



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

***Evaluación de la liberación de complejos de inclusión Ofloxacino/
 β -Ciclodextrinas a partir de películas poliméricas como un sistema
destinado a la vía ocular***

TESIS

Que para obtener el título de:

Licenciado en Farmacia

Presenta:

Alejandro Ortiz Santiago

Asesora: **Dra. Flora Adriana Ganem Rondero**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación de la liberación de complejos de inclusión Ofloxacino/B-Ciclodextrinas a partir de películas poliméricas como un sistema destinado a la vía ocular.

Que presenta el pasante: Alejandro Ortiz Santiago

Con número de cuenta: 305104690 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Farmacia.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de Diciembre de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| PRESIDENTE | D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez | |
| VOCAL | Dra. Flora Adriana Ganem Rondero | |
| SECRETARIO | Dr. Julio César Botello Pozos | |
| 1er. SUPLENTE | M.F.C. Beatriz de Jesús Maya Monroy | |
| 2do. SUPLENTE | L.F. Miguel Ángel Trejo Rodríguez | Trejo Rodríguez Miguel A. |

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS**, por darme la oportunidad de despertar cada día

A mi **Familia**, porque sin la energía y el apoyo de cada uno de ustedes, simplemente nada de esto hubiera sido posible

A mis **Amigos** de la FES Cuautitlán, porque el aprendizaje y las experiencias vividas con ustedes no se cambian por nada

A la Dra. **Adriana Ganem**, por dejarme formar parte de su laboratorio y por la eterna paciencia brindada a lo largo de todo este tiempo, mi más sincero agradecimiento para usted

Al técnico Rodolfo Robles por su ayuda en la obtención de las micrografías SEM

Al Dr. Enrique Ángeles por su ayuda en la obtención de los espectros IR

Al proyecto **PAPIIT IN216016** y al **CONACYT** con el número de expediente **14984** por los estímulos otorgados

A la empresa Helm de México, S.A. de C.V. por la donación de las muestras requeridas

A todas y cada una de aquellas personas que directa o indirectamente estuvieron presentes a lo largo de este camino, mi gratitud también es para ustedes

Y por último, a mi pequeña y hermosa **Ari**, porque hoy, todo lo que hago es para ti

Índice general

Página

| | |
|---|-----|
| Índice de Figuras..... | iii |
| Índice de Gráficos..... | iv |
| Índice de Tablas..... | v |
| Símbolos y Abreviaturas..... | vi |
| | |
| 1. Introducción..... | 1 |
| 2. Marco Teórico | 3 |
| 2.1 Anatomía del ojo humano..... | 3 |
| 2.2. Absorción y eliminación de fármacos por la vía ocular | 6 |
| 2.2.1. Barreras. | 8 |
| 2.2.2. Vías de entrada y eliminación de los fármacos en el globo ocular..... | 9 |
| 2.3. Sistemas terapéuticos de liberación modificada destinados a la vía ocular. | 10 |
| 2.3.1. Nanopartículas poliméricas biodegradables | 11 |
| 2.3.2. Implantes poliméricos biodegradables | 12 |
| 2.3.3. Implantes no biodegradables..... | 12 |
| 2.3.4. Formación de geles “in situ” | 12 |
| 2.4. Características y aplicaciones de las ciclodextrinas | 13 |
| 2.5. Métodos de preparación de los complejos de inclusión | 16 |
| 2.6. Caracterización de los complejos de inclusión | 16 |
| 2.7. Uso del polímero Eudragit® RS 30D/RL 30D como matriz de liberación modificada. ... | 18 |
| 2.8. Características y propiedades del Ofloxacino | 19 |
| 3. Objetivos..... | 20 |
| 3.1 Objetivo General | 20 |
| 3.2 Objetivos Particulares | 20 |
| 4. Hipótesis..... | 20 |
| 5. Desarrollo Experimental | 21 |
| 5.1 Reactivos | 21 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.2 | Materiales..... | 21 |
| 5.3 | Equipos e instrumentos | 22 |
| 5.4 | Espectros de absorción y curvas de calibración | 23 |
| 5.5 | Construcción de los diagramas de solubilidad de fase..... | 24 |
| 5.6 | Preparación de los complejos de inclusión | 24 |
| 5.6.1 | Método de amasado | 24 |
| 5.6.2 | Método de co-precipitación..... | 25 |
| 5.7 | Preparación de las películas poliméricas | 25 |
| 5.8 | Evaluación de la liberación de ofloxacino a partir de las películas poliméricas | 26 |
| 6. | Resultados y discusión | 27 |
| 6.1 | Espectros de absorción UV/Vis | 27 |
| 6.2 | Diagramas de solubilidad de fase..... | 28 |
| 6.3 | Pruebas de solubilidad..... | 32 |
| 6.4 | Espectroscopía de Infrarrojo..... | 35 |
| 6.5 | Microscopía Electrónica de Barrido | 42 |
| 6.6 | Calorimetría Diferencial de Barrido..... | 49 |
| 6.7 | Preparación de las películas poliméricas..... | 51 |
| 6.8 | Liberaciones del Ofloxacino en los insertos oculares | 54 |
| 7. | Conclusiones | 57 |
| 8. | Perspectivas | 58 |
| 9. | Referencias | 59 |
| 10. | Anexos..... | 69 |
| 10.1 | Anexo I Curvas de calibración | 69 |
| 10.2 | Anexo 2. Pruebas F y t para cantidad de fármaco en los complejos | 78 |

Índice de Figuras

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1. El ojo humano y sus principales estructuras..... | 4 |
| Figura 2. Localización de los conos y los bastones en la retina..... | 5 |
| Figura 3. Estructura del ojo y barreras ante la penetración ocular de fármacos..... | 7 |
| Figura 4. Estructura de las tres principales Ciclodextrinas nativas..... | 13 |
| Figura 5. Representación esquemática de la formación de los complejos de inclusión..... | 13 |
| Figura 6. Estructura química de la β -Ciclodextrina..... | 15 |
| Figura 7. Estructura química de la Hidroxipropil- β -Ciclodextrina..... | 15 |
| Figura 8. Estructura química del Eudragit® RL 30D y RS 30D..... | 18 |
| Figura 9. Estructura química del Ofloxacino..... | 19 |
| Figura 10. Imágenes SEM del Ofloxacino..... | 43 |
| Figura 11. Imágenes SEM de la Hidroxipropil- β -Ciclodextrina..... | 44 |
| Figura 12. Imágenes SEM de la β -Ciclodextrina..... | 45 |
| Figura 13. Imágenes SEM del complejo obtenido por el método de amasado con β -Ciclodextrina | 46 |
| Figura 14. Imágenes SEM del complejo obtenido por el método de amasado con Hidroxipropil- β - Ciclodextrina..... | 47 |
| Figura 15. Imágenes SEM del complejo obtenido por el método de co-precipitación con β - Ciclodextrina..... | 48 |
| Figura 16. Imágenes SEM del complejo obtenido por co-precipitación con Hidroxipropil- β - Ciclodextrina..... | 49 |
| Figura 17. Representación esquemática del hinchamiento dinámico de un polímero en estado vítreo..... | 55 |
| Figura 18. Expresión de la ecuación de la primera ley de Fick..... | 55 |

Índice de Gráficos

| | Página |
|---|--------|
| Gráfico 1. Espectros de absorción del Ofloxacino en diferentes medios..... | 27 |
| Gráfico 2. Diagrama de solubilidad de fase Ofloxacino/Hidroxiopropil- β -Ciclodextrina..... | 29 |
| Gráfico 3. Diagrama de solubilidad de fase Ofloxacino/ β -Ciclodextrina..... | 29 |
| Gráfico 4. Diferentes tipos de diagramas de solubilidad de fase obtenidos de la complejación de fármacos con Ciclodextrinas..... | 30 |
| Gráfico 5. Espectro de absorción del Ofloxacino y sus complejos formados con β -Ciclodextrina | 32 |
| Gráfico 6. Espectro de absorción del Ofloxacino y sus complejos formados con Hidroxiopropil- β -Ciclodextrina..... | 33 |
| Gráfico 7. Comparativa entre tratamientos..... | 34 |
| Gráfico 8. Espectro IR del Ofloxacino..... | 36 |
| Gráfico 9. Espectro IR de la β -Ciclodextrina..... | 37 |
| Gráfico 10. Espectro IR de la Hidroxiopropil- β -Ciclodextrina..... | 38 |
| Gráfico 11. Espectro IR del complejo obtenido por el método de amasado con Hidroxiopropil- β -Ciclodextrina..... | 39 |
| Gráfico 12. Espectro IR del complejo obtenido por el método de amasado con β -Ciclodextrina | 39 |
| Gráfico 13. Espectro IR del complejo obtenido por el método de co-precipitación con Hidroxiopropil- β -Ciclodextrina..... | 41 |
| Gráfico 14. Espectro IR del complejo obtenido por el método de co-precipitación con β -Ciclodextrina..... | 41 |
| Gráfico 15. Comparación de los termogramas relacionados a los complejos con Hidroxiopropil- β -Ciclodextrina obtenidos por DSC..... | 50 |
| Gráfico 16. Comparación de los termogramas relacionados a los complejos con β -Ciclodextrina obtenidos por DSC..... | 50 |

