodextrinas, que presentan una estructura cristalina estable. (1, 2, 7,8)

Las ciclodextrinas no tienen un punto de fusión definido, pero se descomponen por arriba de los 200°C, las propiedades termoanalíticas observadas depende del contenido de agua, estructura cristalina, rango de calentamiento y condiciones atmosféricas.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es el método apropiado para determinación cuantitativa de ciclodextrinas, la separación de las ciclodextrinas de otras sustancias es simple, el

Único problema es que no se pueden usar los detectores más empleados en HPLC que son los de Ultra Violeta (UV), las ciclodextrinas no absorben en esta región.

2.1.2 Requerimientos para la formación de complejos

Existe una serie de factores técnicos que van a limitar la formación de complejos. Muchos fármacos no pueden ser complejados, o el proceso no trae consigo efectos benéficos. En otros casos la cantidad del fármaco en el complejo es muy baja, lo que es desventaja cuando se desee formular en tabletas. También es limitante el hecho de que los compuestos inorgánicos no puedan complejarse, a excepción de algunos ácidos en su forma disociada. Sin embargo los requisitos principales que deben cumplirse son los relacionados a las propiedades del fármaco, las cuales van a determinar la estabilidad y demás propiedades del complejo formado. Estos requisitos son: a) la solubilidad del fármaco debe ser menor a 10mg / ml, b) el punto de fusión debe ser menor a 250°C, c) la estructura debe estar formada por cinco anillos condesados y d) el peso molecular debe encontrarse entre 100 y 400, con moléculas más pequeñas el contenido de fármaco es muy bajo, y las moléculas de mayor peso no caben en la cavidad de la β -ciclodextrinas (β -CD).

2.1.3 Geometría molecular

La β -CD es capaz de formar compuestos o complejos de inclusión, únicamente con moléculas que presenten un tamaño adecuado y compatible con las dimensiones de su cavidad, Tabla 1

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

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

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

En la actualidad con la ayuda de la computación, considerando únicamente las características estructurales, es posible predecir el arreglo espacial final de un complejo, lo que permite saber de antemano si existe la posibilidad de su formación. Evitando realizar investigaciones que consumen tiempo.

En investigaciones recientes se han empleado sistemas de modelización, principalmente en los estudios con naproxén; estos han permitido determinar la estructura final del complejo, los resultados han sido satisfactorios y verídicos. (1, 2, 7,8)

2.1.4 Polaridad

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

Un requisito para la inclusión es que no existan fuerzas de cohesión muy intensas dentro de la molécula a incluir. Una medida de la cohesión entre las moléculas de una sustancia cristalina es el punto de fusión; cuando éste es más alto que 250 °C generalmente no es posible preparar complejos de inclusión estables.

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

2.1.5 Medio de preparación

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

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

Para mezclar en solución se necesitan períodos de tiempo muy largos o la sustancia a incluirse debe ser previamente disueltas en algún solvente orgánico, es aquí donde el empleo de

cualquier solvente se ve restringida. Se recomienda emplear solventes de bajo peso molecular, tales como metanol, etilenglicol, glicerina, etc., la gran mayoría de los solventes orgánicos no pueden ser empleadas pues existe la posibilidad de que se formen complejos estables con la ciclodextrina, como con piridina o tolueno, Tabla 2.

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

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

Otro factor importante a considerar es el pH del medio, ya que de este dependerá el grado de ionización de una molécula, reflejado en la estabilidad del complejo. En un estudio realizado con diferentes antiinflamatorios no esteroideos empleando medios de preparación con diferente pH, se observó que la constante de máxima estabilidad de estos complejos se encuentra cercana al valor de pKa de cada uno de los principios activos empleados. Igualmente el pH va a determinar el grado de cristalización y por lo tanto la posibilidad de separar el complejo de su medio de preparación. (1,2)

TABLA 2 Solubilidad de las ciclodextrinas en varios solventes a 25° C g/100 mL

| Solvente orgánico | Ciclodextrina α | Ciclodextrina β | Ciclodextrina γ |
|--------------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| Metanol al 100 % | i | i | > 0.1 |
| Metanol al 50 % (en solución acuosa) | 0.3 | 0.3 | 208 |
| Etanol al 100 % | i | i | > 0.1 |
| Etanol al 50 % (en solución acuosa) | > 0.1 | 1.3 | 2.1 |
| Acetona | i | i | > 0.1 |
| Cloroformo | i | i | i |
| Piridina | 7 | 37 | i |
| Glicerina | i | 4.3 | i |

i : insoluble

a) Métodos de preparación de complejos de inclusión

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

b) Preparación en solución

El método más sencillo para preparar complejos de inclusión que se aplica a moléculas solubles en agua, consiste en adicionar la sustancia a incluir en una solución de β -CD la cual debe estar a una temperatura media de 30° a 40°C, agitando constantemente. Dado que la estabilidad del complejo depende en gran medida de la temperatura, no es conveniente emplear temperaturas arriba

De 80 °C, además no debe perderse de vista que existe un aumento considerable en la solubilidad de la β -ciclodextrina conforme aumenta la temperatura. Dicha solución puede presentar un pH neutro, ácido o alcalino, dependiendo de las características de la molécula a incluir, de manera que pueda encontrarse en su forma no ionizada. La mezcla así preparada se agita intensamente por un periodo de 2 a 4 horas para alcanzar un estado de equilibrio. Posteriormente se enfría lentamente para separar el producto por cristalización y filtración.

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

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

c) Coprecipitación

Un procedimiento alternativo cuando se desea incluir un principio activo muy soluble en agua es el método de coprecipitación. Este consiste en adicionar una solución del fármaco preparada en un solvente orgánico adecuado (que disuelva completamente al fármaco, Tabla 2) a una solución acuosa de β -CDS. Guardando la relación molecular. Esta solución se agita hasta la precipitación Espontánea del producto (5 a 24 hrs) o se evapora al vacío. Con este método no deben emplearse altas concentraciones de fármaco y β -CDS dado que es posible la precipitación de los cristales puros.

d) Spray drying o Freeze drying

Otro método de preparación en solución consiste en mezclar una solución del principio activo en agua o en una mezcla agua-solvente (preferentemente miscible en agua) a una solución acuosa

de β -CD. La mezcla se agita hasta formar una solución completa (transparente). Algunos investigadores han sugerido periodos de agitación prolongados de hasta 24 horas, sin embargo también han reportado que basta formar una solución y proceder con el siguiente paso, y se obtiene complejos de iguales características empleando un mismo fármaco.

A la mezcla obtenida se le somete a un proceso de secado por atomización (spray-drying) o liofilización (freeze-drying) para obtener el producto final, Kurozumi, et al. Sugieren el lavado del producto inmediatamente después de obtenerlo, con un solvente adecuado y frío para eliminar la cantidad de fármaco que pueda quedar sin complejarse.

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

e) Preparación en suspensión

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

f) Preparación por amasado

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

g) Preparación en fase sólida

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

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

h) Preparación por fusión

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

i) Preparación por fusión en recipientes cerrados.

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

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

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

Existen otros métodos que pueden emplearse para determinar la constante de estabilidad basándose en el aumento o disminución en la intensidad de la propiedad medida como puede ser variaciones en el espectro de UV, el espectro de emisión o excitación fluorescente, modificación en la conductividad eléctrica o en las propiedades térmicas, cada una de estas plantea supuestos

Diferentes, por lo que con frecuencia se obtienen valores de la constante de estabilidad con un rango muy amplio de discrepancia que solo en pocas ocasiones pueden ser comparadas. (1,2)

2.1.6 Métodos para determinar la formación de complejos de inclusión

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

a) Análisis por ultravioleta

La determinación cuantitativa del contenido de sustrato puede realizarse empleando las técnicas analíticas comunes como espectroscopia Ultravioleta (UV), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o por cromatografía de gases (GLC). En el caso de UV, puede inferirse una complejación mediante cambios en la longitud de onda de máxima absorbancia o en el coeficiente de extinción.

Para la determinación del contenido de sustrato es aconsejable que el complejo se disuelva

en etanol al 50 % y diluirlo posteriormente en etanol puro, en el cual la β -CD son insolubles. Para complejos muy estables o poco solubles se recomienda disolver el producto en 5 ml de dimetilformamida y entonces diluir en etanol al 50 %.

Por esta técnica la cantidad de sustrato que es cuantificado puede estar total o parcialmente complejoado o sin complejar, para aclararlo se debe recurrir al empleo de las técnicas termoanalíticas. Generalmente los cambios que aparecen en los espectros de UV son pequeños pero significativos. Usualmente se observa un efecto batocrómico o un ensanchamiento de la banda de absorción, así como un cambio considerable en la intensidad de la absorción con aumento en la concentración de β -CD. (1, 2,9,)

b) Métodos térmicos

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

Empleando calorimetría de exploración diferencial (DSC) se ha observado que después de realizar los procedimientos de complejación, los termogramas característicos de diferentes compuestos se han visto drásticamente modificados, pues existe la completa desaparición de los picos asignados a la evaporación, fusión descomposición etc. permaneciendo únicamente las características de la β -CD. Este comportamiento se atribuye a una verdadera complejación. (1, 2, 9, 10,11)

c) Espectroscopía de infrarrojo

Esta técnica se emplea generalmente para la caracterización de substancia orgánicas sólidas, sin embargo generalmente no es del todo adecuado para asegurar la formación de un complejo sino solo complementaria de otras técnicas. Las bandas características de la β -CD sólo cambian ligeramente cuando se encuentran formando un complejo, y la fracción de la molécula incluida es menor al 25 %. Sin embargo cuando ya se ha evaluado la complejación por alguna otra técnica el cambio en la intensidad y la frecuencia de las bandas asignadas a los grupos funcionales principales en el área de la huella digital se toma como un hecho que confirma la formación de un complejo. (1, 2,11)

d) Métodos diversos

Otros métodos utilizados son Cromatografía en capa fina, Difracción de Rayos x y Resonancia Magnética Nuclear.

2.1.7 Aplicación farmacéutica

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

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

En términos prácticos los complejos con β -CD ofrecen las siguientes ventajas:

l) Permite que los principios activos líquidos se conviertan en una forma cristalina, los cuales pueden

Ser adecuadamente formulados en tabletas.

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

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

IV) Una aplicación de gran importancia es la posibilidad de incrementar la solubilidad en agua así como la velocidad de disolución de fármacos poco solubles, con lo que aumenta la biodisponibilidad y se alcanzan niveles sanguíneos más altos, existiendo la posibilidad de reducir la dosis. La absorción percutánea y rectal es mejorada al reducirse el carácter hidrofóbico del fármaco.

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

VI) Se ha observado que es posible emplear la β -CD como desintegrante de características adecuadas o bien como excipientes para compresión directa.

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

a) Aumento en la solubilidad y biodisponibilidad

Al formar un complejo de inclusión con un fármaco poco soluble, las moléculas de este son aisladas una de otra y dispersadas dentro de la matriz de oligosacáridos, la cual se desintegra

Fácilmente bajo condiciones fisiológicas. El complejo obtenido es más hidrofílico que el fármaco por sí mismo, esto facilita la humectación y la desintegración de la estructura cristalina, favoreciendo una disolución más rápida del principio activo. En consecuencia es posible que se alcancen altas concentraciones con principios activos poco solubles, ya que el medio de disolución no necesita desintegrar la estructura cristalina del fármaco sino solo la del complejo.

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

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

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

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

Los resultados sugieren que la complejación con β -CD es un medio efectivo para incrementar la biodisponibilidad, logrando con esto el empleo de una dosis menor, que traiga consigo menores efectos secundarios. (1, 2, 3, 9,10)

b) Efecto en la estabilidad física y química

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

Se ha encontrado que después de la complejación se reduce considerablemente la velocidad de descomposición, incrementándose el valor de la constante de estabilidad y el tiempo de vida media, sin cambio en las características organolépticas de los fármacos. (1, 2,12)

Debido a que la complejación con β -CD modifican las propiedades físicas y químicas del fármaco, es de esperar que los efectos biológicos también se modifiquen. En los antiinflamatorios no esteroidales se ha reducido la irritabilidad gástrica, provocada por consumo prolongado y la baja solubilidad.

Se ha reducido la irritabilidad oftálmica debida al empleo de solventes orgánicos para disolver completamente el principio activo. También se ha inhibido el efecto homolítico y el sabor amargo de algunos fármacos.

c) Manufactura de tabletas

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

Los resultados de estos estudios muestran que la β -CD puede ser empleada como excipiente para compresión directa y obtener tabletas con propiedades mecánicas adecuadas y una mayor velocidad de disolución, con la posibilidad de mejorar la biodisponibilidad. (1, 13,14)

2.1.8 Otras aplicaciones de las β -ciclodextrinas

a) Industria cosmética y alimenticia

La aplicación de la β -CD en la industria cosmética y alimenticia está encaminada a la complejación de los saborizantes y esencias con el propósito de estandarizar su composición y mejorar la estabilidad al evitar la adsorción de agua. El empleo de β -CD ha mejorado la característica de los alimentos en sabor, consistencia y estabilidad. Se ha facilitado el almacenamiento de esencias, al convertir el aceite en polvo, disminuyendo su pérdida por volatilidad. Es posible reducir

la irritación ocular de un shampoo que sea debida a una fragancia, empleando su correspondiente complejo con β -CD. También es posible disminuir el mal olor bucal, adicionando β -CD a un dentífrico. Puede substituirse el empleo de almidón por β -CD en la fabricación de talcos, evitando el crecimiento de microorganismos y el empleo de conservadores, favorecido por el empleo de almidón, a la vez se incrementa la estabilidad del fármaco o del perfume empleado.

b) Pesticidas

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

Se ha comprobado que la estabilidad de los complejos con insecticidas aumenta

considerablemente pues su descomposición por oxidación, calentamiento o fotólisis es retrasada. Esto hace posible su combinación con otros componentes de la formulación con los que pueden ser incompatibles. Adicionalmente es posible manejarlos sin riesgo de contaminación durante la fabricación, controlando la liberación del pesticida.

c) Biotecnología

En los procesos microbiológicos y enzimáticos de interés farmacéutico, durante la conversión de esteroides, producción de prednisona, etc. se ha observado que la presencia de β -CD favorece la

presencia de una mayor cantidad de substrato disuelto, con lo que hay un incremento de hasta 300 % en el rendimiento del proceso, obteniéndose un producto más homogéneo y de mejor calidad.

Es adecuado decir que en los procesos biotecnológicos la β -CD actúa como un controlador del proceso, liberando la substancia complejada a medida que aquella que queda libre se va agotando, esto hace posible que el proceso sea más efectivo y redituable. (1,2)

2.2. ESTABILIDAD

Estabilidad, es la propiedad de un medicamento contenido en un envase de determinado material para mantener durante el tiempo de almacenamiento y uso las características físicas, químicas, fisicoquímicas, microbiológicas y biológicas entre los límites especificados.

Estudios de Estabilidad, pruebas que se efectúan a un medicamento para determinar el período de caducidad y las condiciones de almacenamiento en que sus características físicas, químicas, fisicoquímicas, microbiológicas y biológicas permanecen dentro de límites especificados, bajo la influencia de diversos factores ambientales como temperatura, humedad, y luz.

Estabilidad Acelerada, estudios diseñados para incrementar la velocidad de degradación química y/o biológica o el cambio físico de un medicamento, por medio del empleo de condiciones exageradas de almacenamiento (16).

TABLA 3 Muestra las condiciones del estudio para medicamentos con fármacos conocidos.

| Condiciones de almacenamiento | Análisis |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 40 °C ± 2 ° con 75 por ciento de humedad relativa ± 5 por ciento para formas farmacéuticas sólidas. | 30, 60, 90 y 180 días. |
| 40 °C ± 2 ° a humedad ambiente para formas farmacéuticas líquidas y semisólidas. | 30, 60, 90 y 180 días. |
| 30 °C ± 2 ° a humedad ambiente para todas las formas farmacéuticas. | Inicial y 90 días. |

(14)

Para poder entender cuánta información se requiere en un estudio de estabilidad, es preciso tener alguna perspectiva de la necesidad y la razón del estudio, y del propósito que se persigue.

- La primera razón es sanitaria. El hecho de que un fármaco sea inocuo, no significa necesariamente que sus productos de degradación también lo sean. Además, aún cuando no fueran tóxicos, existe un peligro indirecto.

¿Qué sucede cuando un paciente seriamente enfermo recibe un medicamento deteriorado que no contiene la dosis terapéutica prescrita o que, si la contiene, no está en condiciones de ser biológicamente disponible?

- En segundo lugar, hay una razón legal, que exige que todos los medicamentos cumplan con las condiciones de identidad, efectividad, potencia, pureza e inocuidad durante el período que se encuentran en el mercado y hasta el momento de ser usados.

- Finalmente, existen razones económicas. Un medicamento en malas condiciones porque no contiene las dosis rotuladas, cuando se receta por el médico no logra los efectos esperados, o por

Que sus características organolépticas no son óptimas y el mismo paciente lo rechaza, no es, ciertamente, una buena promoción para el producto. (16)

La responsabilidad del laboratorio productor debe llegar por lo tanto, a asegurar la estabilidad del medicamento hasta el momento de ser usado, y para estar en condiciones de hacerlo, es preciso que se realicen controles de la estabilidad de la forma farmacéutica tal cual sale a la venta, así como también del preparado, a fin de establecer las condiciones de preservación y el periodo útil de ambas formas.

Los factores que pueden alterar un producto con el tiempo son:

Temperatura, radiaciones, humedad, oxígeno u otros gases atmosféricos, presión, solventes, cambios de pH, interacciones, contaminación microbiana, etc. Todos los métodos para estudiar la estabilidad deben tener en cuenta estos factores.

Generalmente, los procesos de degradación son reacciones químicas que consumen energía y que pueden acelerarse por un aumento de la temperatura. La mayoría de los métodos de envejecimiento acelerado toman en cuenta este hecho y se fundamentan en mediciones de la velocidad de degradación a temperaturas superiores a la normal para luego sacar inferencias de lo que sucedería a la temperatura ambiente, están basados en principios fisicoquímicos.