Índice de Tablas

| | Página |
|---|--------|
| Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la β -Ciclodextrina..... | 15 |
| Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la Hidroxipropil- β -Ciclodextrina..... | 15 |
| Tabla 3. Técnicas analíticas de caracterización de complejos de inclusión en solución..... | 17 |
| Tabla 4. Técnicas analíticas de caracterización de complejos de inclusión en estado sólido.... | 17 |
| Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas del Ofloxacino..... | 19 |
| Tabla 6. Cantidad de fármaco disuelto en soluciones de Hidroxipropil- β -Ciclodextrina..... | 28 |
| Tabla 7. Cantidad de fármaco disuelto en soluciones de β -Ciclodextrina..... | 29 |
| Tabla 8. Constantes de formación y eficiencias de complejación obtenidos de los diagramas de solubilidad de fase..... | 31 |
| Tabla 9. Cantidad de Ofloxacino en los complejos de inclusión..... | 33 |
| Tabla 10. Espesor y resistencia a la ruptura promedio de las películas poliméricas..... | 53 |
| Tabla 11. Espesor y masa promedio de los insertos oculares..... | 53 |
| Tabla 12. Valoración y uniformidad de contenido en insertos oculares cargados con fármaco y complejo..... | 53 |

Símbolos y Abreviaturas

| | |
|-------------------|---|
| % | por ciento |
| °C | grado Celsius |
| µg. | microgramo |
| Abs | Absorbancia |
| BHA | Barrera Hemato-Acuosa |
| BHR | Barrera Hemato-Retiniana |
| CD | Ciclodextrina |
| CD's | Ciclodextrinas |
| cm. | centímetro |
| cm ² | centímetro cuadrado |
| Co | Concentración |
| DSC | Differential Scanning Calorimetry (Calorimetría Diferencial de Barrido) |
| DSF | Diagrama de Solubilidad de Fase |
| EC | Eficiencia de Complejación |
| g. | gramos |
| h. | hora |
| HP-β-CD | Hidroxiopropil-Beta-Ciclodextrina |
| IR | Infrarrojo |
| Kc | Constante de formación |
| meq. | miliequivalentes |
| mg. | miligramo |
| min. | minuto |
| mL | mililitro |
| mm. | milímetro |
| N/mm ² | Newton/milímetro cuadrado |
| nm | nanómetro |
| Oflox | Ofloxacino |
| p/p | peso/peso |
| PLGA | poly(lactic-co-glycolic acid) (ácido láctico co-glicólico) |
| SEM | Scanning Electron Microscopy (Microscopia Electrónica de Barrido) |
| STF | Simulated Tear Fluid (Fluido Lacrimal Simulado) |
| UV/Vis | Ultravioleta/Visible |
| λ | longitud de onda |
| α | Alfa |
| β | Beta |
| B-CD | Beta-Ciclodextrina |
| γ | Gama |

1. Introducción

Las ciclodextrinas son excipientes funcionales útiles que han llamado mucho la atención de los investigadores y por ende, la formulación de muchos productos farmacéuticos se ha generalizado a partir de estas moléculas. Aunque han sido estudiadas durante más de 100 años (encontradas en por lo menos 35 productos farmacéuticos), siguen siendo considerados como nuevos excipientes (Kurkov y Loftsson, 2012). La base de esta popularidad desde un punto de vista farmacéutico, es la capacidad de estos materiales para interactuar con fármacos poco solubles en agua y como resultado de esta interacción se produce un aumento en su solubilidad.

El mecanismo de este fenómeno se basa en la capacidad para formar complejos de inclusión dinámicos en solución. Otro atributo en la solubilización puede incluir la capacidad de formar complejos con base en la no-inclusión, la formación de agregados y dominios relacionados y la capacidad para formar y estabilizar soluciones sobresaturadas de activos. El aumento de la solubilidad también puede aumentar la velocidad de disolución y por lo tanto, mejorar la biodisponibilidad de fármacos de la clase II y IV del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (Brewster y Loftsson, 2007). Un número de productos a base de ciclodextrinas han llegado al mercado como consecuencia de su capacidad para enmascarar propiedades físicoquímicas indeseables (Davis y Brewster, 2004), además, han sido reconocidas como excipientes no tóxicos y farmacológicamente inactivos (Stella and He, 2008) tanto para fármacos como para productos alimenticios (Kfoury et al., 2015; Astray et al., 2009; Szente y Szejtli, 2004) y cosméticos (Chibunova et al., 2015; Scalia et al., 2007; Weisse et al., 2004)

Las ciclodextrinas (CD's) son oligosacáridos cíclicos producidas por síntesis enzimática selectiva del almidón que constan de seis (α -CD), siete (β -CD) u ocho (γ -CD) unidades de α -D-glucopiranososa (glucosa). Debido a la conformación en silla que presenta la glucopiranososa, las ciclodextrinas toman la forma de un cono truncado (Brewster y Loftsson, 2007).

El acoplamiento específico de los monómeros de glucosa proporciona a cada ciclodextrina una rígida estructura molecular con una cavidad interior de volumen determinado. Esta cavidad interna de naturaleza hidrofóbica, es una característica estructural fundamental, que le

proporciona la capacidad de formar complejos con otras moléculas de naturaleza diversa, las cuales, deberán tener un tamaño compatible con la cavidad interna de la ciclodextrina permitiendo formar así un complejo de inclusión estable (Buvári-Barcza y Barcza, 1999).

El Ofloxacino es un fármaco fluorado de amplio espectro perteneciente al grupo de las quinolonas, utilizadas generalmente como antimicrobianos, con gran actividad contra la mayoría de las especies de bacterias gram-negativas, muchas de las gram-positivas y algunas anaerobias (Hooper, 2001). Los resultados de los estudios clínicos que se han llevado a cabo con Ofloxacino han confirmado su potencial uso terapéutico en el tratamiento de una amplia gama de infecciones, en las que tanto su perfil antibacteriano como sus ventajas farmacocinéticas justifican su indicación como antimicrobiano.

Los sistemas de liberación modificada o liberación controlada de fármacos se han convertido en un eje clave en la búsqueda de nuevas formas farmacéuticas (Park y Mrsny, 2000). Es por ello que las líneas de investigación actuales se han centrado en su perfeccionamiento, incrementando su eficacia.

En los últimos años, los polímeros han sido utilizados cada vez más como soporte y como herramienta para la liberación controlada de fármacos o sustancias activas que se encuentran en una determinada formulación (Uchegbu y Schätzlein, 2006). Existen muchas aplicaciones de polímeros para la liberación de activos debido a las características únicas de éstos materiales. Algunas de éstas son: protección, soporte y mejora de la estabilidad de la formulación, carácter hidrofílico o hidrofóbico según el requerimiento, liberación rápida o controlada de la sustancia activa, mejora de la biodisponibilidad, etc. (Duncan, 2003).

Tomando en cuenta lo mencionado anteriormente, en este trabajo se prepararon películas a base de Eudragit® incluyendo los complejos de inclusión Ofloxacino- β -ciclodextrinas con el fin de contar con un sistema que prolongue el tiempo de residencia y liberación del fármaco al administrarse por vía ocular.

2. Marco Teórico

2.1 Anatomía del ojo humano

El globo ocular mide aproximadamente 2.5 cm de diámetro y desde el punto de vista anatómico su pared consta de tres capas: túnica fibrosa, úvea y retina. La túnica fibrosa es la cubierta superficial y avascular del globo ocular que en la parte anterior consta de la córnea y en la posterior de la esclerótica.

La córnea constituye una cubierta transparente y curva que recubre al iris siendo una de sus principales funciones el ayudar a enfocar la luz en la retina. Su superficie externa se compone del epitelio escamoso estratificado, la capa media de fibras de colágena y fibroblastos y la capa interna del epitelio escamoso simple. La esclerótica es la parte “blanca” del ojo, una capa de tejido conectivo denso que está formada principalmente por fibras de colágena y fibroblastos. Cubre al globo ocular, excepto en la región de la córnea confiriéndole forma y rigidez además de proteger sus partes internas como se muestra en la figura 1.

La úvea es la capa intermedia del globo ocular y se compone de tres partes, coroides, cuerpo ciliar e iris.

La coroides constituye la porción posterior de la úvea, recubre gran parte de la cara interna de la esclerótica y proporciona nutrimentos a la cara posterior de la retina. En la porción anterior de la úvea, la coroides se convierte en el cuerpo ciliar abarcando los procesos ciliares y el músculo ciliar. El iris es la porción de color del globo ocular, formado por fibras de músculo liso circulares y radiales y su función principal consiste en regular la cantidad de luz que llega al interior del globo ocular a través de la pupila. La pupila es el orificio que se observa en el centro del iris.

La tercera capa del globo ocular y la más interna es la retina cubriendo las tres cuartas partes posteriores del globo ocular y constituye el inicio de la vía visual. La retina es la única estructura del cuerpo donde se pueden apreciar directamente los vasos sanguíneos y examinarlos en busca de cambios patológicos, como los que ocurren con la hipertensión o la diabetes mellitus.

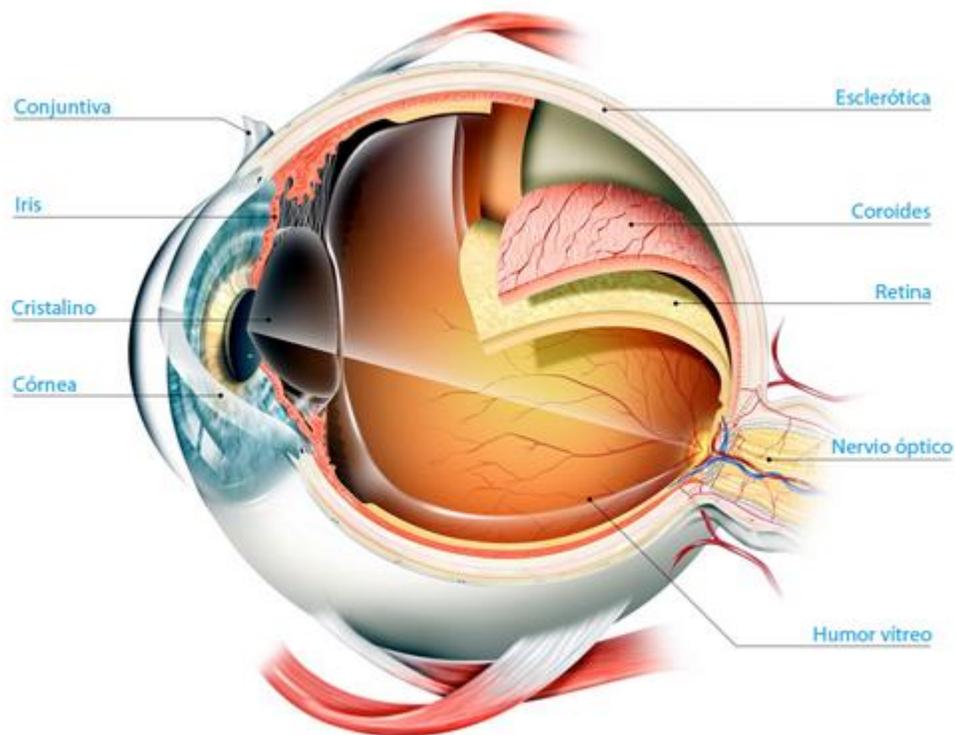


Figura 1. El ojo humano y sus principales estructuras. (tomada de drsoler.com)

La retina consta del epitelio pigmentario (porción no visual) y la zona neural (porción visual). El epitelio pigmentario es una lámina de células epiteliales que contienen melanina y se halla entre la coroides y la porción neural de la retina. La melanina de la coroides y del epitelio pigmentario absorben la luz difusa, lo cual impide la reflexión y la dispersión de la luz en el globo ocular y como consecuencia, se mantiene clara y nítida la imagen que proyecta la córnea y el cristalino en la retina. La zona neural de la retina es una excrecencia encefálica de capas múltiples que procesa ampliamente los datos visuales antes de transmitir los impulsos nerviosos al tálamo.

Dos tipos de fotorreceptores especializados translucen los rayos luminosos en potenciales de receptor, los bastones y los conos, en un número de 6 y 120 millones, respectivamente en cada retina. Los bastones tienen un bajo umbral luminoso lo cual nos permite ver con luz tenue y sólo distinguen tonos en gris. Por otro lado, con la luz brillante se estimulan los conos cuyo umbral es mayor y están especializados para la visión cromática. Su ubicación se muestra en la figura 2.

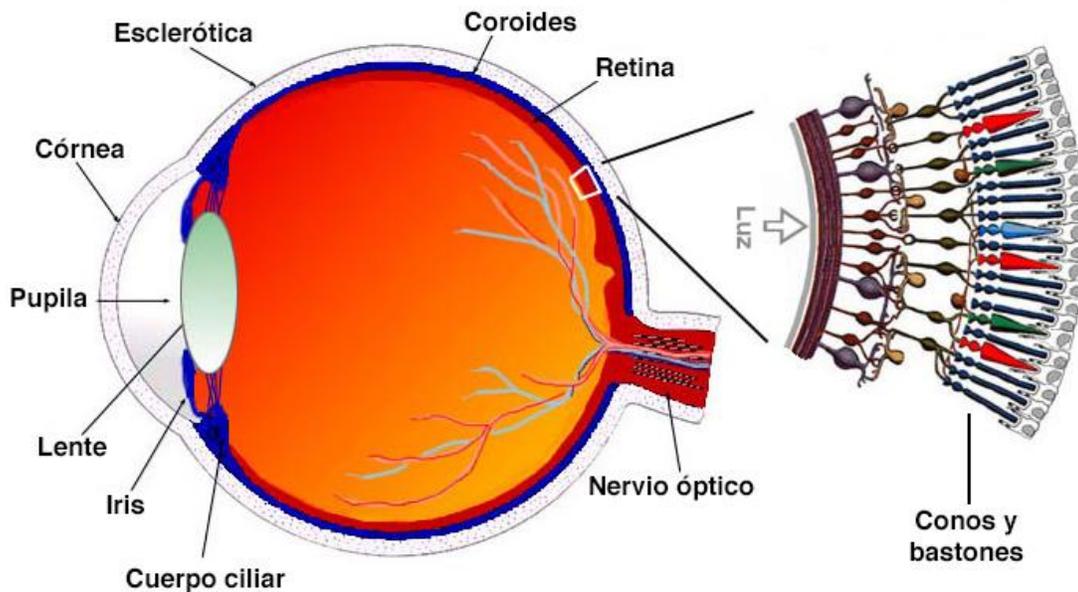


Figura 2. Localización de los conos y los bastones en la retina. (tomada de blueconemonochromacy.org)

El cristalino se encuentra justo en el plano posterior al iris y la pupila, dentro del globo ocular. Es totalmente transparente y está formado por proteínas llamadas cristalinas. El cristalino enfoca los rayos luminosos en la retina para facilitar la visión cercana.

El cristalino divide el interior del globo ocular en dos partes, la cavidad anterior y la cámara vítrea. La cavidad anterior se forma por la cámara anterior, que se localiza detrás de la córnea y antes del iris, y por la cámara posterior, después del iris y anterior a los ligamentos suspensorios del cristalino. La cavidad anterior contiene el humor acuoso, un líquido que se filtra continuamente de los capilares sanguíneos y nutre al cristalino y a la córnea. El interior del ojo tiene una presión aproximada de 16 mm Hg llamada presión intraocular, la cual es producida principalmente por el humor acuoso y esta presión permite que el globo ocular conserve su forma y evita su colapso.

La segunda cavidad más grande del globo ocular es la cámara vítrea que se sitúa entre el cristalino y la retina. Contiene el cuerpo vítreo, sustancia gelatinosa que también contribuye a la

presión intraocular y mantiene la retina adosada a la coroides a fin de que se tenga una superficie uniforme para la recepción de imágenes claras. Además, contiene células fagocitarias para poder mantener limpia esta parte del ojo y así no se obstruya la visión (Velázquez, 2010).

2.2. Absorción y eliminación de fármacos por la vía ocular

La administración de fármacos por la vía ocular representa un gran reto a causa de las características anatómicas y fisiológicas únicas que presenta el ojo humano. Las barreras tisulares, como la córnea, la retina y la conjuntiva, limitan el acceso de fármacos hacia sus objetivos específicos (Liu, 2012). Tomando en cuenta el corto tiempo de retención en el área precorneal de las formas farmacéuticas clásicas para la vía ocular (ej. Soluciones, suspensiones, ungüentos) que son rápidamente eliminados por el lagrimeo normal de los ojos y el movimiento de los parpados, se calcula que sólo de un 3 – 5 % de la cantidad inicial del fármaco administrado finalmente podrá ser absorbido para poder ejercer su efecto terapéutico (Hughes, 2005).

El ojo es considerado un órgano inmune privilegiado debido principalmente a las barreras hemato-oculares, el carácter avascular de la córnea, la ausencia de drenaje linfático desde la cámara anterior así como por la presencia de factores inmunomoduladores solubles en el humor acuoso (Holst, 2006). Entre estos, las barreras hemato-oculares juegan un papel protector que impiden la entrada de moléculas de la circulación sistémica a los compartimientos oculares (Occhiutto, 2012). Estas barreras se dividen en dos: barrera hemato-acuosa (BHA) y barrera hemato-retiniana (BHR) localizadas en el segmento anterior y posterior del ojo respectivamente.