De los métodos de envejecimiento acelerado propuestos, son:

La aplicación directamente de la ecuación de Arrhenius, exhaustivamente desarrollado por Garret, para la predicción de la estabilidad, la tabla de estabilidades, el coeficiente de temperatura, la relación de pendientes y el de temperaturas oscilantes.

El método de Arrhenius, se denomina también de Garret por el hecho de que este autor fue quien desarrolló su aplicación al cálculo de estabilidad de productos farmacéuticos.

La relación cuantitativa entre velocidad de reacción y temperatura, esta dada por la ecuación de Arrhenius.

$$K = A e^{-\Delta H + / RT} \quad [1]$$

$$\ln K = \ln A - \frac{\Delta H +}{RT} \quad [2]$$

Donde $\Delta H +$ es la entalpía de activación, A es una constante, R la constante de los gases y T la temperatura absoluta. De la ecuación se deduce que si se representa $\ln K$ en función de $1/T$ se obtiene de la pendiente $\Delta H / RT$.

Asimismo, si se conocen A y $\Delta H +$ se puede calcular la velocidad de reacción a la temperatura que se desee. Es importante señalar que para muchas reacciones la entalpía de activación está tabulada (entre otros el National Bureau of Standards de los Estados Unidos ha hecho una recopilación entre 1951 y 1964, hay también otras tablas de estabilidades), de modo que, determinando la constante de velocidad de reacción a una temperatura y conociendo el $\Delta H +$, se puede calcular el valor de la constante A con la ecuación [1] o con la [2], y con este dato recalculer el valor de la constante de velocidad de reacción a otra temperatura.

Esto es importante cuando se hacen pequeñas modificaciones en la formulación. Se sabe que una leve variación en las concentraciones de los excipientes o en el contenido del fármaco activo no modifica apreciablemente el valor de $\Delta H +$, aunque si el de A. De modo de que si, por ejemplo, se tiene el valor de $\Delta H +$ para determinada formulación y se requiere saber la estabilidad de un preparado con ligeras variantes con respecto a aquélla, no es necesario realizar el estudio de envejecimiento acelerado a tres temperaturas solo bastará ensayar una (por supuesto, será la más elevada compatible con la muestra) y obtener el valor de K. Con éste se calcula A, y con A y $\Delta H +$ se obtiene el valor de K a 25°C, mediante el cual se calcula luego el período útil es decir, el $t_{90\%}$ en la forma conocida.

Para la aplicación correcta del método de Arrhenius deben tomarse en cuenta algunas recomendaciones: l) seguridad sobre el orden de la reacción. Para ello es necesario que la reacción haya avanzado lo suficiente, ya que en el primer 10% de reacción es muy difícil distinguir un orden

de otro. Una descomposición del 50% es adecuada, aunque en algunos pueden obtenerse buenos datos con 30 o 35%. Pero no con un porcentaje menor. II) exactitud en la medición de las temperaturas. Esto es tanto menor sea la diferencia entre una y otra; por ejemplo, si entre T_1 y T_2 hay solo 10° (y esta es la mínima diferencia que puede usarse), un error de $\pm 2.0^\circ\text{C}$ en la temperatura llevará a valores muy erróneos. Como máximo podrá admitirse una discrepancia de $\pm 0.5^\circ\text{C}$. El error en la medición del tiempo es menos común, ya que generalmente se trata de valores altos y no es fácil en más o menos un día. Sin embargo, puede suceder que se extraiga una muestra de la estufa y no se analice inmediatamente. Si la reacción no se ha detenido por algún procedimiento de frenado: congelamiento, agregado de reactivos, etc., seguirá avanzando a la temperatura ambiente, que dentro de un laboratorio puede llegar a los 30°C . Tenemos entonces un error en la medida del tiempo, y el valor de la degradación que se obtenga no corresponderá exactamente al tiempo de almacenamiento a temperaturas elevadas, sino a un tiempo algo mayor. En consecuencia, la muestra debe ser analizada en el momento en que se extrae del termostato o la estufa, o de lo contrario, deberá congelarse la reacción hasta el momento de la valoración.

Todos los métodos aplicables a la predicción de un período útil tienen una base fisicoquímica, ya que la degradación comprende una o más reacciones cuya velocidad puede calcularse cinéticamente. La cinética es una disciplina fundamental para el estudio de la estabilidad de preparados farmacéuticos.

Desde el punto de vista técnico, tiene varios objetivos:

1. Obtener experimentalmente los datos cinéticos
2. Correlacionarlos mediante ecuaciones matemáticas
3. Proponer el mecanismo de la reacción o de las reacciones.
4. Diseñar las experiencias necesarias para confirmar la hipótesis o las hipótesis propuestas
5. Establecer las condiciones para acelerar o disminuir la velocidad de la reacción según requerimientos preestablecidos

Así, estudiando el mecanismo de degradación, se ha obtenido suficiente información como para lograr mayor estabilidad en formulaciones inestables. (16)

Velocidad de reacción, es la velocidad con la cual cambia la concentración de una sustancia que interviene en esa reacción. La sustancia en cuestión puede ser un reactivo o un producto de la reacción. Este cambio es por ejemplo disminución de la concentración del reactivo a medida que transcurre el tiempo.

La concentración de determinada sustancia suele relacionarse proporcionalmente con alguna propiedad de fácil medición, como presión, absorción de radiación, rotación óptica, etc. y entonces la velocidad de la reacción es susceptible de medirse por el aumento o disminución de la presión (cuando se forman o se consumen gases), de la absorción de la luz (cuando se producen o se descomponen productos coloreados), de la rotación óptica (cuando se forman o se consumen compuestos ópticamente activos), etc.

Orden de reacción, se trata de un concepto distinto del de molecularidad y está basado en mediciones cinéticas, y es el número de moléculas de cuya concentración depende la velocidad de reacción.

Reacción de orden cero, la velocidad de reacción es independiente de la concentración de los reactivos.

Reacción de primer orden, la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de uno de sus reactivos.

Reacción de segundo orden, la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de dos reactivos o a la segunda potencia de uno de ellos.

El orden de reacción es un concepto empírico y, en consecuencia, su determinación por métodos convencionales se reduce a un estudio de las concentraciones de los reactivos en función del tiempo. De ahí que el problema cinético pase a ser un problema de análisis cuantitativo "cronometrado". Cabe aclarar que se pueden hacer estudios cinéticos sin medir concentraciones: para ello se emplean técnicas especialmente concebidas para cinéticas de reacciones muy rápidas.

(18,19)

Puede utilizarse cualquier procedimiento analítico, sea químico, físico o microbiológico, que permita determinar específica y cuantitativamente la concentración de uno de los reactivos.

El método químico comprende la determinación directa de la concentración por volumetría o gravimetría. Los métodos físicos miden alguna propiedad física de la mezcla de reacción que cambia proporcionalmente a medida que ésta avanza. Pueden ser ópticos, como polarimetría, colorimetría, y espectrofotometría, estos presentan la ventaja de ser más rápidos y limpios que los químicos, pero debe tenerse especial cuidado con las reacciones laterales o con la falta de especificidad que pueden dar grandes errores, puesto que no se miden la concentración del reactivo directamente

Los métodos microbiológicos, por lo general, son menos exactos que los físicos y químicos, pero en ciertos casos se prefieren por su mayor especificidad.

Pero siempre se va a requerir de un método de detección: I) que distinga eficazmente al producto de degradación del fármaco original; II) que tenga gran sensibilidad, puesto que generalmente el porcentaje de fármaco degradado será muy bajo, en muchos casos inferior al 10%.

La espectroscopia de infrarrojo, de resonancia magnética nuclear y la polarografía son muy útiles para estos fines, cuando el producto de degradación presenta un grupo funcional de señal intensa que no existía en el fármaco original.

Algunas veces las sustancias originadas durante la degradación evidencian otras particularidades químicas igualmente interesantes, que hacen fácil su determinación.

En los casos en los que no se tenga idea alguna sobre los posibles productos resultantes, se puede hacer una detección de éstos. Cualquier fármaco que se someta a condiciones drásticas de degradación (hidrólisis ácida o alcalina, oxidación por burbujeo de oxígeno o agregando otro agente oxidante, alta temperatura, luz intensa, etc.) se modificará. No hay fármaco usado en la industria farmacéutica que resista a todos estos tratamientos sin alterarse.

Teniendo pues el fármaco degradado, se controla el método de valoración de fármaco y de detección de productos de degradación, se observan las variaciones en cada caso.

Cuando la molécula degradada no presenta características peculiares que la hagan detectable en presencia del fármaco activo de la cual proviene, es necesaria su separación, la determinación de las

sustancias puede realizarse por cualquier método adecuado, aun cuando no sea específico para la molécula intacta. Lo mismo cabe decir cuando se demuestra fehacientemente la inexistencia de productos de degradación interferentes, o cuando éstos se valoran por otro método.

Mediante la temperatura pueden acelerarse la mayoría de los procesos que producen degradación de los fármacos y preparados farmacéuticos, y ésta es la base de gran parte de los métodos de envejecimiento artificial.

Debe recalcarse que si bien la temperatura acelera casi todos los procesos degradativos, hay algunos pocos en los que ésta tiene escasa influencia.

Entre ellas se pueden mencionar las reacciones fotolíticas, cuya energía de activación es relativamente baja (2-3 Kcal/mol) y que no se aceleran notoriamente por aumento de la temperatura. De igual modo, algunas reacciones de oxidación y descomposición en que intervienen procesos de difusión tampoco son muy sensibles a cambios térmicos, aunque sí a variaciones de presión.

Por otro lado, éstas son reacciones de pirolisis, las que a causa de su elevada energía de activación (aprox. 50 Kcal/mol), sólo se producen a altas temperaturas, mientras que en condiciones normales prácticamente no tienen lugar.

El método empírico para evaluar la relación entre la temperatura y la velocidad de reacción establece que por cada 10°C de aumento de la temperatura se duplica el valor de la velocidad de reacción. Es decir que si una reacción a 45°C tiene un tiempo de vida media de 20 días (o sea que en 20 días la concentración del fármaco ha llegado a la mitad), a 55°C será de 10 días aproximadamente.

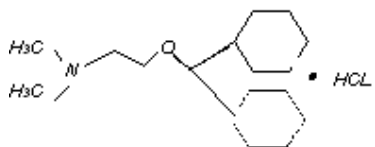
Este criterio es muy práctico para programar los experimentos. Por ejemplo, si tenemos reacciones de 60, 50 y 40 °C, y la primera muestra sacada a los tres días a 60°C reveló 10 % de degradación, es viable esperar que para el sexto día a 50°C se tendrá aproximadamente igual valor. Entonces la primera muestra a 40°C se tomará a los doce días de iniciado el experimento.

El método es, en cambio, muy peligroso si con él se quieren hacer predicciones no corroboradas por experiencias, es decir, siguiendo el criterio empírico, con el único dato de la velocidad de reacción en

condiciones normales, o peor aún, si con el único dato de tres días se llega a 10% de degradación, se hacen cálculos y se deduce que a 25 °C tardará 36 días en degradarse al 10%.

En la práctica, en la mayoría de los estudios de estabilidad suele usarse un método aún más simple. Se presupone que la velocidad es sólo función de la concentración del fármaco degradable y se determina ésta en función del tiempo. Luego se representan las tres funciones de concentración de A en función del tiempo, cada una de las cuales corresponde respectivamente, a una reacción de orden cero (si se representa C vs T), de primer orden (log. C vs T) o de segundo orden (1/C vs. T). La función que dé la curva más lineal, es decir, la que más se aproxime a una recta, decidirá el orden de reacción. Esto es una aproximación, pero resulta útil para la mayoría de los casos. (17)

2.3 DIFENHIDRAMINA



Clorhidrato de Difenhidramina

Fórmula Estructural $(C_6H_5)_2CHO CH_2CH_2N(CH_3)_2 \cdot HCl$

Formula Condensada $C_{17} H_{21} NO \cdot HCl$; Sinónimos Benzihidriloxi, Alledryl, Allergina, Amidryl, Bagodryl, Benadryl, Benodine, Dolestan, 2-(Difenilmetoxi)-N,Ndimetiletlenamina Clorhirato, Dimetilamina, Benzidriester, Clorhidrato, N,N Dimetil-2-(Difenilmetoxi)etilamina Clorhidrato 2-Benzihidriloxietil-N,N-Dimetilamino Clorhidrato.

Propiedades Fisicoquímicas; Polvo blanco o casi blanco, peso molecular 291.82, punto de fusión 166 a 170°C, 100mg son solubles en 1mL de agua, en 1 mL de etanol al 95%, de 5-10 mg en 1 mL acetona, muy soluble en éter y benceno.

Las soluciones de este fármaco en agua, dimetilformamida, etanol al 95% y acetona son estables por 24 horas en condiciones normales de laboratorio.

UV máx. (en HCL 0.1N) es 254nm, 260nm.

UV máx. (en etanol al 95%) es 253nm,258nm, y 268nm.

El pH en solución acuosa al 5% es de 4-6.

El pKa a 25 °C es 9.0.

L_D 50 por administración oral en ratas es de 500mg por Kg.

Precauciones de almacenaje, protéjase de la luz y almacenarse a temperatura ambiente. (19,20)

Propiedades Farmacológicas; La difenhidramina es un inductor del sueño con propiedades antihistamínicas (se clasifica en el grupo de los antihistamínicos), anti colinérgicas y sedantes.

Por su efecto inductor del sueño y su acción antihistamínica compite por los receptores celulares en las células efectoras. La dosis única oral de clorhidrato de difenhidramina se absorbe rápidamente con máxima actividad en alrededor de una hora y una vida media corta en plasma de 3 a 9 horas.

La difenhidramina se distribuye ampliamente por todo el organismo, incluyendo el sistema nervioso central, solamente una pequeña cantidad del fármaco se excreta sin cambio por la orina; la mayoría aparece como producto degradado de transformación metabólica en el hígado, el cual se elimina casi por completo en el término de 24 horas.

Químicamente los antihistamínicos son un grupo amplio de compuestos. La única característica común es que todos poseen por lo menos un nitrógeno terciario y una porción aromática formada generalmente por dos anillos de fenil (o equivalente).

La mayoría de los fármacos contienen grupos débilmente ácidos o básicos (o ambos), de tal manera que sus estados de ionización, que influyen en sus interacciones con los receptores, dependerán de los valores de pKa de estos grupos y del pH ambiental.

Todos los antihistamínicos son bases débiles; en consecuencia se absorben bien, se distribuyen ampliamente en los tejidos y cruzan con facilidad la barrera hematoencefálica y placentaria. Se eliminan rápido por la orina, sin cambio y en parte metabolizadas; se transforman principalmente en el hígado por sistemas enzimáticos microsómicos.

El grupo más importante es el de las oxietilaminas, muchas de ellas de tipo antihistamina tienen intensa actividad antimuscarínica, cosa que no debe sorprender dados los elementos estructurales que poseen en común con la acetilcolina.

La difenhidramina (Benadryl) es el producto mejor conocido de éste grupo y uno de los antihistamínicos más utilizados. La sal de difenhidramina con 8-cloroteofilina se conoce como dimenhidrinato (Dramamine). La feniltoloxamina es un isómero estructural de la difenhidramina.

La aplicación principal de los antihistamínicos está directamente relacionada con su acción antagonista de receptores H₁ con alivio de efectos mediados en la alergia y en reacciones anafilácticas. Resultan útiles para el alivio sintomático de urticaria, edema angioneurótico, fiebre del heno, y enfermedad del suero. Los antihistamínicos también son útiles para combatir reacciones a venenos que contengan histamina y sustancias que provocan la liberación de histamina en los tejidos (por ejemplo ciertas picaduras de insectos).

Los antihistamínicos que han demostrado eficacia para tratar el mareo son difenhidramina, difenilpiralina, prometacina, piratiacina, feniramina y sus derivados.

La sedación es el efecto secundario más frecuente, pero obsérvese que es el deseado si se utiliza el antihistamínico como sedante. Los pacientes tratados con antihistamínicos por trastornos alérgicos deben ser puestos en guardia, advirtiéndoles la posible producción de somnolencia o falta de concentración, o de sinergia con etanol y otros depresores del sistema nervioso central, el efecto sedante muchas veces desaparece después de dos o tres días de emplear un antihistamínico. No se produce dependencia de la actividad sedante.

Los antihistamínicos más utilizados parecen estar desprovistos de efectos secundarios graves o que pongan la vida en peligro, excepto en caso de dosis enormes. Un producto, la tenalidina, fue suprimida del mercado después de publicarse cierto número de casos de agranulocitosis. (21-24)

2.4 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

HPLC se utiliza en casi todos los laboratorios industriales, organismos oficiales, universidades y en todos los laboratorios donde se realicen investigaciones químicas y bioquímicas. La popularidad de ésta metodología se debe a su gran versatilidad y que cubre un amplio espectro de aplicaciones, excelente capacidad para el análisis de trazas (en muchos casos ppm), rapidez y adaptabilidad al análisis cuantitativo.

Las aplicaciones de HPLC (particularmente en el área de la biotecnología) se están incrementando rápidamente. En los años venideros el HPLC continuará jugando un rol predominante en los laboratorios de investigaciones farmacéuticas, de síntesis orgánica, bioquímicos, biológicos, de control del medio ambiente y alimentarios.

Una de las mayores limitaciones de HPLC es la falta de operadores experimentados. El entrenamiento en técnicas modernas de HPLC en las universidades es escaso, o casi nulo. Esto ocurre debido al alto costo de los instrumentos ya que los profesores de otra generación no tuvieron la oportunidad de adquirir experiencia en esta disciplina, por lo cual el entrenamiento debe recaer en el fabricante del instrumento o en el químico experimentado en la materia.