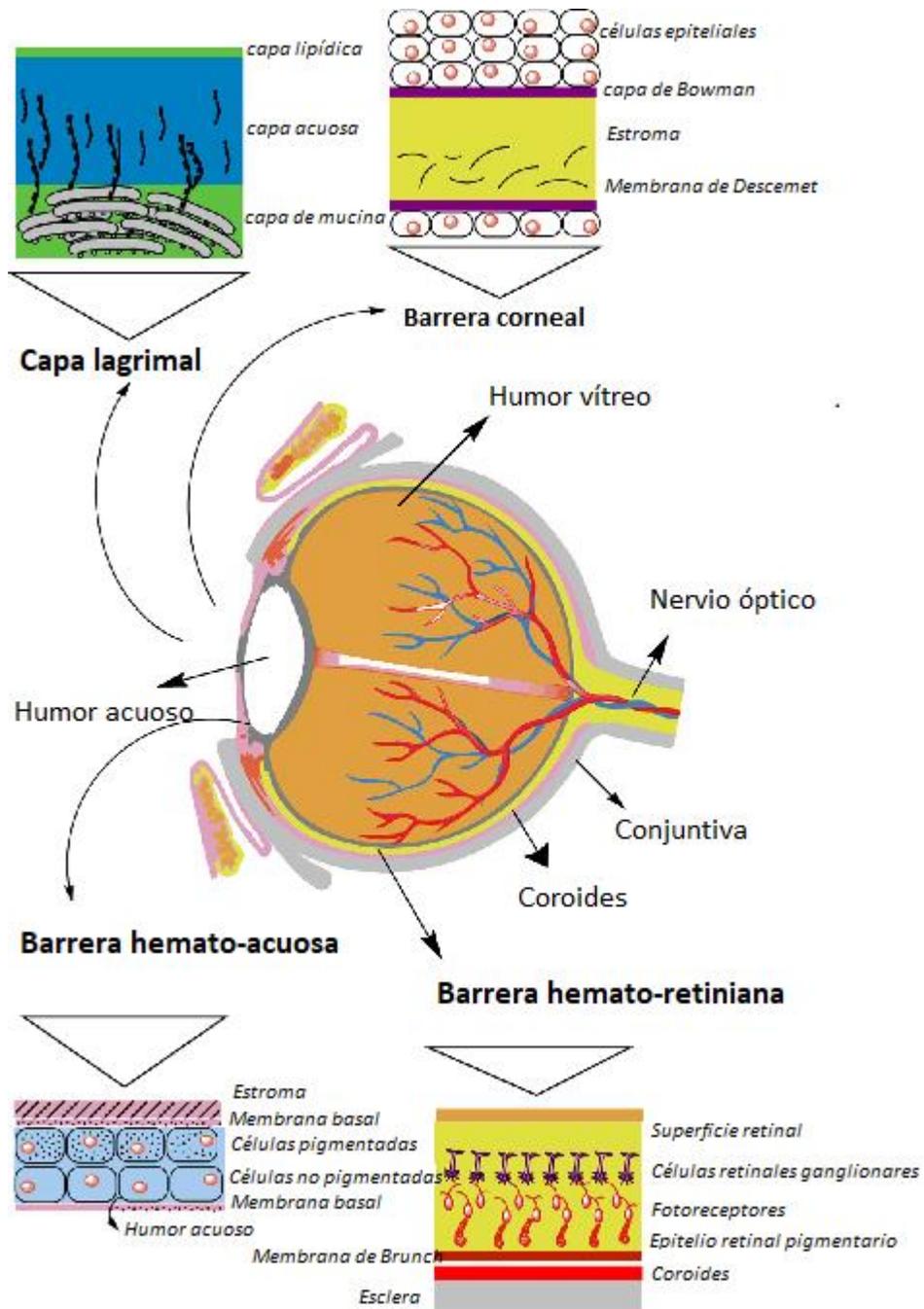


Figura 3. Estructura del ojo y barreras ante la penetración ocular de fármacos. (modificado de Sánchez-López et al., 2016)

2.2.1. Barreras.

2.2.1.1. Epitelio corneal.

Como se muestra en la figura 3, la barrera corneal epitelial está formada por uniones estrechas que limitan la permeabilidad intercelular. Ello dificulta el paso de los fármacos hidrófilos, mientras que favorece el de los lipófilos; a pesar de todo, la permeabilidad transcorneal es la ruta de entrada más importante desde el fluido lagrimal hasta el humor acuoso (Edwards, 2001). Por otro lado, la conjuntiva bulbar tiene un epitelio más permeable que la córnea y además presenta una superficie 20 veces mayor, lo cual supone una vía especialmente interesante, teniendo en cuenta su mayor permeabilidad para las moléculas hidrófilas de gran tamaño (Benedetti, 2009). Dado que, clínicamente, las formulaciones más usadas están constituidas por moléculas pequeñas y bastante lipófilas, se comprende que la vía corneal sea la predominante.

2.2.1.2. Barrera hemato-acuosa

Constituye la barrera hemato-ocular anterior y está compuesta por las uniones estrechas de las células endoteliales de los vasos uveales. Previene el acceso de la albúmina del plasma al interior del humor acuoso, limitando también el paso de los fármacos hidrófilos. La rotura de la integridad de esta barrera puede producirse como consecuencia de un proceso inflamatorio

2.2.1.3. Barrera hemato-retiniana

Es la barrera hemato-ocular posterior y está formada por las uniones estrechas tanto del epitelio pigmentario de la retina como del endotelio de los capilares retinianos. Si bien los fármacos acceden fácilmente al espacio extravascular coroideo, su entrada hacía la retina está muy limitada por el epitelio pigmentario de la retina y el endotelio de los vasos retinianos (Barar, 2008).

2.2.2. Vías de entrada y eliminación de los fármacos en el globo ocular

Existen distintas vías para llegar a los tejidos oculares que pueden seleccionarse según el tejido diana. De forma genérica, para el segmento anterior se utilizan preferentemente la vía tópica ocular y la subconjuntival, mientras que para el segmento posterior se usa normalmente la vía intravítrea.

2.2.2.1. Vía tópica ocular

Cuando el fármaco se administra en forma de solución en la superficie ocular, el tiempo de permanencia sobre dicha superficie es corto, sin embargo, es posible aumentarlo, y por lo tanto también su efecto terapéutico, modificando el diseño de su formulación (geles, insertos, nanopartículas). La permeabilidad a través de la córnea se produce por difusión pasiva, por difusión facilitada o por transporte activo. La difusión facilitada requiere la expresión de transportadores en el epitelio corneal, mientras que la difusión pasiva no es dependiente de proteínas transportadoras (Lee, 1990).

El fármaco puede eliminarse por dos vías:

- a) Desde el ángulo camerular a través del conducto de Schlemm, por los plexos esclerales profundo y superficial hasta alcanzar el plexo venoso y
- b) A través del flujo sanguíneo uveal, en cuyo caso el flujo depende de la capacidad del fármaco para atravesar las paredes de los vasos sanguíneos.

2.2.2.2. Vía subconjuntival

Por esta vía, el fármaco tiene que atravesar la esclerótica, que es más permeable que la córnea y, por lo tanto, su penetración no depende de la lipofilia del fármaco. Asimismo, la esclerótica permite el paso de moléculas de gran tamaño, que pueden alcanzar con cierta facilidad el lecho

coroideo (Cholkar, 2012) Sin embargo, llegar a la retina es más difícil al tener que atravesar el epitelio pigmentario, sobre todo para los componentes hidrófilos. En el caso de las moléculas pequeñas lipófilas, la permeabilidad es más fácil, pues es similar a la escleral.

2.2.2.3. Vía intravítrea

El fármaco se inyecta directamente dentro de la cavidad vítrea, lo que facilita el acceso al humor vítreo y la retina al no tener que atravesar la barrera del epitelio pigmentario de la retina. La difusión del fármaco es facilitada si sus moléculas son pequeñas (Gaudana, 2010).

La eliminación se lleva a cabo a través de dos rutas:

- a) Vía anterior: a través del vítreo, el fármaco alcanza la cámara posterior y desde aquí la eliminación se lleva a cabo a través de las vías del humor acuoso y el flujo uveal.
- b) Vía posterior: Se realiza a través de la barrera hemato-ocular posterior y se puede llevar a cabo mediante permeabilidad pasiva, como en el caso de pequeñas moléculas lipófilas, o por transporte activo a través de las citadas barreras.

2.3. Sistemas terapéuticos de liberación modificada destinados a la vía ocular.

El objetivo de los sistemas oftálmicos de liberación de fármacos ha sido tradicionalmente maximizar la velocidad de absorción del fármaco, minimizar la absorción sistémica y la reducción de los efectos adversos (Jarvinen, 1995). Una forma farmacéutica adecuada para la administración ocular debe superar las barreras de protección para asegurar los niveles terapéuticos adecuados del fármaco en los tejidos intraoculares.

Algunas de las principales ventajas del uso de sistemas terapéuticos de liberación modificada usados en sistemas destinados a la vía ocular se describen a continuación:

-
- a) Prolongar y controlar la liberación del fármaco a partir del sistema hacia los tejidos blanco.
 - b) La capacidad de superar las barreras hemato-oculares.
 - c) Incrementar el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente reduciendo la frecuencia de administración.
 - d) Proteger al fármaco de la inactivación a causa de las enzimas lacrimales.
 - e) Prolongar el tiempo de residencia del fármaco en el área precorneal aumentando la permeación.

Además de las características anatómicas y fisiológicas del aparato ocular, la penetración corneal depende de las propiedades del fármaco como lo son el coeficiente de partición, peso molecular, el tamaño y la carga que posea, además, de la forma de dosificación que se utilice (Ghate, 2006).

2.3.1. Nanopartículas poliméricas biodegradables

Las nanopartículas para la administración ocular de fármacos pueden estar formuladas con polímeros biocompatibles que se degradan en sus monómeros y otras por componentes que se eliminan del organismo de forma segura (Kimura, 2001). Numerosos compuestos han sido formulados en nanopartículas compuestas por ácido láctico co-glicólico (PLGA) con propósitos de liberación sostenida con una alta eficiencia en la encapsulación (Kompella, 2003). Cuando el activo se formula como nanopartículas, estas se pueden mezclar con un vehículo fluido y de esta manera administrarse por diferentes vías como tópica o intravítrea (Bin Choy, 2008). La velocidad de liberación del fármaco está determinada por la velocidad de degradación de la nanopartícula (Moshfeghi, 2005).

2.3.2. Implantes poliméricos biodegradables

Los polímeros biodegradables también se pueden formular como implantes que encapsulan fármacos con el objetivo de proporcionar una liberación controlada. La principal ventaja del uso de implantes biodegradables es una mayor capacidad de carga, lo que los hace capaces de liberar el fármaco por varias semanas e incluso meses cuando se trata de enfermedades crónicas que requieren tratamientos largos. Los implantes se introducen en el ojo por medio de técnicas quirúrgicas sencillas y se pueden colocar directamente en el vítreo o la esclerótica. Al igual que con las nanopartículas poliméricas biodegradables, el perfil de liberación se puede ver afectado por diferentes parámetros como pueden ser la carga del activo, el área superficial y el volumen del implante, la composición del polímero y su peso molecular y la solubilidad del fármaco (Manickavasagam, 2013).

2.3.3. Implantes no biodegradables

Los implantes no biodegradables típicamente contienen un núcleo en el que se encuentra el fármaco rodeado por una membrana semipermeable que permite la liberación contante del mismo con una cinética de liberación de orden cero por un lapso de meses e incluso años (Driot, 2004). Sin embargo, estos implantes se deben de retirar una vez que el fármaco se ha liberado por completo lo que implica una segunda intervención quirúrgica. Generalmente se fijan por medio de una sutura que se realiza directamente en la esclerótica (Baino, 2014).

2.3.4. Formación de geles “in situ”

Los geles formados “in situ” son soluciones de polímeros de baja viscosidad que sufren un cambio de fase como consecuencia de la aplicación de un estímulo. La transición de fase puede ser provocada por diferentes tipos de estímulos como son cambios en la temperatura, en el pH o en la fuerza iónica. Varios sistemas poliméricos de gelificación “in situ” han sido desarrollados a base de quitosan (Chen, 2012), poloxámeros (Qian, 2010), hidroxipropilmetilcelulosa (Boddu, 2010) y policoprolactona (Yin, 2010).

2.4. Características y aplicaciones de las ciclodextrinas

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos formados a partir de la degradación selectiva del almidón como consecuencia de la actividad de la enzima *bacillus macerans*. Las más comunes e importantes son las que contienen seis (α -CD), siete (β -CD) u ocho (γ -CD) unidades de glucosa (Figura 4) unidos mediante enlaces glucosídicos en la posición α -1,4 (Kurkov y Loftsson, 2012) y a causa de la conformación de silla que cada una de las unidades de glucopiranososa presenta, la forma final del agregado es la de un cono truncado con un extremo más ancho que el otro. Es esta forma particular lo que permite la interacción de moléculas con un tamaño que se ajusta al interior del cono y de esta manera se formen los complejos de inclusión (Figura 5).

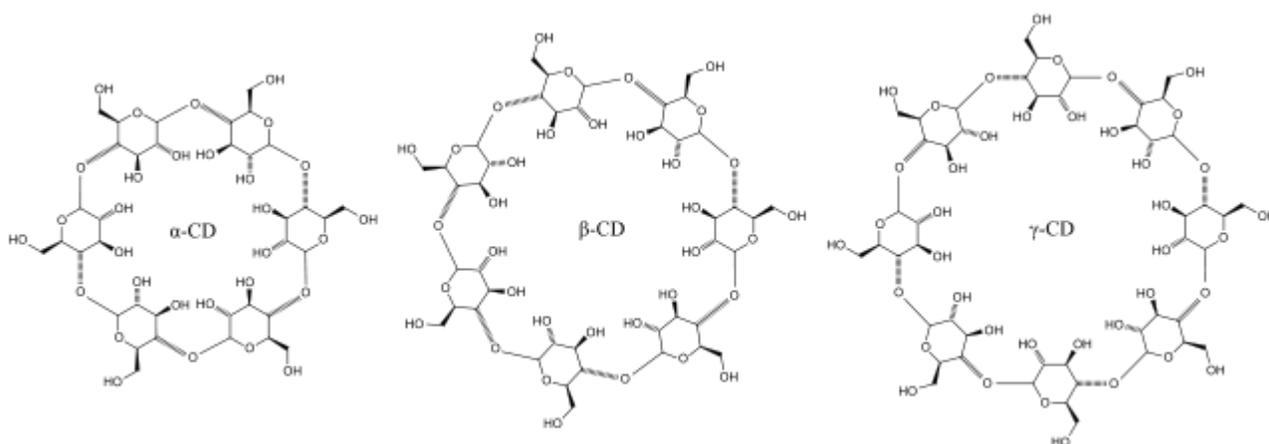


Figura 4. Estructura de las tres principales ciclodextrinas nativas (Brewster y Loftsson, 2007).

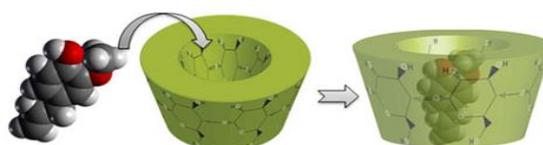


Figura 5. Representación esquemática de la formación de los complejos de inclusión (Kayaci et al., 2014).

Las funcionalidades hidroxilo están orientadas hacia el exterior del cono, con los grupos hidroxilo primarios en la parte más estrecha y los grupos hidroxilo secundarios en la parte más amplia. En la cavidad central de la molécula se conserva el esqueleto constituido por los carbonos que forman los anillos de glucosa así como los grupos éter de los mismos lo que le

confiere su peculiar carácter lipófilo. (Loftsson y Duchêne, 2007). En solución acuosa, los grupos hidroxilo forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua que rodean a la molécula teniendo como consecuencia su hidratación y su posterior disolución (Bone, 2006). De esta manera, es posible explicar la capacidad de aumentar la solubilidad acuosa de fármacos, y compuestos en general, que son poco solubles.

Por otra parte, y en aparente contradicción con lo anterior, la solubilidad acuosa de las principales ciclodextrinas nativas es mucho menor en comparación con sus contrapartes lineares (dextrinas lineares) debido a la relativa fuerza de enlace de las unidades de glucosa en las ciclodextrinas en estado cristalino. Además, las moléculas de β -CD presentan la tendencia a formar puentes de hidrógeno intramoleculares lo que disminuye la capacidad de formar puentes de hidrogeno con las moléculas de agua (Loftsson y Duchêne, 2007). Varios derivados semisintéticos de la celulosa solubles en agua han sido preparados mediante modificaciones químicas (carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa) y han sido utilizados en innumerables productos. Después, modificaciones similares fueron aplicadas a las ciclodextrinas para obtener derivados mucho más solubles, encontrándose que la sustitución de cualquier grupo hidroxilo por otras funcionalidades, que incluso poseían cierto carácter hidrófobo, aumentaban de manera considerable la solubilidad.

En la década de 1970, las investigaciones relacionadas con el uso de ciclodextrinas comenzaron a proyectarse tanto para aplicaciones en la industria cosmética como en la alimentaria (Vaution, et. al, 1987). En la industria de los alimentos, fueron investigadas con fines de estabilizantes para agentes saborizantes así como para lograr reducir olores y sabores desagradables. En la industria cosmética, también se probaron como estabilizantes de algunos compuestos químicamente lábiles, como agentes enmascarantes de olores y como reductores de la irritación que causan algunos componentes en las formulaciones.

En la figura 6 y 7 se muestra la estructura química de las dos ciclodextrinas utilizadas en este trabajo y en las tablas 1 y 2 algunas de sus respectivas propiedades fisicoquímicas.