Según define la IUPAC " La cromatografía es un método, usado primeramente para la separación de los componentes de una muestra en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de ellas es estacionaria mientras, la otra es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido Retenido sobre un sólido o un gel, puede estar extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa.

El desarrollo de un método analítico de HPLC es costoso y consume mucho tiempo, es preferible emplear caminos sistemáticos, efectuando los ensayos en una dirección segura o al menos con buenas probabilidades de éxito, evitando ensayos innecesarios y documentados, los resultados no sólo para el desarrollo mismo sino para futuras revisiones. Indudablemente, el primer paso debería consistir en una investigación bibliográfica. Sería lamentable invertir semanas de trabajo para llegar a conclusiones que podrían obtenerse en minutos de consulta en una base de datos adecuada, dirigidas al analito específico o compuestos químicamente relacionados que puedan aportar información útil, fácilmente transferibles al problema en estudio.

En primer lugar, deberá fijarse con claridad cuál es la meta perseguida, y los límites de dichos objetivos, por ejemplo

- ◆ ¿Se requiere identificación, screening o cuantificación?
- ◆ ¿Cuál es el nivel presente (macro o microcomponentes)?
- ◆ ¿Cuál es la precisión requerida?
- ◆ ¿Cuántos componentes se desean valorar?
- ◆ ¿Cuántas muestras se desean procesar?
- ◆ Con respecto a la muestra, es importante o conveniente conocer:
 - ◆ Identidad de componentes de interés.
 - ◆ Rango de pesos moleculares de los componentes de interés
 - ◆ Estructura química, pka, solubilidad espectros UV.
 - ◆ Concentración de los componentes de interés
 - ◆ Naturaleza de la matriz (suero, orina, tabletas, etc.)

- Definición del sistema preliminar, el primer punto a evaluar durante la definición del sistema consiste en determinar que pasos preparativos pueden necesitarse para mantener el analito en solución, en la concentración adecuada. En muchos casos la preparación puede ser tan simple

como la extracción líquido-líquido o líquido-sólido y en otros, pueden necesitarse varios pasos de preconcentración previos.

La cromatografía líquida de alta resolución, como cualquier otro método cromatográfico, es una herramienta sumamente útil para el análisis cuantitativo de mezclas de sustancias. El rápido crecimiento que este método analítico ha experimentado en las últimas décadas, si bien se debe a diversos factores, se basa fundamentalmente en la simplicidad con la cual se obtienen por HPLC resultados cuantitativos. Actualmente el HPLC es capaz de cuantificar tanto impurezas en muy bajas concentraciones como macrocomponentes con niveles de precisión tan bajos como 0.5 % y aún menores. Como todo método de análisis cuantitativo, está compuesto de diversos pasos, cada uno de los cuales debe estudiarse apropiadamente. Estos son:

- ◆ Muestreo
- ◆ Preparación de la muestra
- ◆ Inyección de la muestra
- ◆ Detección
- ◆ Integración de la Señal

Muestreo es una etapa crítica en todo método de análisis. Los líquidos se pueden muestrear directamente, previa homogenización, y los sólidos o semisólidos deben someterse a algún procedimiento que permita asegurar que la muestra extraída sea representativa.

Diseño estadístico apropiado que tenga en cuenta los objetivos del estudio, sus certezas e incertidumbres.

Instrucciones para la recolección de las muestras, etiquetado, conservación y transporte para facilitar el análisis.

Entrenamiento del personal en las técnicas de muestreo y en los procedimientos específicos.

Preparación de la muestra, es una etapa muy importante dentro del análisis cuantitativo. Debido a la diversidad de situaciones que pueden presentarse dependiendo de la concentración de analito y la naturaleza de la matriz de la muestra.

Inyección de la muestra líquida y homogénea dentro del cromatógrafo es una de las fuentes de error más importantes dentro del HPLC. En general, cuanto mayor sea el volumen de inyección mayor será la precisión, aunque se debe tener en cuenta que aumentándolo por encima de cierto valor, aumenta el ensanchamiento del pico causando una pérdida de eficiencia no adjudicable a la columna.

Habitualmente, el volumen de inyección se selecciona de acuerdo a la longitud y diámetro de la columna que se desea utilizar, así, para la inyección de muestras disueltas en fase móvil, en columnas de 4mm de diámetro interno, se utilizan como máximo los siguientes volúmenes:

100 μ l en columnas de 25 cm de longitud

50 μ l en columnas de 12.5 cm de longitud

20 μ l en columnas más cortas

Detección los errores más comunes que surgen de la detección se refieren a la falta de estabilidad, sensibilidad o linealidad. Estos problemas son poco frecuentes con los detectores UV debido a la simplicidad de la detección ultravioleta y al desarrollo que los mismos han experimentado en los últimos años.

En general la falta de linealidad se soluciona reduciendo la masa de soluto inyectado. Sin embargo, es posible operar con sistemas no lineales siempre y cuando se utilice una curva de calibración como referencia cada vez que se realice el análisis.

En la selección de las condiciones óptimas para la cuantificación en HPLC utilizando un detector UV deben considerarse la longitud de onda de trabajo, el ancho de banda instrumental y la constante de tiempo del detector. Para una mejor sensibilidad la longitud de onda de trabajo debe ubicarse en las proximidades del máximo de absorción de los picos de interés. Cuando los máximos de las

sustancias de interés están muy alejados es posible trabajar a longitud de onda intermedia sin demasiado decremento en la linealidad del sistema.

Integración de la señal, la señal generada por el detector se transmite a los registradores o integradores. Los primeros grafican el pico y su área debe medirse manualmente, mientras que los segundos transforman la señal analógica en digital, calculan el área o altura de los picos y efectúan una serie de operaciones programadas generando finalmente un reporte analítico. (25)

- El segundo punto a considerar es el equipo a utilizar, básicamente los equipos de HPLC pueden clasificarse en integrados y modulares, en los primeros, cada uno de sus puntos (reservorio de solventes, bomba, inyector, y detector.) están reunidos en un gabinete y su intercambio o conexión con otros componentes de la misma o diferente marca es difícil. Permite en cambio un mejor aprovechamiento del espacio, menos cables, tuberías y conexiones expuestas y quizás menores riesgos frente a operadores ocasionales o poco experimentados. En los segundos los módulos son Instrumentos individuales que permiten no solo armar el equipo según la necesidad de analista sino aumentar su complejidad según esa necesidad varíe.

El equipo cromatográfico esta compuesto por un reservorio para la fase móvil, tuberías, uniones, columna, bomba, inyector, detector, y sistema de toma y procesamiento de datos.

Columna.- En HPLC puede considerarse como el corazón del sistema cromatográfico, pues en ella tiene lugar la separación de los componentes presentes en las muestras. Por ende, se debe considerar que las fallas en las columnas conducen inevitablemente a pobres separaciones, independientemente del estado del instrumento.

Desafortunadamente el material de relleno de la columna no es tan resistente como el acero que lo rodea por lo que las columnas deben utilizarse apropiadamente, teniendo especial cuidado en uso y mantenimiento. La vida útil de una columna depende de muchos factores (tipo y naturaleza de las muestras, tipo y naturaleza del solvente, temperatura de trabajo) y puede variar desde unas pocas inyecciones hasta algunos miles.

De hecho, una columna que se emplea sólo para un tipo de muestras tiene, en general, mayor vida útil que aquella que se emplea para todo uso. Ningún analista puede contentarse con una corta vida útil y frente un deterioro manifiesto de la columna luego de algunas inyecciones debe replantearse tanto del método cromatográfico como el de separación de la muestra.

Los problemas más frecuentes son:

Aumento de la presión, esto puede deberse al taponamiento de filtros o a la contaminación química del material relleno.

Taponamiento de los filtros, las columnas suelen tener filtros tanto a la entrada como a la salida, estos filtros pueden taparse y, consecuentemente, aumentar la presión del sistema. El filtro que se tapa con mayor facilidad es, naturalmente, el de entrada; al filtro de salida difícilmente lleguen partículas desde el exterior debido a que el material de relleno de la columna actúa, igualmente como un filtro. El origen de esas partículas puede ser muy diversos: solventes, muestras inadecuadamente filtradas o partículas liberadas por los sellos de bomba. El filtro de salida también puede taparse, pero en este caso son las partículas finas que pueden liberarse de la columna las que originan el taponamiento.

El hecho de filtrar tanto los solventes como las muestras evita en gran medida el taponamiento de estos filtros, pero esta acción no resulta por sí sola suficiente, resulta conveniente además, agregar ciertos dispositivos para retener las partículas que, eventualmente, puedan librarse de los filtros y para aquellas, como las partículas de los sellos de las bombas, que se originan en el mismo instrumento cromatográfico, estos dispositivos se denominan filtros en línea.

Contaminación química del material de relleno, la presión puede aumentar al precipitar sustancias dentro de la columna debido a su compatibilidad con la fase móvil, para evitarla es necesario determinar la miscibilidad entre fases móviles antes de mezclarlas en el equipo cromatográfico y disolver las muestras en la misma fase móvil.

Todos los componentes de la muestra deben ser compatibles con la fase móvil (no sólo el analito), en caso contrario resulta muy conveniente utilizar procedimientos de preparación de las muestras que separen al analito de las sustancias que puedan precipitar en contacto con la fase móvil o la fase

estacionaria. La contaminación puede eliminarse lavándola con un solvente tal que disuelva al material precipitado. Si se desconoce la identidad de la sustancia que ha producido el bloqueo, puede recurrirse a algún sistema general de lavado como el indicado por el fabricante de las columnas.

Habitualmente las columnas deben descartarse luego de unas 2000 o 3000 inyecciones, esta regla es muy general y depende fundamentalmente del tipo de separación requerida, de la naturaleza y limpieza de las muestras, del tipo de fase móvil empleada y del mantenimiento que se haga de la columna. Una pérdida abrupta de eficiencia constituye, sin lugar a dudas, un problema debido tal vez a la aparición de volúmenes muertos en el relleno de la columna o a la inyección de muestras con sustancias que lo contaminan. Una duración menor indicada exige replantear las condiciones de operación para evaluar la factibilidad de modificarlas y, por ende, prolongar la vida útil de la columna. Los cambios bruscos en la presión pueden producir reacomodamiento en el material de relleno de la columna, y, consecuentemente, volúmenes muertos. Este efecto resulta más marcado en las columnas cuyos materiales de relleno tienen menores diámetros de partícula porque generan mayores presiones. Por ese motivo no se debe poner en funcionamiento la bomba en el caudal de trabajo, sino que debe llegar lentamente hasta el mismo en pasos de no más de 0.5 mL por vez.

La disolución del material relleno de la cabeza de la columna es otra de las causas que originan volúmenes muertos. Este fenómeno se debe a la solubilización de la sílice (soporte base de las mayoría de las columnas de uso corriente) en fases móviles acuosas.

La modificación de la retención de los picos es el último problema que puede relacionarse a las columnas. Esta modificación puede manifestarse como una variación en los tiempos de retención de todos los picos en el cromatograma, en tal caso la resolución puede no verse afectada, o puede verificarse en algunos picos y no en otros. En el último caso la separación entre bandas puede cambiar mejorando o empeorando la resolución. Este problema debe enfrentarse de diferente manera ya sea que se manifieste en una misma columna (e instrumento) o que ocurra al cambiar la columna por otra supuestamente equivalente. Esta modificación de retención se puede deber a: Problemas en el funcionamiento de la bomba, deficiencias en la preparación de la fase móvil,

cambios en la composición de la fase móvil, variaciones de temperatura, falta de equilibrio de la fase móvil, cambios en la superficie activa de la columna, y variabilidad en las columnas.

Bomba.- Las bombas de HPLC impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector, y después hacia la columna. Su caudal de trabajo puede ser muy variable, según la escala de trabajo escogida. Existen bombas capaces de entregar caudales muy pequeños, del orden de los microlitros/minuto para la cromatografía microbore, pasando a caudales de unos pocos mililitros/minuto para la cromatografía analítica convencional hasta valores mucho mayores para las separaciones semipreparativas y preparativas. Básicamente existen dos tipos de bomba, las de pistón (bombas reciprocantes) y las de desplazamiento continuo (bombas jeringa). Las primeras son las de uso más difundido; son muy versátiles y fáciles de adaptar a la rutina del laboratorio. Las segundas no emiten pulso en la entrega del solvente.

La bomba jeringa es, a diferencia de las bombas reciprocantes, un dispositivo de desplazamiento continuo. Es decir, el solvente contenido en un cilindro es impulsado hacia el inyector por medio de un movimiento continuo y hacia adelante del pistón. El recorrido del pistón, y el volumen desplazado es, en los casos en que se aplica, suficiente para efectuar un número determinado de ensayos completos, sin necesidad de recargar su cámara.

Inyectores.- el inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema. El inyector debe reunir una serie de características importantes, entre ellas:

- ◆ Debe ser fácil de operar.
- ◆ Debe ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones.
- ◆ Debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.
- ◆ No debe provocar diluciones importantes de la solución inyectada.

Actualmente la totalidad de los inyectores de HPLC son válvulas que orientan el caudal hacia la columna, pasando o no según su posición, a través de un loop en el cual se introduce la solución a inyectar. Las válvulas pueden accionarse manual o automáticamente.

Están constituidas por un cuerpo fijo, un rotor con un sello que gira y un loop de muestra externo que contiene la muestra. El loop es intercambiable, de modo que la cantidad de muestra inyectada puede escogerse entre una serie de medidas estándar (en los inyectores convencionales, entre 5 y 2000 μ l)

Las válvulas de inyección de 6 vías, pueden accionarse eléctrica o neumáticamente y se utilizan en la construcción de inyectores automáticos. La precisión obtenida con estos inyectores es en general superior a la de métodos manuales, porque no dependen de la habilidad del operador, Los inyectores Automáticos deben contener, además de la válvula de inyección y del mecanismo que permite su llenado, un dispositivo para colocar las muestras a inyectar, en general un carrusel que aloja viales donde se coloca las muestras. Las válvulas se accionan con motores eléctricos o por medios neumáticos ya sea empleando aire comprimido, nitrógeno o helio. Algunos equipos permiten controlar el avance y el retroceso del carrusel, De esta manera es posible que el vial conteniendo la solución estándar sea inyectada al principio del análisis e intercalarse tantas veces como sea necesario entre las soluciones muestra ya sea para control de la precisión o para recalibrar el instrumento.

Detectores. - El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite “ver” y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.

Los detectores deben reunir ciertas características entre ellas:

Tener un amplio rango dinámico de respuesta. - El rango de concentraciones de una sustancia en análisis en la que un cambio en la concentración produce un cambio en la señal, por ejemplo 10, esto nos indica que se podrá analizar un microcomponente en presencia de un macrocomponente sin mayores dificultades.

Poseer una respuesta lineal.- El detector debe medir algunas propiedades del analito que se incremente linealmente al aumentar su concentración. Se denomina rango lineal de un detector al rango de concentraciones que produce una respuesta lineal, este rango está incluido en el rango dinámico.

No contribuir al ensanchamiento de banda extracolumnar.- En esta característica entran en juego tanto las dimensiones de la celda como la longitud y diámetro de la tubería de conexión. Para evitarlo, la celda del detector deberá tener un volumen tan pequeño como sea posible sin que ello perjudique la sensibilidad de la detección (en el caso del detector UV por disminución del camino óptico). Para las columnas analíticas el volumen de celda habitualmente está en el orden de los 3 a 12 μl .

Responder a todos los solutos.- La situación ideal es, obviamente, que el detector responda a todo tipo de solutos, pero esto no siempre es posible en HPLC debido a que para la detección deben obtenerse instrumentos capaces de medir una propiedad diferencial entre un líquido (la fase móvil) y un sólido (los analitos disueltos).

Poseer una buena relación señal/ruido.- El ruido de un detector es la máxima amplitud de la combinación de los términos de ruidos largos y cortos en un período de tiempo dado, por ejemplo 15 minutos. Estas perturbaciones que se producen en la línea de base del detector se deben a la electrónica propia del instrumento, a problemas relacionados con las variaciones de temperatura, oscilaciones de la tensión de la línea eléctrica (lo cual en gran medida puede reducirse realizando una buena conexión a tierra de todo el instrumento), o a fluctuaciones en el caudal. (25)

No destruir la muestra.- Esta propiedad es una característica de casi todos los detectores de HPLC (excepto el electroquímico), y resulta muy importante cuando se desea recolectar al analito aislado, por ejemplo en cromatografía preparativa.

Tener una constante de tiempo baja.- La constante de tiempo de un detector indica la velocidad con que éste responde a un cambio instantáneo de la concentración del analito. Los valores habituales de la constante de tiempo de un detector cromatográfico son 0.5, 1.0 y 5.0 y pueden escogerse por medio de filtros de ruido electrónico.

Los detectores pueden clasificarse en generales y selectivos:

Los detectores generales, miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura. Ejemplos típicos son el detector de índice de refracción y el de conductividad. Los detectores selectivos son aquellos sensibles a alguna propiedad propia del soluto, por ejemplo el detector UV, que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda dada. Otro ejemplo es el detector de fluorescencia, empleado para la detección de solutos con fluorescencia natural o conferida por reacción con un reactivo fluorogénico.

Detectores selectivos, siendo el más conocido el detector de UV.

Detector UV.- Es el detector más empleado en HPLC. Posee buena sensibilidad y rango lineal, y permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de solventes, con la única limitación de que éstos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo. En general permiten cambiar el volumen de su celda, típicamente con volúmenes de 1 a 12 μl . Es un detector muy poco sensible a los cambios de caudal y de temperatura. El detector UV opera en el rango 190 a 350nm, y en algunos equipos se puede extender a la zona del visible del espectro (350 a 700 nm) recibiendo así el nombre de detector UV/Visible. (25)

Sistema de toma y procesamiento de datos.- El resultado del ensayo cromatográfico es, por un lado, la obtención de fracciones separadas de los componentes de la muestra, y por el otro, la de un gráfico o cromatograma, de cuya interpretación pueden extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas. Este registro y la eventual manipulación se obtienen a partir de la señal proveniente del detector por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos, entre los que podemos citar:

Registrador gráfico, que convierte la señal en un gráfico del tipo X – Y.

Integrador, que permite no sólo obtener un registro gráfico (cromatograma) sino también su tratamiento matemático para el cálculo de concentraciones.

Computadora Básica, el integrador es una computadora de uso muy específico. En este punto nos referimos a una computadora de tipo “personal”, que permite con el software apropiado tanto el registro gráfico del cromatograma como los cálculos apropiados, la manipulación de datos, el

almacenamiento de ensayos, generación de reportes, e incluso el manejo global de varios cromatógrafos. Como las computadoras necesitan señales digitalizadas, se necesita una interfase analógica digital que convierte la señal analógica entregada por el detector.

Cuando se conocen las características del equipo a utilizar, se procede a desarrollar o adaptar un método que nos sea útil.

La concentración del analito en la muestra se puede calcular por diferentes métodos, los cuales son:

- Normalización interna (Estandarización interna)
- Estándar externo
- Estándar interno
- Estándar agregado

El Método del Estándar interno consiste en agregar cantidades exactamente medidas de una sustancia así denominada, tanto a la muestra como a un estándar que contiene al analito, preparado con la misma concentración que la muestra.

Para determinar la concentración de analito en la muestra se calcula la relación de áreas de analito a estándar interno en la muestra y en el estándar se efectúa el cociente entre ambas. Es decir :

$$P = R_m C_s / R_s \cdot D \cdot 100$$

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra, R_m y R_s son las relaciones de área de analito a estándar interno en la muestra y el estándar respectivamente, C_s es la concentración del estándar y D es un factor de dilución.

Este método requiere de patrones de referencia, al igual que el método de Estándar Externo, por lo cual su exactitud dependerá de la pureza de los mismos. Además requiere del uso de otra sustancia, el estándar interno, cuya pureza no tiene que ser tan controlada como la del patrón de referencia, pero debe cumplir con los siguientes requisitos:

- No debe estar presente en la muestra
- Debe presentar un área similar al analito
- Debe eluir a un valor de K' cercano al analito
- Debe resolverse completamente ($R > 1.5$)
- Debe ser estable y químicamente inerte
- Debe responder en forma semejante al analito con el detector seleccionado

El método del Estándar Interno no es sensible a los errores de inyección debido a que estos errores se compensan al utilizar relaciones de áreas, en algunos casos, pueden compensarse los errores generados en la preparación de la muestra como puede ser dilución, extracción y derivatización.

La utilidad el estándar interno para compensar los errores de dilución es innegable, aunque en el caso de la derivatización y extracción, los resultados deben manejarse con cuidado porque es posible empeorar los resultados en lugar de mejorarlos.

El uso de estándar interno para compensar los errores de inyección es prácticamente obligado en GC (Cromatografía de Gases) porque el error de inyección es grande, pero tiene menor sentido en HPLC donde éstos son mucho menores. Las opiniones respecto de las utilidades del estándar interno son bastantes dispares. Muchos autores recomiendan su uso para obtener presiciones analíticas aceptables mientras que otros pregonan que su utilización no es necesaria. Por ello es aconsejable evaluar la utilidad del estándar interno en cada caso en particular.

Se debe considerar que se agrega un pico más al cromatograma, por lo cual la separación se hace más compleja. De todas maneras, si se desea utilizar un estándar interno solamente para compensar los errores de inyección no es necesario aislar o adquirir sustancias semejantes al analito. (25)

Una vez desarrollado un método de análisis por HPLC, al igual que toda técnica analítica, deberá validarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados por él producidos son confiables.

Existen dos tipos de validación, la validación retrospectiva, donde se pueden combinar los nuevos criterios de validación con toda la experiencia ya adquirida y validación prospectiva a la que nos encaramos frente a un producto nuevo.

En muchos casos un método analítico es desarrollado y validado por un grupo de trabajo, típicamente el laboratorio de desarrollo analítico y aplicado por otro grupo, por ejemplo el laboratorio de control de calidad. Para asegurar que el laboratorio de aplicación sea capaz de entregar a su vez resultados confiables, es conveniente realizar una transferencia de validación. En el caso de métodos cromatográficos, la transferencia consiste en la comparación de resultados de las pruebas de adecuación y de análisis en paralelo de, al menos dos muestras homogéneas de concentraciones conocidas, dentro del rango de aceptación del producto o dentro del rango de aplicación de la metodología.

Por otra parte debe considerarse la revalidación. La revalidación se hace necesaria con métodos previamente validados, pero que deben volver a evaluarse por variaciones de algún factor instrumental (cambio de equipo o de alguno de sus componentes, del tipo u origen de columna, etc.) de la matriz que contiene la muestra o de la proporción relativa del analito.

En un ensayo de validación deben considerarse los siguientes parámetros.

- ◆ Selectividad (especificidad)
- ◆ Linealidad
- ◆ Exactitud
- ◆ Reproducibilidad
- ◆ Repetibilidad.

La selectividad o especificidad, este parámetro se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida sólo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes en la matriz de la muestra. Estos compuestos pueden ser excipientes de un fármaco, productos de degradación, subproductos o productos laterales de síntesis de un fármaco, metabolitos del mismo analito en un fluido biológico, etc. En el caso del análisis de un fármaco, resulta de gran utilidad

contar con las materias primas, subproductos de síntesis y productos de degradación. De ser así, la selectividad puede controlarse simplemente por la adición de, por ejemplo, 1% de cada posible interferente al estándar de fármaco puro, verificando la separación cromatográfica.

En el caso que los productos de descomposición sean desconocidos o no puedan aislarse, el camino a seguir podría comprender los siguientes pasos (sin descartar una búsqueda bibliográfica previa que permita orientar o sustentar los ensayos a efectuar)

En primer lugar se evalúa la estructura química del fármaco y se postulan las posibles rutas de degradación y métodos de ataque.

Se pasa luego a un ensayo de degradación artificial, por ejemplo:

1. Termólisis, producida por calentamiento del fármaco a la temperatura fijada (por ejemplo 105°C)
2. Hidrólisis, por calentamiento o reflujo con agua durante 1hr.
3. Hidrólisis alcalina, por calentamiento a reflujo con NaOH 1N durante 1hr.
4. Hidrólisis ácida, por calentamiento a reflujo con HCl 1N durante 1 hr.
5. Fotólisis, por exposición del fármaco puro y de una solución de la misma a la luz UV de onda corta y a la luz solar directa o indirecta.
6. Oxidación, por calentamiento en baño maría de una solución del fármaco con gotas de agua oxigenada o por burbujeo de oxígeno.

Linealidad de un método se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Este paso de la validación es necesario si se va a trabajar con un sólo estándar en las determinaciones de rutina, aunque puedan aceptarse métodos no lineales, si se opera con estándares múltiples cada vez. Además conjuntamente se determina el rango lineal, es decir el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede calcular la concentración por interpolación en una curva estándar.

Precisión, está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar, (STD), estimada analíticamente por S o más comúnmente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (C.V.)

Exactitud, la exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se le han adicionado cantidades conocidas de las sustancias.

Reproducibilidad, es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o diferentes laboratorios utilizando el mismo y/o diferentes equipos).

Repetibilidad, es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio). (25,26)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Difenhidramina es un fármaco que presenta problemas de inestabilidad física, debido a la presencia de grupos funcionales sensibles como el oxidrilo, este problema puede traer complicaciones en el desarrollo de formulaciones, debido a que la presencia de humedad o temperaturas altas puede provocar degradación del principio activo y sería imposible realizar un proceso de granulación por vía húmeda, etapa inicial para la manufactura de tabletas. Por lo que surge la necesidad de preparar un complejo con β -ciclodextrina como una alternativa que permita mejorar la estabilidad de este fármaco, ya que a través de la complejación se protegen grupos funcionales sensibles a la degradación o a la interacción.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Formar y caracterizar el complejo de inclusión Difenhidramina- β -ciclodextrina, adaptar un método analítico para evaluar la estabilidad del complejo y de la difenhidramina.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Formación del complejo Difenhidramina - β -ciclodextrina.
2. Caracterizar el complejo de inclusión Difenhidramina- β -ciclodextrina por Infrarrojo (IR), Ultravioleta (UV) y por análisis calorimétrico utilizando el método de Calorimetría de Exploración Diferencial (DSC).

3. Adaptar un método analítico de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) apropiado para evaluar el perfil de estabilidad de la Difenhidramina.

4. Llevar a cabo el estudio de estabilidad de la Difenhidramina y del complejo (Difenhidramina- β -ciclodextrina).

5. HIPOTESIS DEL TRABAJO

Referencias bibliográficas reportan que la formación de complejos de inclusión de la β -ciclodextrina con diversos fármacos es un mecanismo útil para incrementar la estabilidad del fármaco, por lo que al realizarse la complejación de la difenhidramina con las β -ciclodextrina, se aumentara la estabilidad del fármaco al proteger los grupos funcionales sensibles.

6. METODOLOGÍA

6.1 EQUIPOS

- ◆ Cromatografo de líquidos serie 200 LC de PERKIN ELMER
- ◆ Espectrofotómetro UV / VIS Lambda 2 de PERKIN ELMER
- ◆ Espectrofotómetro Infrarrojo serie 1600 de PERKIN ELMER
- ◆ Balanza Analítica OHAUS ANALYTICAL PLUS
- ◆ Calorímetro DSC7 DE PERKIN ELMER

6.2 MATERIAL

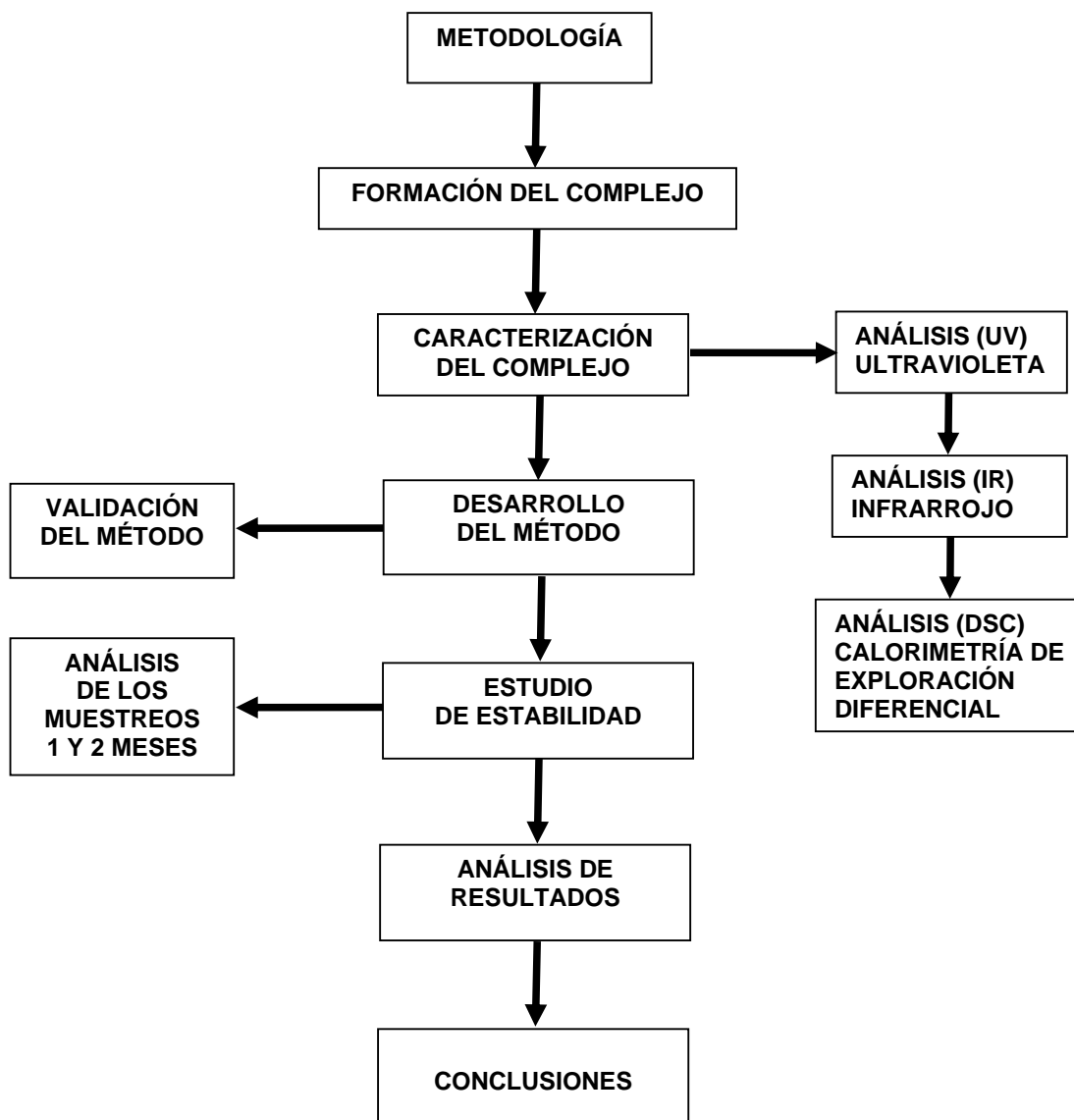
- Viales de plástico de 25 ml. con tapa de rosca
- Pipetas volumétricas de 5 y 10 ml.
- micropipeta de 100, 200, y 500 μ l. eppendorf
- Matraz aforado de 200, 12 de 10, 12 de 25 y 6 de 1ml.
- Vasos de precipitado de 1000, 1 de 600, 2 de 250 y 2 de 100 ml.
- microespátula
- Mortero de mano con pistilo
- Prensa con aditamentos osyma
- Mortero ágata
- Pipeta Pasteur
- Parrilla de calentamiento - agitación Lindborg
- Perilla de seguridad
- Piseta de 500 ml
- Termómetros de 10 a 110C°
- Higrómetros
- Agitador de vidrio
- Cámaras de humedad

- Equipo de filtrado millipore con bomba de vacío waters modelo Doa U152-AA
- Equipo de filtrado de agua Milli-Q Reagent Water System
- Papel filtro
- Embudo de talle corto
- Filtros set pak water para columna C18
- 1 jeringa de 10 ml.
- 1 bureta de 10 ml.

6.3 REACTIVOS

- Acetonitrilo grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Sulfato de amonio
- Cloruro de sodio
- Acido clorhídrico 0.1N
- Acido clorhídrico fumante
- Clorhidrato de bromhexina std.
- Clorhidrato de difenhidramina std.
- β -ciclodextrina
- Bromuro de potasio
- Peróxido de hidrógeno

6.3 DIAGRAMA DE BLOQUES DEL MÉTODO



6.5 MÉTODO

El método utilizado para la formación del complejo fue mezcla de polvos y se realizó de la siguiente forma:

6.5.1. Formación del complejo

Pesar aproximadamente 23.33g de β -ciclodextrina (equivalentes a 0.0206moles), adicionar 6 gr de difenhidramina (equivalentes a 0.0206moles), en pequeñas porciones en un mortero y pulverizar por 45 minutos.

6.5.2 Caracterización del complejo

a) Análisis ultravioleta

Por triplicado pesar aproximadamente 10 mg. de difenhidramina y la cantidad en miligramos del complejo equivalentes a 10 mg. de difenhidramina. Adicionar 10 ml de metanol y vortexear las soluciones, filtrar las soluciones de los complejos. Tomar 400 μ l. de las soluciones (difenhidramina y complejos) y llevar a 1 ml (concentración final aproximada de 400 μ l/ml) con metanol. Realizar un barrido del espectro en un rango de 350 - 210 nm de cada una de las soluciones de difenhidramina y complejos, empleando metanol como blanco.

b) Análisis infrarrojo

Pesar una muestra de aproximadamente 10 mg. de difehidramina una muestra de 6.3 mg. de β -ciclodextrina y tres muestras de 48.41mg. de complejo, Preparar pastillas con bromuro de potasio y correr el espectro I.R.

c) Análisis por calorimetría de exploración diferencial

Pesar una muestra de 2 mg de difenhidramina, una muestra de 8 mg. de β -ciclodextrinas y tres muestras de complejo de 10.3 mg.

Realizar un barrido en el calorímetro de exploración diferencial en un rango de temperatura de 50 a 300°C a un incremento de temperatura de 10°C / 3 min.

6.5.3. Desarrollo y validación del método analítico

a) Fase Móvil

Preparar fase móvil (metanol 79.5% y 20.5% de sulfato de amonio p/v). Adicionar 104 ml de sulfato de amonio al 1 % y 420 ml de metanol grado HPLC en un vaso de precipitado de 600 ml, agitar y filtrar por millipore.

Colocar un flujo de 2.0 ml /min. con una longitud de onda de 258nm, acoplar la columna por 3 hrs., inyectar 50 μ l. de cada muestra.

b) Solución stock de difenhidramina

Pesar el equivalente a 10 mg de difenhidramina y llevar a un volumen de 10 ml con agua destilada para tener una concentración de 1mg/ml. Sonicar por 5 minutos.

c) Solución stock de estándar interno

Pesar el equivalente a 10mg de bromhexina y llevar a un volumen de 10 ml con agua destilada para tener una concentración de 1mg/ml. Sonicar por 5 minutos.

d) Solución de difenhidramina y estándar interno

Colocar 2 ml de solución stock de difenhidramina en un matraz aforado de 10 ml, adicionar 500 μ l de estándar interno y llevar a volumen de 10 ml con fase móvil.