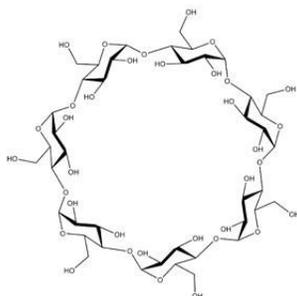


Figura 6. Estructura química de la beta-Ciclodextrina (Brewster y Loftsson, 2007).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la beta-Ciclodextrina

| | |
|------------------------|--|
| Nombre químico | Ciclomaltoheptosa |
| Formula química | $C_{42}H_{70}O_{35}$ |
| Masa molecular | 1135 g/mol |
| Solubilidad | 1 en 200 partes de propilenglicol, 1 en 50 partes de agua a 20 °C, 1 en 20 partes a 50°C, prácticamente insoluble en acetona, etanol y cloruro de metileno |
| Punto de fusión | 255-265 °C |
| Apariencia | Polvo fino cristalino blanco, prácticamente inodoro con sabor ligeramente dulce |

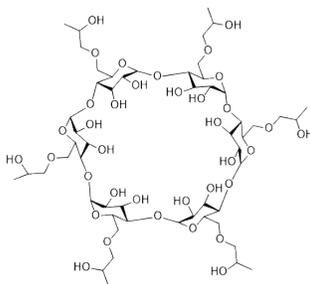


Figura 7. Estructura química de Hidroxipropil-beta-ciclodextrina (Brewster y Loftsson, 2007).

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de Hidroxipropil-beta-Ciclodextrina

| | |
|------------------------|--|
| Nombre químico | 2-hidroxipropil ciclomaltoheptosa |
| Formula química | $C_{42}H_{70}O_{35}(C_3H_6O)_7$ |
| Masa molecular | 1410 g/mol |
| Solubilidad | Muy soluble en agua y propilenglicol, soluble en etanol, metanol, dimetilsulfóxido y dimetilformaldehído |
| Punto de fusión | 278 °C |
| Apariencia | Polvo blanco cristalino |

2.5. Métodos de preparación de los complejos de inclusión

Existen diferentes métodos de preparación de los complejos de inclusión, cada uno con sus respectivas limitaciones y ventajas dependientes de las características de la molécula que se pretenda incluir así como de la ciclodextrina a utilizar. De manera general se pueden dividir en dos grupos:

- a) Obtención de complejos de inclusión en fase líquida donde los principales métodos son la co-precipitación y la mezcla de disolventes (Li, et al., 2005)
- b) Obtención de complejos de inclusión en estado sólido donde resaltan los métodos por liofilización, molienda, mezcla física y amasado (Al-Marzouqi, et al., 2007).

2.6. Caracterización de los complejos de inclusión

La evaluación de la formación de los complejos de inclusión fármaco-CD y su caracterización completa no es una tarea simple y a menudo requiere el uso de diferentes técnicas analíticas, cuyos resultados deben combinarse y examinarse juntos, ya que cada método explora características particulares del complejo. El uso complementario de diferentes técnicas puede permitir una comprensión mejor y más profunda de las interacciones huésped-hospedero y ayudar en la selección de la CD más apropiada para una molécula huésped dada.

Los diferentes métodos disponibles se basan generalmente en la detección de alguna variación en cualquier propiedad física o química adecuada del huésped como consecuencia de la inclusión. Es esencial que la variación observada sea lo suficientemente grande como para ser detectada o estimada con suficiente precisión, además, cualquier método de medición tiene de sus propios inconvenientes, que deben ser tomados en cuenta, a fin de evaluar cuánto pueden afectar la fiabilidad de los resultados (Mura, 2015).

Los principales métodos de caracterización de los complejos de inclusión se pueden dividir en función del estado físico en el que se encuentren, ya sea en solución (Tabla 3) o en estado sólido (Tabla 4).

Tabla 3. Técnicas analíticas de caracterización de complejos de inclusión en solución.

| | |
|--|--|
| Métodos Espectroscópicos | <ul style="list-style-type: none"> • UV/Vis • Dicroísmo Circular • Fluorescencia • Resonancia Magnética Nuclear • Resonancia de Spin del Electrón |
| Métodos Electroanalíticos | <ul style="list-style-type: none"> • Polarografía • Voltimetría • Potenciometría • Conductimetría |
| Métodos de Separación | <ul style="list-style-type: none"> • Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución • Electroforesis Capilar |
| Polarimetría | |
| Calorimetría de Titulación Isotérmica | |

Tabla 4. Técnicas analíticas de caracterización de complejos de inclusión en estado sólido.

| | |
|---|--|
| Métodos de Análisis Térmico | <ul style="list-style-type: none"> • Calorimetría Diferencial de Barrido • Análisis Termogravimétrico • Microscopía de Fase Caliente |
| Difracción de Rayos X | <ul style="list-style-type: none"> • Difracción de Rayos X Monocristal • Difracción de Rayos X de Polvos |
| Métodos Espectroscópicos | <ul style="list-style-type: none"> • Espectroscopía de Infrarrojo por Transformadas de Fourier (FTIR) • FTIR/Reflectancia Total Atenuada • Espectroscopía Raman |
| Microscopía Electrónica de Barrido | |

2.7. Uso del polímero Eudragit® RS 30D/RL 30D como matriz de liberación modificada.

Los polímeros acrílicos y sus derivados comúnmente conocidos como Eudragit® fueron los primeros polímeros sintéticos usados en los recubrimientos farmacéuticos como dispersiones poliméricas acuosas (Lehmann, 1982). Las películas formadas tienen excelentes propiedades mecánicas, buena flexibilidad y buena calidad estética.

Son insolubles en agua y forman películas hinchables. Están estructurados por ésteres neutros del ácido metacrílico con pequeñas porciones de cloruro de trimetilanimonio metacrilato. En el Eudragit® RL 30D la relación molar de los grupos amonio cuaternario con respecto a los grupos ésteres neutros es de 1:20 (correspondiente a cerca de 50 meq. /100 g.) y para el Eudragit® RS 30D la relación es de 1:40 (correspondiente a aproximadamente 25 meq./100 g.). La estructura de los tipos de polímeros se muestra en la figura 8.

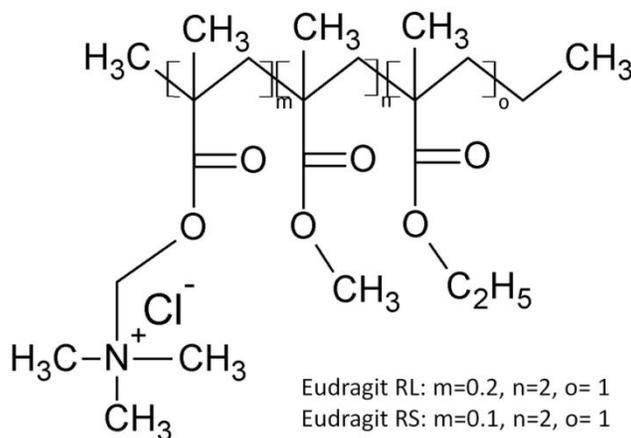


Figura 8. Estructura química del Eudragit® RL 30D y RS 30D (Quinten, 2010).

Como los grupos amonio cuaternario determinan el grado de hinchamiento y la permeabilidad de las películas en medio acuoso, el Eudragit® RL 30D, que posee más de estos grupos, forma películas más permeables con una ligera acción retardante. Por el contrario, y debido al reducido número de grupos amonio cuaternario, las películas de Eudragit® RS 30D se hinchan con menos facilidad y son sólo ligeramente permeables a los ingredientes activos. Dada la formación de una

película coherente con un espesor adecuado, es posible reducir la velocidad de difusión del fármaco notablemente.

2.8. Características y propiedades del Ofloxacino

El Ofloxacino (figura 9) es un fármaco perteneciente a la familia de las quinolonas, específicamente al de las fluoroquinolonas de segunda generación y que por lo tanto son consideradas de amplio espectro, efectivas contra bacterias gram-negativas y gram-positivas. Las fluoroquinolonas afectan el funcionamiento normal del ADN bacteriano, actuando sobre la enzima ADN-girasa, encargada de evitar el enrollamiento excesivo de las dos banda de ADN cuando se separan antes de su replicación o transcripción (Velázquez, 2010).

Las fluoroquinolonas presentan un perfil farmacocinético mucho más favorable que las quinolonas de primera generación además, el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas es menor. En la tabla 5 se resumen algunas de las propiedades fisicoquímicas del Ofloxacino.