CONDICIONES INSTRUMENTALES

| | |
|------------------------------------------|---------------------------------------|
| - Columna: | C ₁₈ de 15 cm de longitud. |
| - Lambda (λ) : | 258 nm. |
| - Flujo: | 2 ml/min. |
| - Volumen de inyección: | 50 μ l. |
| - Presión Mínima: | 10 psi |
| - Presión Máxima: | 3670 psi |
| - Modo: | Absorbancia |
| - Sensibilidad: | 0.500 AUFS |
| - Polaridad: | positiva |
| - Carta Cero: | 0% |
| - Constante de Tiempo: | 5 |

6.5.4 Validación del método analítico

a) Linealidad del sistema

Pesar por triplicado 10 mg de difenhidramina, llevar a un volumen de 10 ml con fase móvil, tomar alícuotas de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, y 3.0 ml respectivamente y colocarlos en matraces independientes, adicionar 500 μ l de la solución stock de estándar interno y llevar a un volumen de 10 ml con fase móvil, inyectar por duplicado 50 μ l de estas soluciones al cromatógrafo para tener concentraciones respectivas de 5.0, 7.5 ,10.0 12.5 y 15.0 μ g/ml.

b) Linealidad del método

Pesar por triplicado el equivalente a 10 mg de difenhidramina de complejo β -ciclodextrina-difenhidramina , llevar a un volumen de 10 ml con fase móvil, tomar alícuotas de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, y 3.0 ml respectivamente y colocarlos en matraces independientes, adicionar 500 μ l de la solución stock de estándar interno a cada matraz y llevar a un volumen de 10 ml con fase móvil, inyectar por duplicado 50 μ l de estas soluciones al cromatógrafo de líquidos para tener concentraciones de 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 y 15.0 μ g/ml.

c) Exactitud

- Pesar 23.38 gr de β - ciclodextrina y 6.0 grs de difenhidramina equivalentes a una proporción molar 1:1 colocarlos en un mortero y pulverizarlos en pequeñas porciones, mezclar por aproximadamente 45 minutos.

- Pesar el equivalente a 10 mg de difenhidramina de complejo β -ciclodextrina-difenhidramina , llevar a un volumen de 10 ml con fase móvil, tomar alícuotas de 2 ml y colocarlo en un matraz , adicionar 500 μ l de la solución stock de estándar interno y llevar a un volumen de 10 ml con fase móvil, para obtener una concentración de 10 μ g/ml.

- Pesar seis muestras de difenhidramina de 10mg, llevar a 10 ml con fase móvil, tomar seis alícuotas de 2 ml y colocarlos en matraces independientes, adicionar 500 μ l de la solución stock de estándar interno y llevarlos a un volumen de 10 ml con fase móvil, inyectar por duplicado 50 μ l de cada una de las soluciones al cromatógrafo para obtener concentraciones de 10 μ l / ml.

d) Reproducibilidad

- Pesar por triplicado el equivalente a 10 mg de difenhidramina de complejo β -ciclodextrina- difenhidramina, llevarlos a un volumen de 10 ml con fase móvil, tomar alícuotas de 2 ml en matraces independientes, adicionar 500 μ l de la solución stock de estándar interno a cada matraz y llevar a 10 ml con fase móvil, inyectar por duplicado 50 μ l de estas soluciones al cromatógrafo para obtener concentraciones de 10 μ l / ml. (esto se realiza por analista).

Pesar 10 mg de difenhidramina , llevar a un volumen de 10 ml con fase móvil, tomar tres alícuotas de 2 ml y colocarlas en matraces independientes, adicionar 500 μ l de la solución stock de estándar interno a un matraz y llevar a 10 ml con fase móvil, inyectar por duplicado 50 μ l de esta solución para obtener una concentración de 10 μ l/ml. (esto se realiza por analista).

Efectuar la prueba con dos analistas en dos días diferentes.

e) Precisión

- Pesar el equivalente a 10 mg de difenhidramina de complejo β -ciclodextrina - DPH, llevar a un volumen de 10 ml con fase móvil, tomar una alícuota de 2 ml colocarlas en un matraz y adicionar 500 μ l de la solución de estándar interno y llevar a un volumen de 10 ml con fase móvil, inyectar 50 μ l de esta solución por sextuplicado al cromatógrafo de líquidos.

f) Por ciento de recobro

- Pesar seis muestras de complejo equivalente a 10 mg de difenhidramina, llevar a un volumen de 10 ml con fase móvil, tomar seis alícuotas de 2 ml y colocarlas en matraces independientes, adicionar 500 μ l de la solución de estándar interno y

Llevar a un volumen de 10 ml con fase móvil, inyectar por duplicado 50 μ l de estas soluciones para obtener concentraciones de 10 μ g / ml.

- Pesar seis muestras de 10 mg de difenhidramina, llevar a 10 ml con fase móvil, tomar alícuotas de 2 ml en matraces independientes, adicionar 500 μ l de solución stock de estándar interno y llevar a un volumen de 10 ml con fase móvil, inyectar por duplicado 50 μ l de estas soluciones para obtener concentraciones de 10 μ g / ml.

g) Especificidad (termólisis)

I. Degradación ácida

Pesar 3 muestras de 20 mg. de difenhidramina y colocarles 1, 2 y 3 gotas de HCL 0.1 N respectivamente en cada muestra y adicionarles 20 ml de fase móvil, inyectar 50 μ l. de cada muestra.

II. Degradación por Oxidación

Pesar 3 muestras de 20 mg de difenhidramina y colocarles 1, 2 y 3 gotas de peróxido de hidrógeno respectivamente en cada muestra y adicionarles 20 ml de fase móvil, inyectar 50 μ l. de cada muestra.

III. Degradación por termólisis

Pesar 5 muestras de 20 mg de difenhidramina , colocar las muestras en una parrilla de calentamiento a 100°C, retirar las muestras a los 8, 10, 12, 14, y 16 minutos y adicionarles 20 ml de fase móvil, inyectar 50 μ l de cada muestra.

Las soluciones son filtradas a través de papel filtro poro mediano y posteriormente por filtro set-pack waters para columna C18.

6.5.5 Estudio de estabilidad

Se prepararon tres cámaras con una humedad relativa de 75% aproximadamente y se colocaron en las estufas de estabilidad de 20, 40, y 60 °C, de la siguiente manera:

I) Se prepararon soluciones saturadas de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y de cloruro de sodio (NaCl).

Se colocaron 400 ml de solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ más 200 ml de solución saturada de NaCl en la cámara, se sella y se introduce a la estufa de estabilidad de 60°C, se deja por 4hrs. para que se establezca la temperatura y la humedad dentro de la cámara.

II) Se colocaron 250 ml de solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ más 400 ml de solución saturada de NaCl en la cámara, se sella y se introduce a la estufa de estabilidad de 40°C, se deja por 4hrs. para que se establezca la temperatura y la humedad dentro de la cámara.

III) Se colocaron 150 ml de solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ más 500 ml de solución saturada de NaCl en la cámara se sella y se introduce a la estufa de estabilidad de 20°C, se deja por 4hrs. para que se establezca la temperatura y la humedad dentro de la cámara.

IV) Se sacó la cámara de la estufa de 60°C y se le colocó el higrómetro, se sella y se vuelve a introducir a la estufa por 2hrs. (esto se realizó para que la lectura tomada fuera más real, después de dos horas de estabilización), se toma la lectura de temperatura y humedad relativa de la cámara. Este paso se realiza también para las cámaras de 40 y 20°C respectivamente.

V) Después de haber alcanzado la humedad de 75 % en las tres cámaras se realizaron 27 pesadas de 0.5 gr de difenhidramina y 27 pesadas de 0.5 gr de complejo las cuales se colocaron en 54 viales de 10 ml.

VI) Se colocaron 9 viales de difenhidramina y 9 viales de complejo en cada cámara.

VII) Se realizó el primer muestreo después de un mes se tomaron 3 viales de difenhidramina y 3 viales de complejo de cada cámara.

Las muestras se prepararon de la siguiente manera:

-Se preparó una solución stock de difenhidramina, se pesaron 10 mg y se llevaron a 10 ml con fase móvil, se tomaron 2ml en un matraz y se llevaron a 10 ml con fase móvil.

-Se preparó una solución stock de bromhexina, se pesaron 25 mg y se llevaron a 25 ml con fase móvil, se tomaron 0.5 ml en un matraz y se llevaron a 10 ml con fase móvil.

-Se inyectaron intercaladamente 3 muestras de solución stock difenhidramina-bromhexina al inicio, mitad y final de la corrida de inyecciones del muestreo.

-Se adicionaron 5 ml de fase a cada vial de difenhidramina y complejo respectivamente.

-Se tomaron 200 μ l de cada uno de los viales de difenhidramina en matraces independientes y se llevaron a un volumen de 1ml con fase móvil.

-Se tomaron 100 μ l de esta solución, se les adiciono 500 μ l de solución stock de bromhexina y se llevaron a 10 ml con fase móvil, se inyectaron por duplicado 50 μ l de cada una de las soluciones.

-Se tomaron 200 μ l de cada uno de los viales de complejo en matraces independientes y se llevaron a un 1 ml con fase móvil.

-Se tomaron 500 μ l de esta solución, se les adiciono 500 μ l de solución stock de bromhexina y se llevaron a 10 ml con fase móvil, se inyectaron por duplicado 50 μ l de cada una de las soluciones.

Las inyecciones al cromatógrafo se realizaron de la siguiente forma:

- ◆ Muestra de solución stock de difenhidramina - bromhexina.
- ◆ Muestras de difenhidramina expuesta a 20°C.
- ◆ Muestras de difenhidramina expuesta a 40°C.
- ◆ Muestras de difenhidramina expuesta a 60°C.
- ◆ Muestra de solución stock de difenhidramina - bromhexina.
- ◆ Muestras de complejo expuesto a 20 °C.
- ◆ Muestras de complejo expuesto a 40°C.
- ◆ Muestras de complejo expuesto a 60°C.
- ◆ Muestra de solución stock de difenhidramina – bromhexina.

-Se realizó el segundo muestreo después de dos meses del estudio de estabilidad, se tomaron 3 viales de difenhidramina y 3 viales de complejo de cada cámara. Se siguió la misma metodología para el análisis de las muestras.

7. RESULTADOS

7.1 Formación del complejo

La formación del complejo difenhidramina- β -ciclodextrina se logró, el método usado para la formación fue mezcla de polvos, el complejo obtenido fue evaluado por el método de Espectroscopia Ultravioleta, Espectroscopia de Infrarrojo y Calorimetría de Exploración Diferencial, se observan los siguientes resultados.

La caracterización por Espectroscopia Ultravioleta se realizó comparativamente con una muestra de difenhidramina y tres de complejo no encontrándose diferencia entre ellos, esto se debe a que la β -ciclodextrina no absorbe en ésta región. Fig. 1 y 2.

7.2 Espectros ultravioleta comparativos

ESPECTROS ULTRAVIOLETA COMPARATIVOS

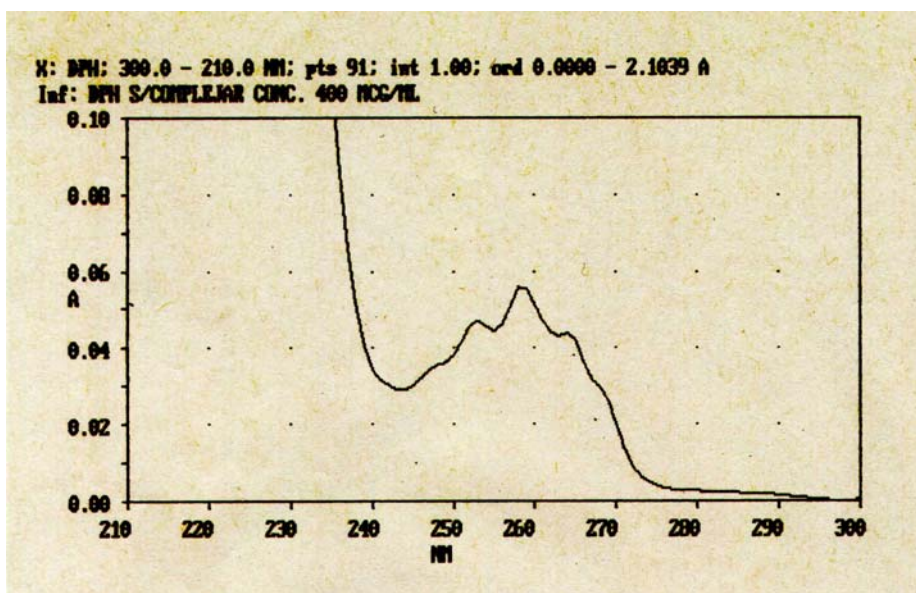


Fig. 1 Espectro de difenhidramina sin complejar.

ESPECTROS ULTRAVIOLETA COMPARATIVOS

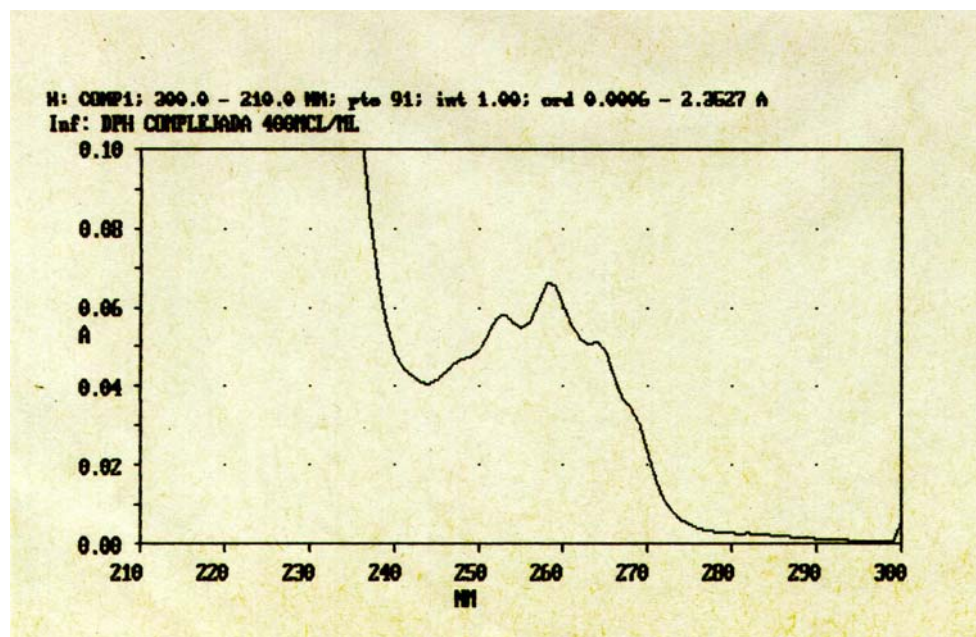


Fig.2 Espectro de difenhidramina complejada

En la comparación los espectros de la difenhidramina y complejo tienen una gran semejanza ya que las β -ciclodextrinas no absorben en la región lo cual se demuestra ya que el espectro que prevalece es el de la difenhidramina.

La caracterización por Espectroscopia de Infrarrojo se realizó comparativamente con una muestra de difenhidramina, una de β -ciclodextrina y tres de complejo, los espectros muestran que la complejación se logró, ya que los grupos funcionales (aminos y oxidrilos de la difenhidramina estaban protegidos por la β -ciclodextrina. Fig. 3, 4, y 5.

7.3 Espectros infrarrojos comparativos

ESPECTROS INFRARROJOS COMPARATIVOS

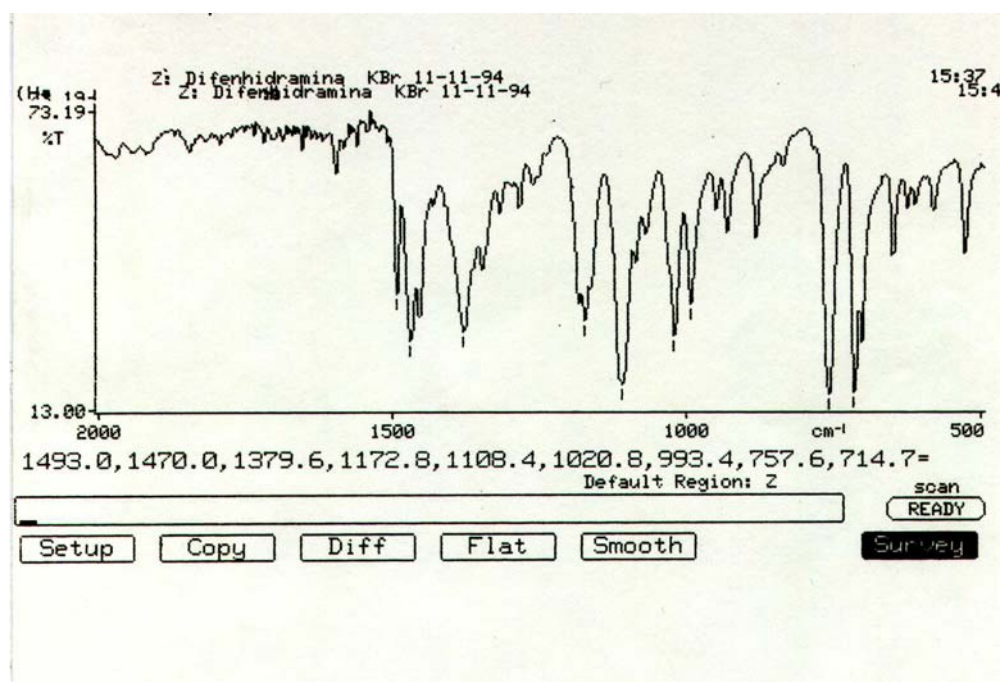


Fig. 3 Espectro de difenhidramina sin complejar

ESPECTROS INFRARROJOS COMPARATIVOS

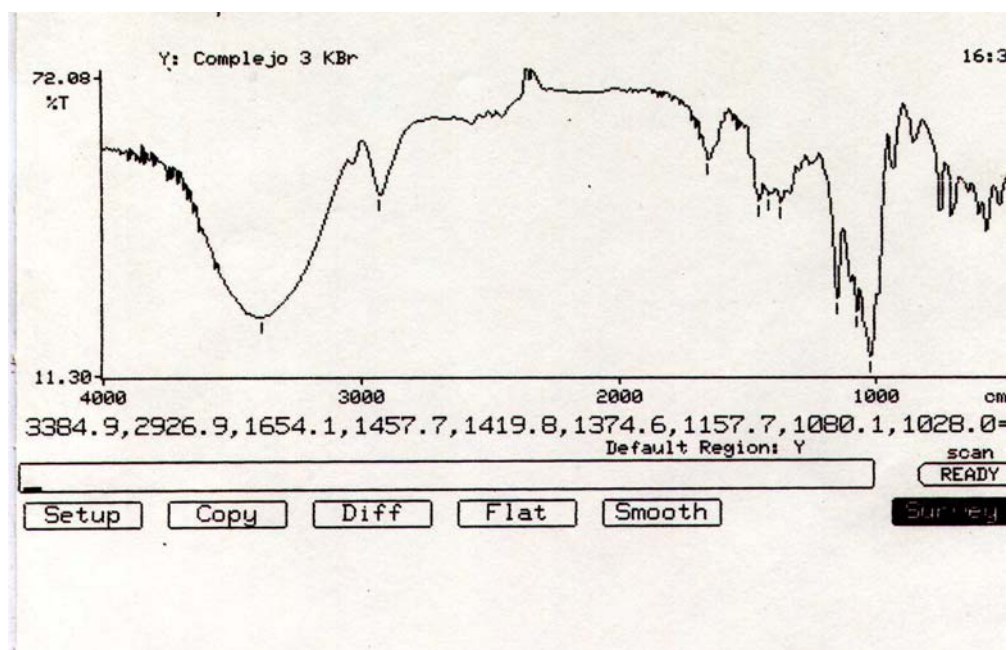


Fig. 4 Espectro del complejo (difenhidramina- β -ciclodextrina)