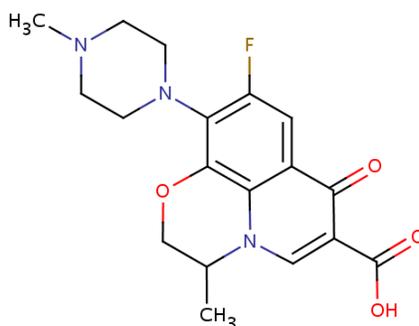


Figura 9. Estructura química del Ofloxacino (tomada de drugbank.ca)

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas del Ofloxacino

| | |
|------------------------|--|
| Nombre químico | Ácido (±)-9-fluoro-2,3-dihidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-oxo-7H-pirido[1,2,3-de]-1,4-benzoxazina-6-carboxílico |
| Formula química | C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄ |
| Masa molecular | 361.38 g/mol |
| Solubilidad | Ligeramente soluble en agua, alcohol, diclorometano y alcohol metílico. Poco soluble en cloroformo. Soluble en soluciones ácidas |
| Punto de fusión | 254 °C |
| Apariencia | Polvo de color amarillo pálido a amarillo brillante |
| pka | 5.5 |

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Formular y caracterizar insertos oculares a base de Eudragit®, para la liberación de Ofloxacino incorporado como un complejo de inclusión con β -Ciclodextrinas.

3.2 Objetivos Particulares

- Preparar los complejos de inclusión Ofloxacino/Hidroxipropil- β -CD y Ofloxacino/ β -CD mediante los métodos de amasado y co-precipitación con el fin de incrementar su solubilidad acuosa y prolongar la liberación del fármaco a partir de un sistema terapéutico destinado a la vía ocular.
- Caracterizar los complejos obtenidos mediante pruebas de solubilidad, espectrofotometría UV, espectroscopía de infrarrojo, microscopía electrónica de barrido y calorimetría diferencial de barrido para evidenciar su formación.
- Estudiar la liberación de los complejos de inclusión Ofloxacino/ β -Ciclodextrinas formulados en insertos oculares, mediante la aplicación de un método in vitro, con el fin de determinar su comportamiento en fluido lacrimonal simulado.

4. Hipótesis

La formación de complejos de inclusión ofloxacino/ β -Ciclodextrinas incrementará la solubilidad acuosa del fármaco, permitiendo su incorporación en las películas poliméricas sin el uso de un disolvente orgánico o un ácido, contribuyendo a prolongar la liberación del ofloxacino.

5. Desarrollo Experimental

5.1 Reactivos

- Agua Destilada (J.T. Baker®)
- Ofloxacino (Helm de México)
- β -Ciclodextrina (Ashland Chemical de México)
- Hidroxipropil- β -Ciclodextrina (Ashland Chemical de México)
- Alcohol Metílico (Reactivos Química Meyer®)
- Hidróxido de Sodio (Macron Fine Chemicals®)
- Ácido Clorhídrico (J.T. Baker®)
- Eudragit® RL 30D (Helm de México)
- Trietilcitrate (Helm de México)
- Bicarbonato de Sodio (Reactivos Química Meyer®)
- Cloruro de Sodio (Fermont, Productos Químicos Monterrey®)
- Cloruro de Potasio (Fermont, Productos Químicos Monterrey®)
- Cloruro de Calcio (Fermont, Productos Químicos Monterrey®)
- Buffer pH = 4 (Fermont, Productos Químicos Monterrey®)
- Buffer pH = 7 (Fermont, Productos Químicos Monterrey®)
- Buffer pH = 10 (Fermont, Productos Químicos Monterrey®)

5.2 Materiales

- Vasos de precipitados de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL
- Matraces volumétricos de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 mL
- Frascos viales de 10 mL
- Barras magnéticas
- Espátulas
- Pesamuestras

-
- Mortero con pistilo
 - Probetas
 - Desecadores
 - Placas de teflón
 - Pipetas volumétricas de 1, 2 3, 4, 5, 6 y 7 mL
 - Pipetas pasteur
 - Papel Parafilm®
 - Filtros de membrana

5.3 Equipos e instrumentos

- Agitadores magnéticos multiplaza R015, IKA, Estados Unidos
- Centrifuga EBA 12, Hettich, Alemania
- Sonicador Branson 5510, Estados Unidos
- Micropipetas Brand, Alemania
- Espectrofotómetro UV/Vis, Hitachi U-5100, Japón
- Espectrofotómetro de Infrarrojo, NICOLET iS10 Thermo Scientific, Estados Unidos
- Calorímetro Q20, TA Instruments, Estados Unidos
- Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JMS-25sll, Japón
- Estufa de secado Memmert IF75, Alemania
- Termostato PolyScience 7306^a11B, Estados Unidos
- Potenciómetro 700 Oakton, Estados Unidos
- Balanza analítica ATX224 Shimadzu, Japón
- Micrómetro digital Mitutoyo MZD698, Estados Unidos
- Texturómetro Brookfield CT3, Estados Unidos

5.4 Espectros de absorción y curvas de calibración

Se prepararon soluciones de ofloxacino con concentración igual a 10 $\mu\text{g/mL}$ en agua, metanol y fluido lacrimal simulado (STF) y se obtuvieron los espectros de absorción en un intervalo de 200 a 400 nm para determinar la longitud de onda de máxima absorbancia en cada uno de los medios. También se obtuvieron los espectros de absorción para cada una de las ciclodextrinas en los diferentes medios a fin de corroborar la inexistencia de alguna señal.

Las curvas de calibración se prepararon de la siguiente manera:

1. Se preparó una solución stock de ofloxacino de concentración 40 $\mu\text{g/mL}$
2. A partir de la solución stock, se prepararon por triplicado soluciones con concentraciones de 1.6, 3.2, 4.8, 6.4, 8.0, 9.6 y 11.2 $\mu\text{g/mL}$. La solución de concentración 6.4 $\mu\text{g/mL}$ se preparó por sextuplicado.

El procedimiento anterior se llevó a cabo tanto en agua, metanol y fluido lacrimal simulado leyéndose aleatoriamente en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 289, 298 y 286 nm respectivamente. Una vez realizadas todas las mediciones se calcularon los coeficientes de absorptividad.

El fluido lacrimal simulado se preparó de la siguiente manera:

1. En un vaso de precipitados de volumen adecuado se pesaron 2.18 g. de bicarbonato de sodio, 6.78 g. de cloruro de sodio, 0.032 g. de cloruro de calcio y 1.38 g. de cloruro de potasio.
2. Se agregaron aproximadamente 700 mL de agua destilada para disolver los componentes.
3. Se ajustó el pH de la solución a 7.4 con una solución de ácido clorhídrico 0.1 N.
4. La solución se trasvasó a un matraz volumétrico de 1000 mL y se llevó hasta la marca de aforo.

5.5 Construcción de los diagramas de solubilidad de fase

La construcción de los diagramas de solubilidad de fase se realizó con el objetivo de determinar la estequiometría de complejación entre el ofloxacino y las ciclodextrinas de acuerdo a la metodología propuesta por Higuchi y Connors (Higuchi y Connors, 1965).

1. En frascos viales de tamaño adecuado se colocaron de manera individual, 10 ml de solución de ciclodextrina a diferentes niveles de concentración: 0.0, 2.8, 9.0, 27.1, 56.4 y 112.8 mg/mL para los sistemas con HP- β -CD y 0.0, 0.5, 0.9, 2.7, 5.7 y 11.4 mg/mL para los sistemas con β -CD.
2. Se agregó fármaco en exceso a cada uno de los sistemas y se mantuvieron en agitación constante por 48 horas.
3. Se filtró el contenido de los viales y se determinó la cantidad de fármaco disuelto. Todos los sistemas se prepararon por triplicado.

5.6 Preparación de los complejos de inclusión

Como métodos de preparación se seleccionaron los métodos de amasado y co-precipitación y se utilizó una mezcla metanol:agua (20:80) como disolvente.

5.6.1 Método de amasado

1. En un mortero de tamaño adecuado se colocaron HP- β -CD y ofloxacino en proporción 3.9:1, en el caso de β -CD la proporción es 3.1:1
2. Se agregaron 200 μ l de disolvente y se amasó la mezcla con la ayuda del pistilo durante 5 min.

-
3. Una vez evaporado todo el disolvente, las muestras se mantuvieron en desecador.

5.6.2 Método de co-precipitación.

1. Se preparó una solución de 2 mg/mL de HP- β -CD y 1.6 mg/mL en el caso de β -CD (Solución A).
2. Se preparó una solución de 0.33 mg/mL de ofloxacino. (Solución B).
3. Se mezcló la solución A con la solución B en proporción 1:1.5 y se mantuvo en agitación constante por 48 horas.
4. Se eliminó la totalidad del disolvente y se colocaron las muestras en desecador.

Una vez preparados los complejos por ambos métodos y utilizando cada una de las ciclodextrinas se tomaron muestras suficientes y se caracterizaron por medio de las pruebas de solubilidad, espectrofotometría UV, calorimetría diferencial de barrido, microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de infrarrojo.

5.7 Preparación de las películas poliméricas

Se prepararon películas blanco, películas que contenían el fármaco y películas que contenían el fármaco en forma de complejo de inclusión. Las dispersiones se prepararon utilizando una concentración de sólidos totales del 15% p/p, una cantidad del plastificante trietilcitrate del 24% con respecto al polímero seco (Eudragit® RL 30D es una dispersión acuosa al 30 %) y una cantidad de polímero de 60 mg/cm². Es importante mencionar que se consideran como sólidos a todos los componentes de la formulación diferentes al agua independientemente de su estado físico.