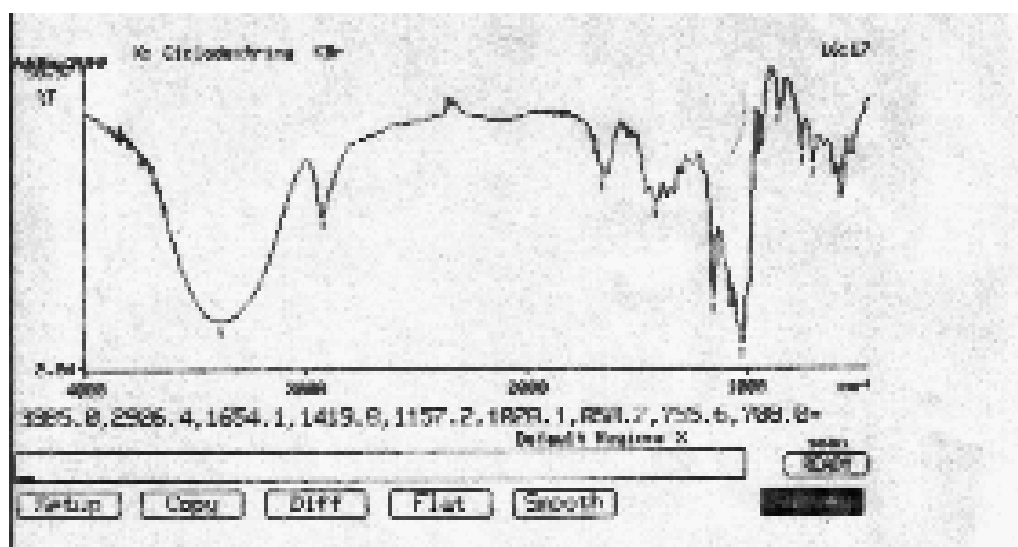


Fig. 5 Espectro de β -ciclodextrina sin complejo

En la comparación los espectros de la difenhidramina, β -ciclodextrina y complejo se encuentra una gran semejanza los espectros de la β -ciclodextrina y la del complejo lo cual muestra que en la complejación se encapsulo a la difenhidramina protegiendo a sus los funcionales más sensibles.

La caracterización por Calorimetría de Exploración Diferencial se realizó comparativamente con una muestra de difenhidramina, una de β -ciclodextrina y tres de complejo, los espectros muestran que la complejación fue favorable ya que la temperatura de fusión de β -ciclodextrina y difenhidramina se modificaron de 104.52 a 107.58 °C y de 170.35 a 220.83 °C respectivamente. Fig. 6, 7 y 8.

7.4 Espectros de calorimetría de exploración diferencial comparativos

ESPECTROS DE CALORIMETRÍA DE EXPLORACION DIFERENCIAL COMPARATIVOS

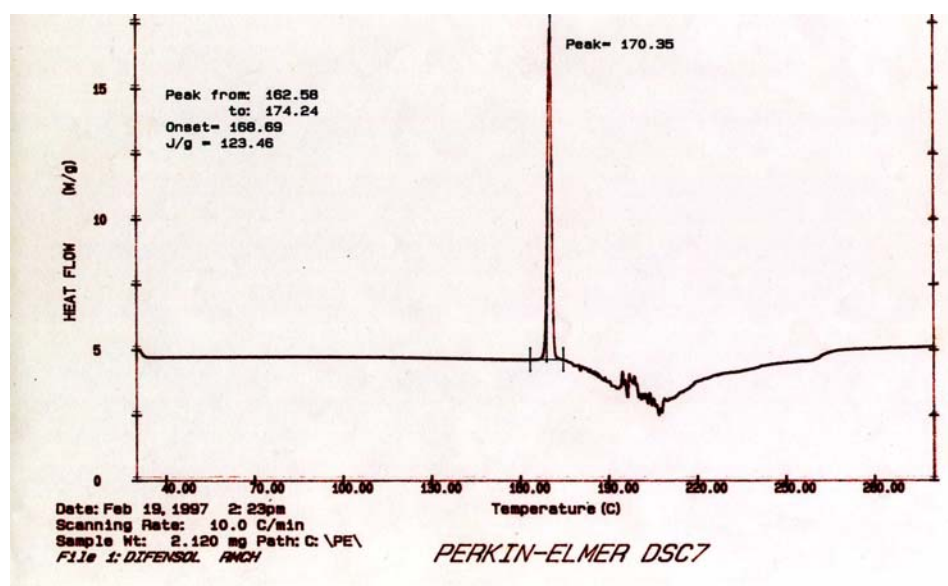


Fig. 6 Espectro de difenhidramina sin complejar.

ESPECTROS DE CALORIMETRIA DE EXPLORACION DIFERENCIAL COMPARATIVOS

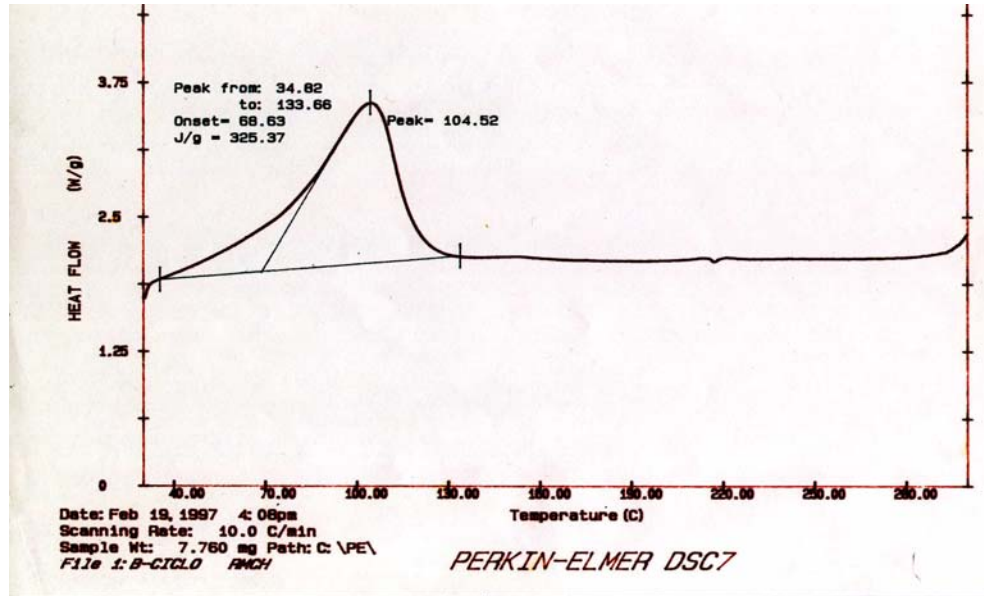


Fig. 7 Espectro de β -ciclodextrinas sin complejar.

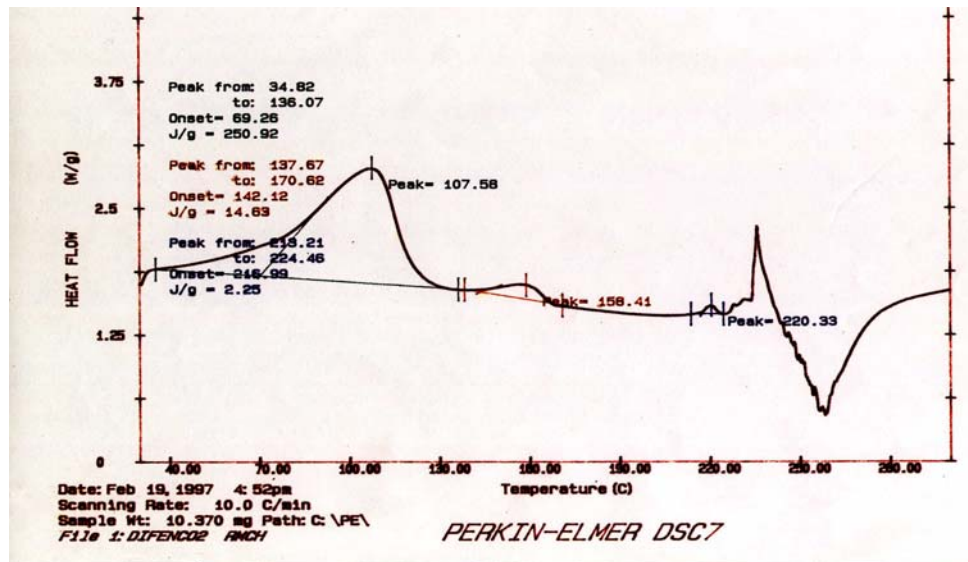


Fig. 8 Espectro del complejo (difenhidramina- β -ciclodextrina)

En la comparación de los espectros de la difenhidramina, β -ciclodextrina y complejo se encuentra que en el espectro del complejo el pico que corresponde a la difenhidramina se ve modificada la temperatura de degradación aumentando está durante la complejación.

7.5 Validación del método

a) Linealidad del Sistema

Tabla 4 Muestra los resultados de la linealidad del sistema

| CONCENTRACIÓN | REPLICA 1 | REPLICA 2 | REPLICA 3 | PROMEDIO | %VAR. |
|---------------|-----------|-----------|-----------|----------|-------|
| 5.0 | 0.5049 | 0.5242 | 0.5055 | 0.5115 | 2.14 |
| 5.0 | 0.5068 | 0.5280 | 0.5111 | 0.5153 | 2.17 |
| 7.5 | 0.7865 | 0.8152 | 0.8193 | 0.8070 | 2.21 |
| 7.5 | 0.7886 | 0.8038 | 0.8213 | 0.8045 | 2.03 |
| 10.0 | 1.0683 | 1.0738 | 1.0050 | 1.0490 | 3.64 |
| 10.0 | 1.0713 | 1.0731 | 1.0136 | 1.0526 | 3.21 |
| 12.5 | 1.2896 | 1.3658 | 1.3562 | 1.3372 | 3.10 |
| 12.5 | 1.2840 | 1.3628 | 1.3507 | 1.3325 | 3.18 |
| 15.0 | 1.6395 | 1.6976 | 1.6309 | 1.6560 | 2.19 |
| 15.0 | 1.6313 | 1.7056 | 1.6331 | 1.6566 | 2.55 |

Resultados de la curva de linealidad del método:

Coefficiente de Variación = 3.0146 %

Coefficiente de Regresión Lineal = 0.9939

Ordenada al Origen = -0.0537

Pendiente = 0.1126

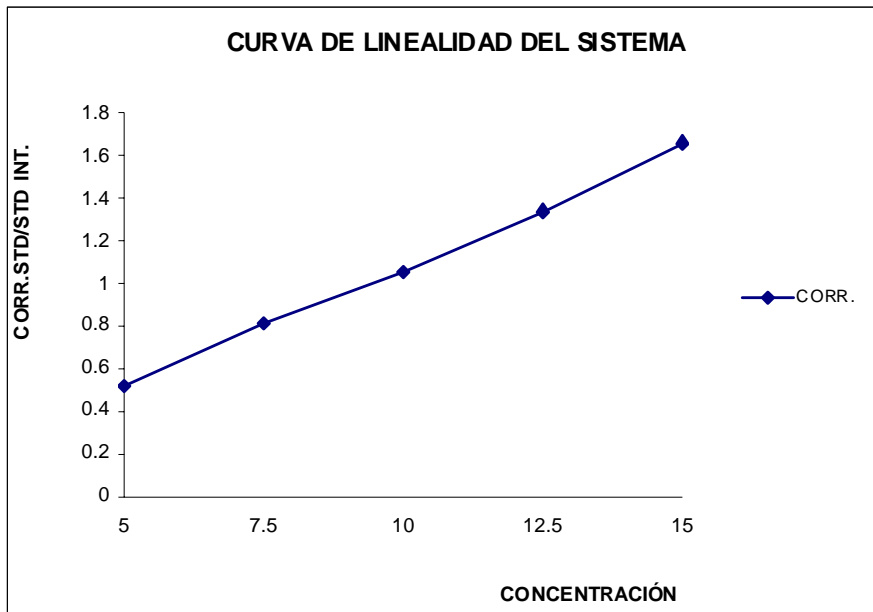
Criterio de Aceptación:

Coefficiente de Variación menor o igual a 3.0 %

Coefficiente de Regresión Lineal mayor a 0.98

Ordenada al Origen 0.0

Pendiente 1.0



Gráfica 1 Curva de linealidad del sistema

En el siguiente cromatograma de linealidad del sistema se puede observar los siguientes picos:

- a) Tiempo de retención 0.74 minutos (pico de difenhidramina).
- b) Tiempo de retención 3.95 minutos (pico de bromhexina estándar interno).



Fig. 9. Cromatograma de difenhidramina conc. 5.0 mcg.

b) Linealidad del método

Tabla 5 Muestra los resultados de la linealidad del método

| CONCENTRACIÓN | REPLICA 1 | REPLICA 2 | REPLICA 3 | PROMEDIO | %VAR. |
|---------------|-----------|-----------|-----------|----------|-------|
| 5.0 | 0.4689 | 0.4858 | 0.4917 | 0.4821 | 2.45 |
| 5.0 | 0.4713 | 0.4855 | 0.4917 | 0.4828 | 2.16 |
| 7.5 | 0.7357 | 0.7409 | 0.7458 | 0.7408 | 0.68 |
| 7.5 | 0.7389 | 0.7417 | 0.7441 | 0.7415 | 0.35 |
| 10.0 | 0.9879 | 0.9982 | 0.9913 | 0.9924 | 0.52 |
| 10.0 | 0.9882 | 0.9809 | 0.9947 | 0.9879 | 0.69 |
| 12.5 | 1.2230 | 1.2395 | 1.2528 | 1.2384 | 1.20 |
| 12.5 | 1.2243 | 1.2472 | 1.2556 | 1.2423 | 1.30 |
| 15.0 | 1.4499 | 1.4609 | 1.5194 | 1.4767 | 2.52 |
| 15.0 | 1.4480 | 1.4624 | 1.5179 | 1.4761 | 2.50 |

Resultados de la curva de linealidad del método:

Coefficiente de Variación = 1.7163 %

Coefficiente de Regresión Lineal = 0.9978

Ordenada al Origen = -0.0091

Pendiente = 0.0995

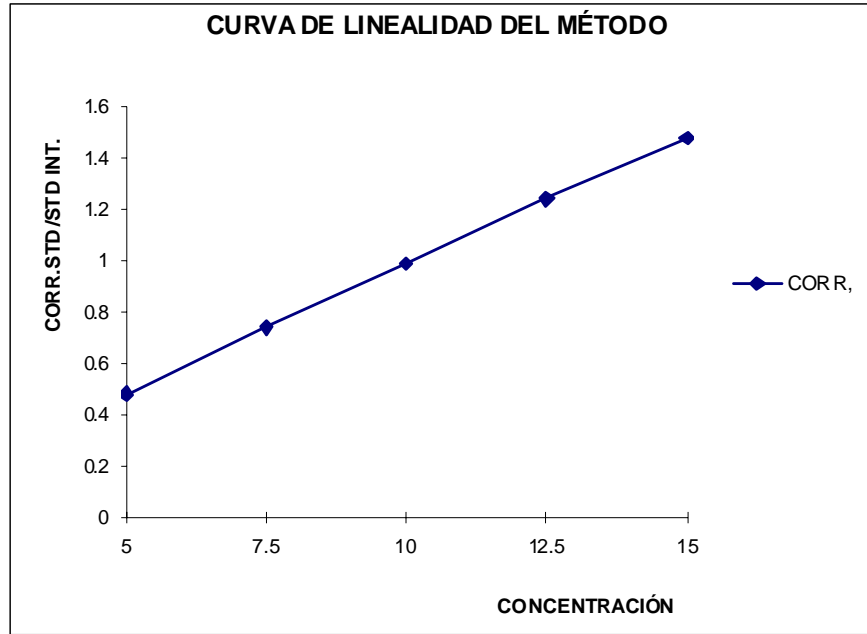
Criterio de Aceptación:

Coefficiente de Variación menor o igual a 3.0 %

Coefficiente de Regresión Lineal mayor a 0.98

Ordenada al Origen 0.0

Pendiente igual a 1.0



Gráfica 2 Curva de linealidad del método

En el siguiente cromatograma de linealidad del método se puede observar los siguientes picos:

- a) Tiempo de retención 0.74 minutos (pico de difenhidramina).
- b) Tiempo de retención 3.95 minutos (pico de bromhexina estándar interno).



FIG. 10. Cromatograma de difenhidramina conc. 5.0 mcg.

c) Exactitud - Porcentaje de recobro del método

Tabla 6 Valores obtenidos del porcentaje de recobro

| Replica | Por ciento de recobro |
|---------|-----------------------|
| 1 | 100.01 |
| 2 | 100.16 |
| 3 | 101.18 |
| 4 | 101.45 |
| 5 | 100.35 |
| 6 | 99.89 |
| 7 | 104.49 |
| 8 | 104.04 |
| 9 | 101.42 |
| 10 | 101.73 |
| 11 | 99.45 |
| 12 | 99.90 |

Resultados de la prueba por ciento de recobro:

Promedio del Porcentaje de Recobro = 101.17 %

Coficiente de Variación = 1.60%

Criterio de Aceptación:

Promedio de Aceptación de 97 - 103 %

Coficiente de Variación menor o igual a 3.0 %

d) Precisión del Sistema

**Tabla 7 Valores obtenidos de un sextuplicado de
Inyección de complejo - estándar interno.**

Correlación std/std int.

| Replica | Correlación std / std int. |
|---------|----------------------------|
| 1 | 0.9399 |
| 2 | 0.9374 |
| 3 | 0.9373 |
| 4 | 0.9398 |
| 5 | 0.9428 |
| 6 | 0.9488 |

Resultados de la prueba precisión del sistema:

Promedio = 0.9410

Coefficiente de Variación = 0.4599 %

Criterio de Aceptación:

Coefficiente de Variación menor o igual a 1.5 %

e) Reproducibilidad y Repetibilidad

Tabla 8 Valores de inyecciones independientes

De dos analistas en dos días diferentes.

| DIAS | ANALISTAS | |
|------|-----------|--------|
| | 1 | 2 |
| 1 | 98.07 | 100.11 |
| | 99.02 | 100.51 |
| | 100.01 | 103.42 |
| | 96.61 | 100.74 |
| | 99.02 | 100.34 |
| | 100.41 | 102.97 |
| 2 | 98.73 | 103.82 |
| | 100.38 | 102.57 |
| | 101.92 | 98.93 |
| | 98.79 | 103.64 |
| | 100.68 | 102.98 |
| | 102.26 | 99.4 |

Resultados de la prueba reproducibilidad y repetibilidad:

Coefficiente de Variación Total 1.77 %

Coefficiente de Variación de Repetibilidad 3.07 %

Coefficiente de Variación de Reproducibilidad

| | |
|----------------------------------------------|--------|
| Inter día / analista | 0.45 % |
| Coeficiente de Variación de Reproducibilidad | |
| Inter analista | 2.28 % |

Criterio de Aceptación:

Coeficiente de Variación menor o igual a 3.0

f) Especificidad

l) Degradación ácida

Después de inyectar las 3 muestras no se observa ningún pico de degradación, por lo tanto el HCl 0.1 N no degrada significativamente la difenhidramina. Fig. 11

En el siguiente cromatograma de degradación ácida se puede observar los siguientes picos:

- a) Tiempo de retención 0.75 minutos (pico de difenhidramina).
- b) Tiempo de retención 4.11 minutos (pico de bromhexina estándar interno).

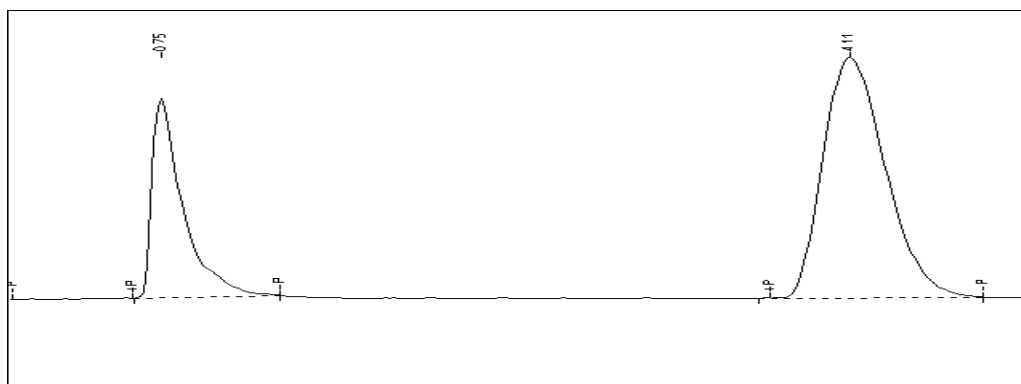


FIG. 11. Cromatograma de Degradación Ácida

II) Degradación por oxidación

Después de inyectar las tres muestras no se observa ningún pico de degradación, por lo tanto el peróxido de hidrógeno no degrada significativamente la difenhidramina. Fig. 12

En el siguiente cromatograma de degradación por oxidación se puede observar los siguientes picos:

- a) Tiempo de retención 0.75 minutos (pico de difenhidramina).
- b) Tiempo de retención 4.11 minutos (pico de bromhexina estándar interno).

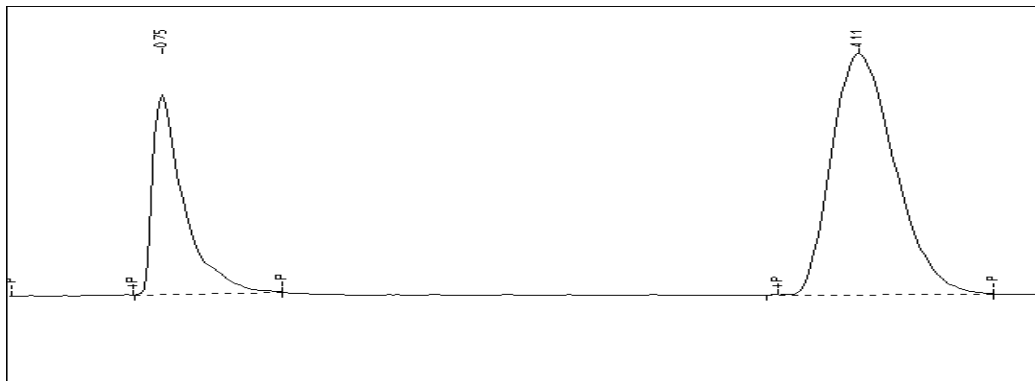


FIG. 12. Cromatograma de Degradación por Oxidación

III) Degradación por termólisis

Después de inyectar las 5 muestras en los tiempos de 8 y 10 minutos no se presenta ningún pico de degradación, pero al inyectar las muestras de los tiempos 12, 14, y 16 minutos se presentan picos de degradación. Fig. 13, 14 Y 15

En el siguiente cromatograma de degradación por termólisis a los 12 minutos de exposición a 100 °C se puede observar los siguientes picos:

- a) Tiempo de retención 0.75 minutos (pico de difenhidramina).
- b) Tiempo de retención 1.25 minutos (primer pico de degradación de difenhidramina).
- c) Tiempo de retención 4.12 minutos (pico de bromhexina estándar interno).



FIG. 13. Cromatograma de Termólisis 12 minutos

En el siguiente cromatograma de degradación por termólisis a los 14 minutos de exposición a 100 °C se puede observar los siguientes picos:

- a) Tiempo de retención 0.75 minutos (pico de difenhidramina).
- b) Tiempo de retención 1.26 minutos (primer pico de degradación de difenhidramina).
- c) Tiempo de retención 4.12 minutos (pico de bromhexina estándar interno).

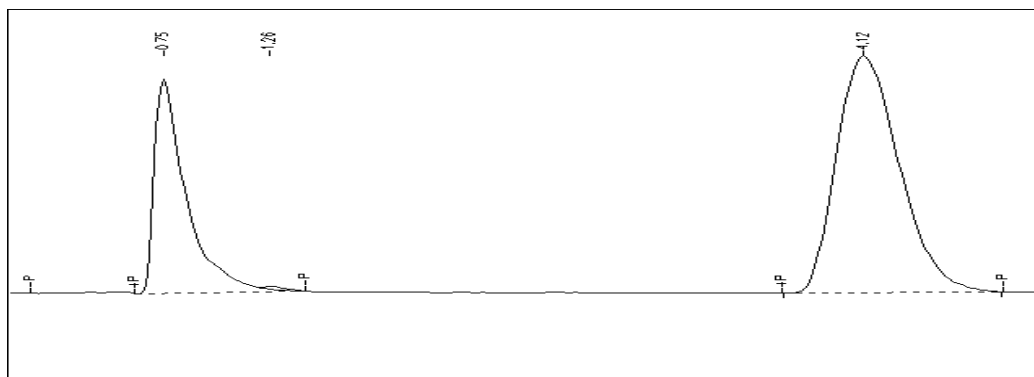


FIG. 14. Cromatograma de 14 minutos

En el siguiente cromatograma de degradación por termólisis a los 16 minutos de exposición a 100 °C se puede observar los siguientes picos:

- a) Tiempo de retención 0.75 minutos (pico de difenhidramina).
- b) Tiempo de retención 1.26 minutos (primer pico de degradación de difenhidramina).
- c) Tiempo de retención 1.78 minutos (segundo pico de degradación de difenhidramina).
- d) Tiempo de retención 4.11 minutos (pico de bromhexina estándar interno).

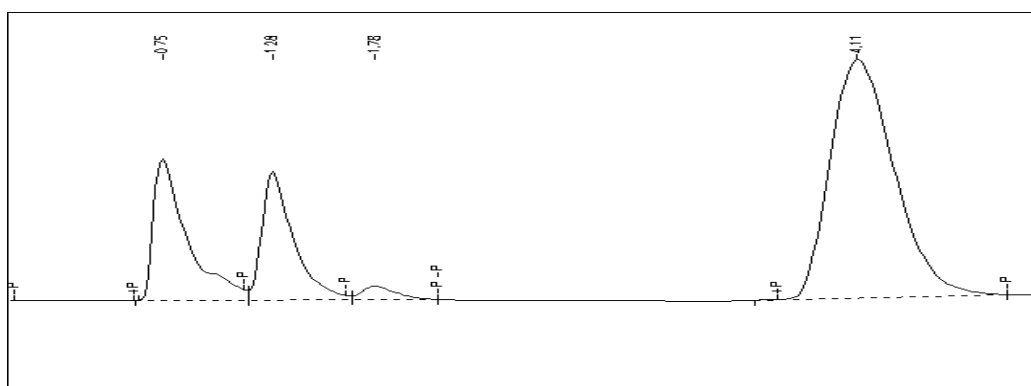


FIG. 15. Cromatograma de Termólisis 16 minutos

7.6 Estudio de estabilidad

La difenhidramina sufre degradación en el primer y segundo muestreo a las temperaturas de 40 y 60 °C, Fig. 17, 18, 23 y 24. La difenhidramina no sufre degradación a la temperatura de 20 °C, Fig. 16 y 22 tampoco el complejo formado (difenhidramina - β -ciclodextrina) no sufre degradación pero este en ninguna de las temperaturas 20, 40 y 60 °C, Fig. 19, 20, 21, 25, 26 y 27.

7.7 Cromatogramas comparativos del primer muestreo del estudio de estabilidad

En el siguiente cromatograma del primer muestreo a la temperatura 20 °C se muestra que la difenhidramina no sufre degradación, se observan los siguientes picos:

- Tiempo de retención 0.89 minutos (pico de difenhidramina).
- Tiempo de retención 3.87 minutos (pico de bromhexina estándar interno).

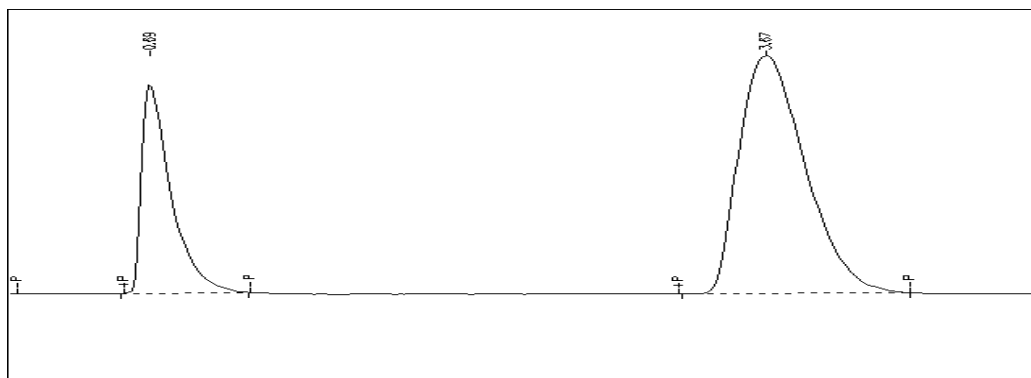


FIG. 16. Cromatograma de difenhidramina a 20 °C primer muestreo

En el siguiente cromatograma del primer muestreo a la temperatura 40 °C se muestra que la difenhidramina sufre degradación, se observan los siguientes picos:

- Tiempo de retención 0.89 minutos (pico de difenhidramina).
- Tiempo de retención 1.14 minutos (pico de degradación de difenhidramina).
- Tiempo de retención 3.66 minutos (pico de bromhexina estándar interno).

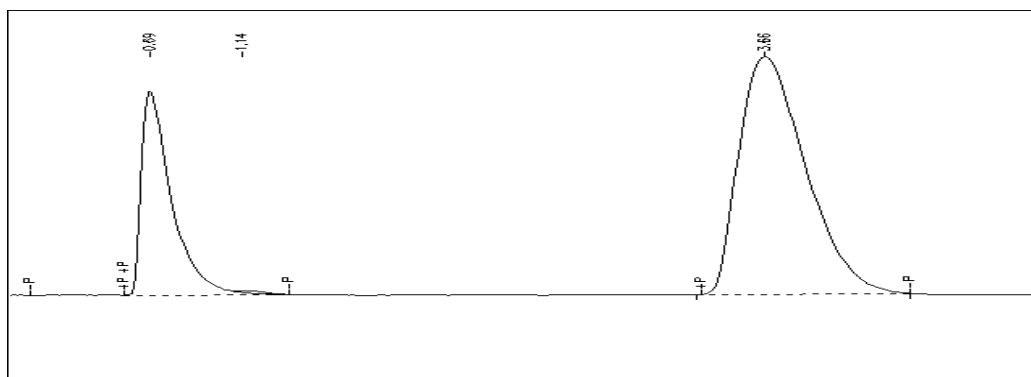


FIG. 17. Cromatograma de difenhidramina a 40 °C primer muestreo

En el siguiente cromatograma del primer muestreo a la temperatura 60 °C se muestra que la difenhidramina sufre degradación, se observan los siguientes picos:

- a) Tiempo de retención 0.89 minutos (pico de difenhidramina).
- b) Tiempo de retención 1.16 minutos (pico de degradación de difenhidramina).
- c) Tiempo de retención 3.60 minutos (pico de bromhexina estándar interno).

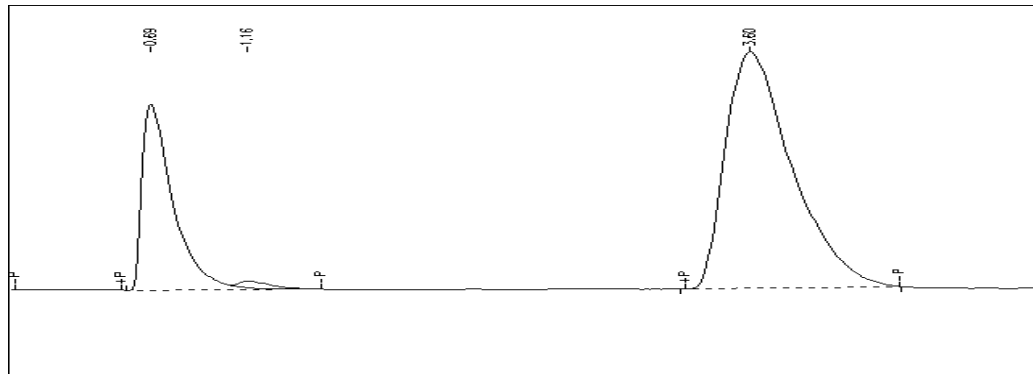


FIG. 18. Cromatograma de difenhidramina a 60 °C primer muestreo

En el siguiente cromatograma del primer muestreo a la temperatura 20 °C se muestra que el complejo no sufre degradación, se observan los siguientes picos:

- a) Tiempo de retención 0.89 minutos (pico de difenhidramina).
- b) Tiempo de retención 3.65 minutos (pico de bromhexina estándar interno).

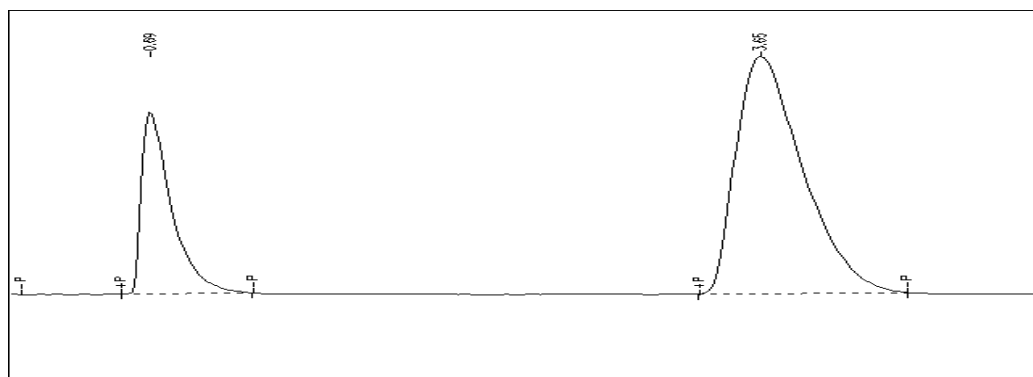


FIG. 19. Cromatograma del Complejo a 20 °C primer muestreo

En el siguiente cromatograma del primer muestreo a la temperatura 40 °C se muestra que el complejo no sufre degradación, se observan los siguientes picos:

- a) Tiempo de retención 0.69 minutos (pico de difenhidramina).
- b) Tiempo de retención 3.64 minutos (pico de bromhexina estándar interno).

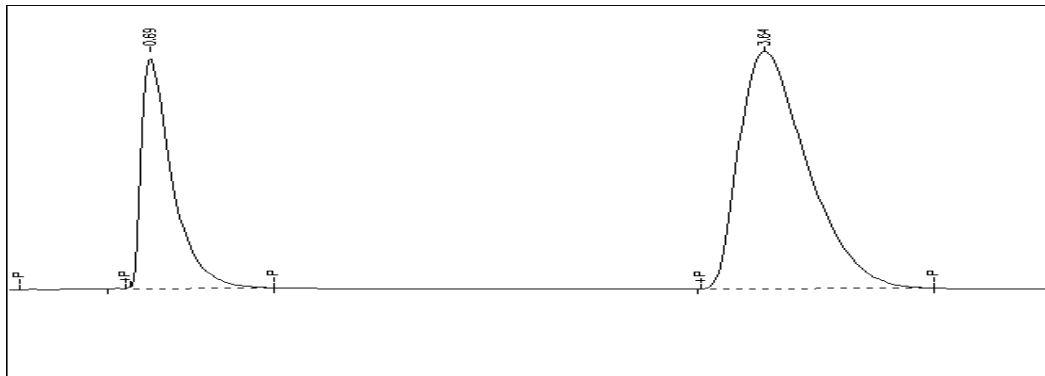


FIG. 20. Cromatograma del Complejo a 40 °C primer muestreo

En el siguiente cromatograma del primer muestreo a la temperatura 60 °C se muestra que el complejo no sufre degradación, se observan los siguientes picos:

- a) Tiempo de retención 0.69 minutos (pico de difenhidramina).
- b) Tiempo de retención 3.63 minutos (pico de bromhexina estándar interno).

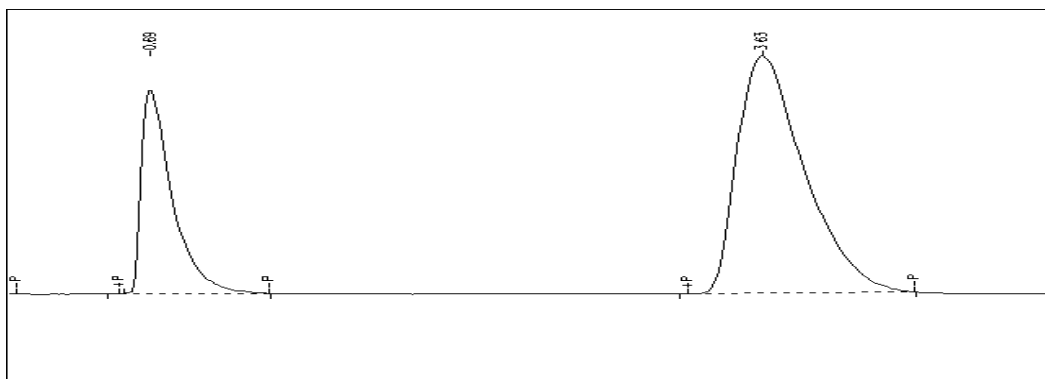


FIG. 21. Cromatograma del Complejo a 60 °C primer muestreo

7.8 Cromatogramas comparativos del segundo muestreo del estudio de estabilidad

En el siguiente cromatograma del primer muestreo a la temperatura 20 °C se muestra que la difenhidramina no sufre degradación, se observan los siguientes picos:

- Tiempo de retención 0.69 minutos (pico de difenhidramina).
- Tiempo de retención 3.87 minutos (pico de bromhexina estándar interno).



FIG. 22. Cromatograma de difenhidramina a 20 °C segundo muestreo

En el siguiente cromatograma del segundo muestreo a la temperatura 40 °C se muestra que la difenhidramina sufre degradación, se observan los siguientes picos:

- Tiempo de retención 0.69 minutos (pico de difenhidramina).
- Tiempo de retención 1.17 minutos (pico de degradación de difenhidramina).
- Tiempo de retención 3.87 minutos (pico de bromhexina estándar interno).

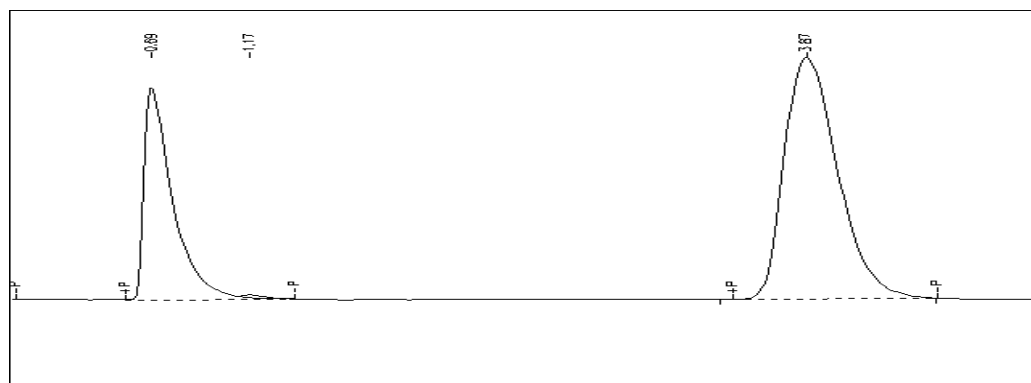


FIG. 23. Cromatograma de difenhidramina a 40 °C segundo muestreo

En el siguiente cromatograma del segundo muestreo a la temperatura 60 °C se muestra que la difenhidramina sufre degradación, se observan los siguientes picos:

- a) Tiempo de retención 0.69 minutos (pico de difenhidramina).
- b) Tiempo de retención 1.18 minutos (pico de degradación de difenhidramina).
- c) Tiempo de retención 3.86 minutos (pico de bromhexina estándar interno).



FIG. 24. Cromatograma de difenhidramina a 60 °C segundo muestreo

En el siguiente cromatograma del segundo muestreo a la temperatura 20 °C se muestra que el complejo no sufre degradación, se observan los siguientes picos:

- a) Tiempo de retención 0.69 minutos (pico de difenhidramina).
- b) Tiempo de retención 3.86 minutos (pico de bromhexina estándar interno).



FIG. 25. Cromatograma del Complejo a 20 °C segundo muestreo

En el siguiente cromatograma del segundo muestreo a la temperatura 40 °C se muestra que el complejo no sufre degradación, se observan los siguientes picos:

- a) Tiempo de retención 0.69 minutos (pico de difenhidramina).
- b) Tiempo de retención 3.84 minutos (pico de bromhexina estándar interno).

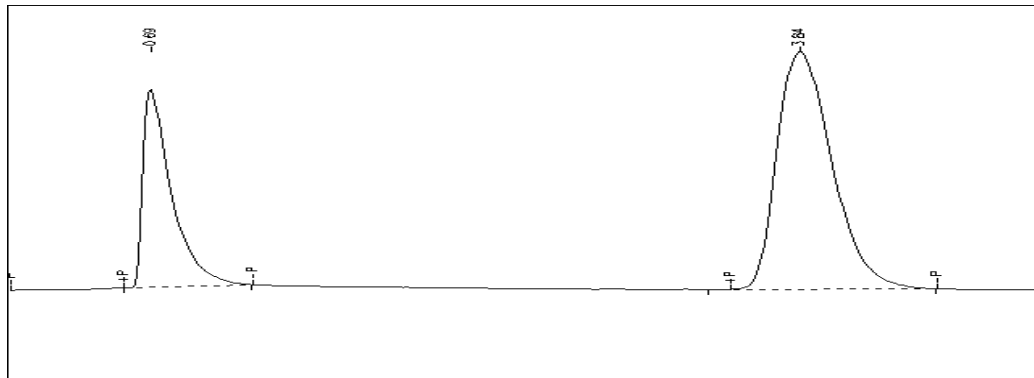


FIG. 26. Cromatograma del Complejo a 40 °C segundo muestreo

En el siguiente cromatograma del segundo muestreo a la temperatura 60 °C se muestra que el complejo no sufre degradación, se observan los siguientes picos:

- a) Tiempo de retención 0.69 minutos (pico de difenhidramina).
- b) Tiempo de retención 3.85 minutos (pico de bromhexina estándar interno).



FIG. 27. Comatograma del Complejo a 60 °C segundo muestreo

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La evaluación comparativa de los espectros de Ultravioleta se realiza con una muestra de difenhidramina y tres de complejo no encontrándose diferencia entre ellos, esto se debe a que la β -ciclodextrina no absorbe en ésta región es decir se corrobora la formación del complejo figuras 1 y 2.

La evaluación comparativa de los espectros de Infrarrojo se realizó con una muestra de difenhidramina, una de β -ciclodextrina y tres de complejo, los espectros muestran que la complejación se logró, se muestra una gran similitud en el espectro de la β -ciclodextrina con el espectro del complejo, lo cual demuestra que la β -ciclodextrina encapsula (cubre) a la difenhidramina protegiendo a los grupos funcionales (amino y oxidrilos de la difenhidramina) como se muestra en las figuras de la 3,4, y 5.

La evaluación comparativa de los termogramas obtenidos por Calorimetría de Exploración Diferencial se realizaron con una muestra de difenhidramina, una de β -ciclodextrina y tres de complejo, los espectros muestran que la complejación fue favorable ya que la temperatura de fusión de β -ciclodextrina y difenhidramina se modificaron de 104.52 a 107.58 °C y de 170.35 a 220.83 °C respectivamente, es decir la β -ciclodextrina aumenta la estabilidad (resistencia) de la difenhidramina a altas temperaturas debido al efecto de encapsulación como se muestra en la figura 6,7 y 8.

Los valores obtenidos a través de la validación del método analítico, permiten asegurar que el método tiene la especificidad adecuada para determinar la degradación de la difenhidramina.

Cumplen con las características necesarias para considerarse lineal, exacto, preciso, reproducible y específico como se muestra en la tabla 4, 5, 6, 7, 8, en las gráficas 1, 2 y en las figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

La evaluación comparativa de los cromatogramas muestran claramente que la difenhidramina sin complejar no se degrada a una temperatura de 20°C como se muestra en las figuras 16 (primer muestreo) y 22 (segundo muestreo) pero tiende a descomponerse al ser expuesta a temperaturas de 40° C y 60°C figuras 17, 18 (primer muestreo), 23 y 24 (segundo muestreo), el porcentaje de humedad relativa a que estuvieron expuestas las muestras fue de 75%.

El efecto de degradación se observa con mayor claridad a la temperatura 60°C primer y segundo muestreo figuras 18 y 24.

El tamaño del pico de degradación es mayor en los cromatogramas del segundo muestreo en comparación con los cromatogramas del primer muestreo para las temperatura de 40 y 60°C, figura 17 comparada con la 23 y figura 18 comparada con la 24.

La difenhidramina complejada permanece sin degradar, debido a que la complejación evita la degradación al proteger los grupos funcionales sensibles de esta mediante el efecto de encapsulación, como se muestra en las figuras 19, 20, 21 (primer muestreo), 25, 26, y 27 (segundo muestreo).

El estudio de estabilidad se realizó por dos meses debido a que el equipo (cromatógrafo de líquidos serie 200 LC de PERKIN ELMER) sólo fue prestado por el proveedor PERKIN ELMER por el período de dos meses y medio aproximadamente.

9. CONCLUSIONES

Dados los resultados obtenidos a través del estudio, es posible considerar que la formación del complejo difenhidramina- β ciclodextrina permite incrementar la estabilidad de la difenhidramina al proteger grupos funcionales sensibles (amino y oxidrilos de la difenhidramina) evitando así posibles interacciones y desgradaciones de la difenhidramina dentro de un producto terminado, permitiendo la elaboración de formas farmacéuticas sólidas como son las tabletas empleando el método de granulación por vía húmeda, se sugiere llevar a cabo un estudio adicional en producto semiterminado por ejemplo en tabletas, que permita evaluar el nivel de aplicabilidad del complejo estudiado.

10. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1) Frömning K, and Szejtli J. Cyclodextrins in pharmacy; topics inclusion science, Kluwer academic Publishers Netherlands 1994.
- 2) Rejewski R. and Stella V. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. J. Pharm. Sci. 1996 November 11:85 1142-69.
- 3) Darlene Y, Oksanen D, Masefski W Jr, Blake J, Duffy E and Chrnyk B. Inclusion complexation the zipradisone mesylate β -cycliodextrin sulfobutyl ether. J. Pharm. Sci. 1998 December 12:87 1560-7.
- 4) Funasaki N, Kawaguchi R, Hada S and Neya S . Ultraviolet spectroscopic estimation of microenvironments and bitter tastes of oxyphenonium bromimide in cyclodextrin solution. J. Pharm. Sci. 1999 august 8:88 759-62.
- 5) Darrington R, Xiang T and Anderson B. Complexation and stabilization of dioleoxypurine nucleoside with 2-hydroxypropil- β -cyclodextrin. Int. J. Pharm. 1990 59: 35-44.
- 6) Xiang T and Anderson B. Intrenational investigation of inclusion complex geometry and cavity microenvironment. Int. J. Pharm. 1990 59: 45-55.
- 7) Torricelli C, Martini A, Muggetti L and de Ponti R. International stability studies on a steroidal drug / β -cyclodextrin coground mixture. Int. J. Pharm. 1991 71: 19-24.

8) Menard FA, Dedhiya MG and Rhodes CT. Pharmaceutical applications of a new β -cyclodextrin derivative. Drug Dev. Ind. Pharm. 1998 11:14 1529-47.

9) Dollo G, Le Corre P, Chollet M, Chevanne F, Bertault M, Burgot JL and Le Verge R. Improvement in solubility and dissolution rate of 1,2-dithiole 3thiones upon complexation with β -cyclodextrin and its hydroxypropyl and sulfobutyl ether-7 derivatives. J. Pharm. Sci.1999 september 9: 88 889-95.

10) Frijlink HW, Eissens AC, Schoonen AJ and Lerk CF. The Effects of cyclodextrins on drug absorption, in vivo observations. Int. J. Pharm. 1990 64: 195-205.

11) Veiga M, Díaz P and Ahsan F. Interactions of griseofulvin with cyclodextrins in solid binary systems. J. Pharm. Sci.1998 july 7:87 205-09.

12) Hassan M, Suleiman M and Najib N. Improvement of the vitro dissolution characteristics of famotidine by inclusion in β -cyclodextrin. Int. J. Pharm.1990 58:19-24.

13) Bonded P, Wang M, Veda H and Nagai T. Simple prediction of stability constants for inclusion complexes of β -cyclodextrin with various drug molecules in β -cyclodextrin. Drug Dev. Ind. Pharm.1990 49:16 571-9.

14) Giordano F, Gazzaniga A, Bettinetti GP and La Manna A. International the influence of water content on the binding capacity of β -cyclodextrin. Int. J. Pharm.1990 62: 153-6.

- 15) Shangraw R, Pande G and Gala P. Characterization of the tableting properties of β -cyclodextrin and the effects of processing variables on inclusion complex formation, compactibility and dissolution, Drug Dev. Ind. Pharm. 1992 1831-51.
- 16) Estabilidad de medicamentos. Diario Oficial Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana, Nom-073-S.S.A. Viernes 8 de Marzo de 1996: 59-66.
- 17) Sbarbati de Nedulman NE. Estabilidad de medicamentos . Buenos Aires Argentina: Editorial "El Ateneo", 1975: 1-14, 23-5, 50-7, 77-86, 100-8, 135-46, 157-160.
- 18) Maldonado Ma. de L y García H . Estabilidad de medicamentos. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 1969 noviembre 11:19-26.
- 19) The Merck index and encycloped of drug; Publish hed by Merck co. 11a. ed. Inc.Editor Martha Windholz. N.J. U.S.A. 1989 228-311.
- 20) H & S Diphenhydramine Hydrochloride 147-24-0; [http://ntp-sever.niehs.nih.gov/htdocs/Chem-H&S / NTP- Chem1/Radian 147-24-0.htm1](http://ntp-sever.niehs.nih.gov/htdocs/Chem-H&S/NTP-Chem1/Radian 147-24-0.htm1).
- 21) Diccionario de especialidades farmacéuticas PLM. Edición 47. Impreso por Litografía Magnograf S.A. de C.V. México 2001 Febrero 1520, 2213-2214.
- 22) Goodman L and Gilman A. Bases farmacológicas de la terapéutica. 5ª. ed. México D.F. : Nueva Editorial Interamericana, 1978 : 524-533.

23) Goldstein A, Aronow M.D. and Kalman S. M.D. Farmacología. 1a. Ed. en español México D.F. : Editorial Limusa S.A. 1979 : 22-26, 97-104, 882, 884, 923, y 927.

24) Katzung B, M.D. Farmacología Básica y Clínica. 4ª. Ed. México D.F. : Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. 1991: 207-210, 809-813.

25) Quattrocchi OA, Abelaira de Andizzi SI y Laba RF. Introducción a la HPLC (Aplicación y práctica). Buenos Aires Argentina. Editorial Artes Gráficas Farro. S.A. 1992: 3-7, 11-29, 40-61, 67-87, 204-211, 241-265, 268-297, 302-327 y 349-380.

26) Caraballo I, Arévalo M, Holgado MA, and Alvarez J. Simultaneous HPCL determination of some drugs commonly used in cold medications: dextromethorphan, diphenhydramine, phenylephrine, phenylpropanolamine and pseudoephedrine. Drug Dev. Ind. Pharm. 1995 5:21 605-613.