El método de preparación fue el siguiente:

-
- 1a. En un vaso de precipitados previamente tarado, se colocaron polímero, plastificante y agua destilada en proporción 13.9 : 1 : 19.6 respectivamente para el caso de las películas blanco.
 - 1b. En el caso de las películas con fármaco se colocaron ofloxacino (una vez pesado, se disolvió utilizando unas gotas de HCl 0.1 N), polímero, plastificante y agua destilada en proporción 0.4 : 13.9 : 1 : 21.9 respectivamente.
 - 1c. Para el caso de las películas con el complejo, se colocaron complejo, polímero, plastificante y agua destilada en proporción 1.8 : 13.9 : 1 : 29.8 respectivamente.
 2. Los sistemas se agitaron de manera constante durante 10 minutos para después ser sonicados durante 10 min más.
 3. El contenido se vertió en moldes de teflón con un área de 45 cm² previamente nivelados en el interior del horno de secado a 38 °C
 4. Las películas se secaron en el horno durante un periodo de 24 h.

Se tomaron muestras de las 3 películas y se realizaron pruebas de tensión y uniformidad de grosor.

5.8 Evaluación de la liberación de ofloxacino a partir de las películas poliméricas

Se cortaron insertos con un diámetro de 4.5 mm y 0.159 cm² de área, se evaluó la uniformidad de masa, uniformidad de grosor y uniformidad de contenido. Las liberaciones se realizaron utilizando como medio de disolución fluido lacrimal simulado pH =7.4. Se montó un aparato de recirculación de agua con una temperatura de 37 °C. El procedimiento general se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Por separado, se colocaron cada uno de los insertos (blanco, fármaco y complejo) en pequeños frascos viales que contenían 1 mL del medio de disolución con un agitador

magnético. Todos los viales se colocaron en el aparato de recirculación y se mantuvieron en agitación constante.

- De cada uno de los viales se extrajo la totalidad del medio y se colocó 1 mL de medio de disolución nuevo previamente equilibrado a 37 °C.
- Los muestreos se realizaron cada 15 minutos durante los primeros 60 y después cada hora hasta completarse 4 horas. Todas las muestras se prepararon por sextuplicado.

6. Resultados y discusión

6.1 Espectros de absorción UV/Vis

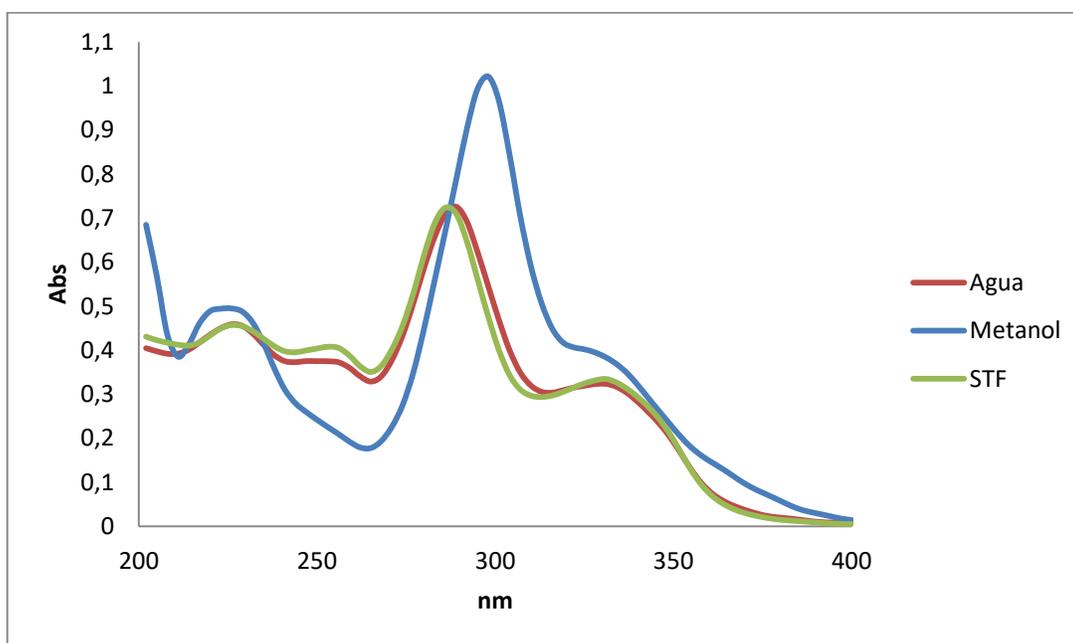


Gráfico 1. Espectros de absorción del Ofloxacino en diferentes medios. En todos los casos se utilizaron soluciones a una concentración de 10 µg/mL. La longitud del paso óptico es de 1cm.

Mediante la obtención de los espectros de absorción podemos visualizar la variación de la absorbancia con la longitud de onda de la radiación electromagnética y mediante su análisis podemos determinar la longitud de onda de trabajo adecuada, que por lo regular, es la longitud en la que se presenta la mayor absorbancia del analito.

En el gráfico 1 es posible observar las diferencias en el espectro de absorción del ofloxacino en los diferentes medios, encontrando las longitudes de onda de máxima absorbancia a 289, 298 y 286 nm para agua, metanol y fluido lacrimal simulado respectivamente. Este cambio en la longitud de onda está relacionado con las características propias de cada uno de los medios como lo son el pH, la polaridad y la fuerza iónica (Remington, 2000). El espectro es muy similar en todo el intervalo de longitudes de onda analizado cuando se utiliza agua y fluido lacrimal simulado además de obtenerse valores máximos de absorción muy similares aunque se desplaza hacia la izquierda la longitud de onda de máxima absorción en el fluido lacrimal simulado. También se observa un pico secundario a los 331 nm. En el caso del espectro obtenido en metanol, se observan diferencias con respecto a los otros medios presentándose un efecto hipocrómico a los 265 nm así como un efecto hipercrómico a los 298 nm desplazándose hacia una longitud de onda mayor con respecto a la longitud de onda de máxima absorción observada en los otros dos medios. Además, el pico secundario que aparece en los otros medios se vuelve menos pronunciado.

6.2 Diagramas de solubilidad de fase

Tabla 6. Cantidad de fármaco disuelto en soluciones de HP- β -CD

| [HP- β -CD] (mg/mL) | [Ofloxacino] (mg/mL) |
|------------------------------|-------------------------|
| 112.80 | 57.71 |
| 56.40 | 46.22 |
| 27.07 | 39.5 |
| 9.02 | 33.83 |
| 2.82 | 32.95 |
| 0.00 | 31.98 |

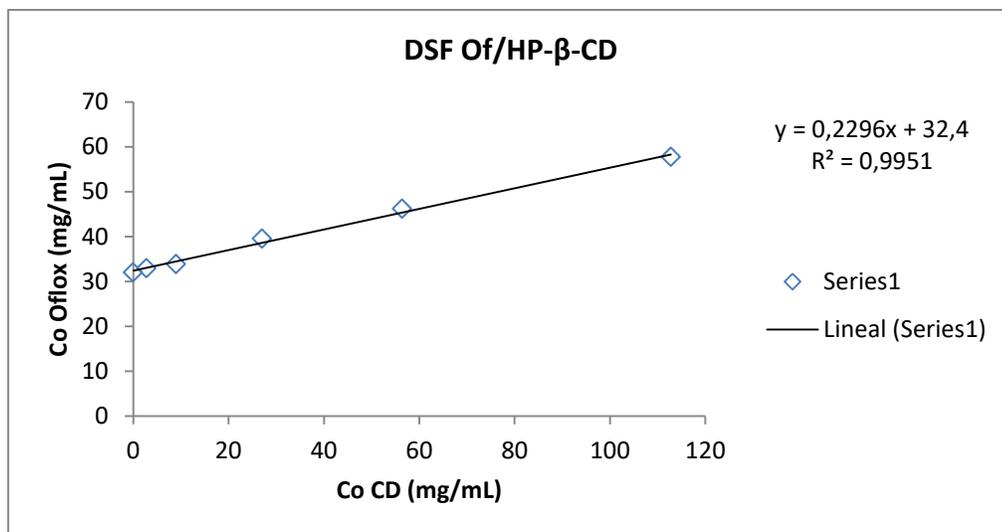


Gráfico 2. Diagrama de solubilidad de fase Ofloxacino/HP-β-CD

Tabla 7. Cantidad de fármaco disuelto en soluciones de β-CD

| [β-CD] (mg/mL) | [Ofloxacino] (mg/mL) |
|----------------|----------------------|
| 11.35 | 37.60 |
| 5.68 | 34.54 |
| 2.72 | 33.70 |
| 0.91 | 32.43 |
| 0.45 | 32.40 |
| 0.00 | 31.98 |

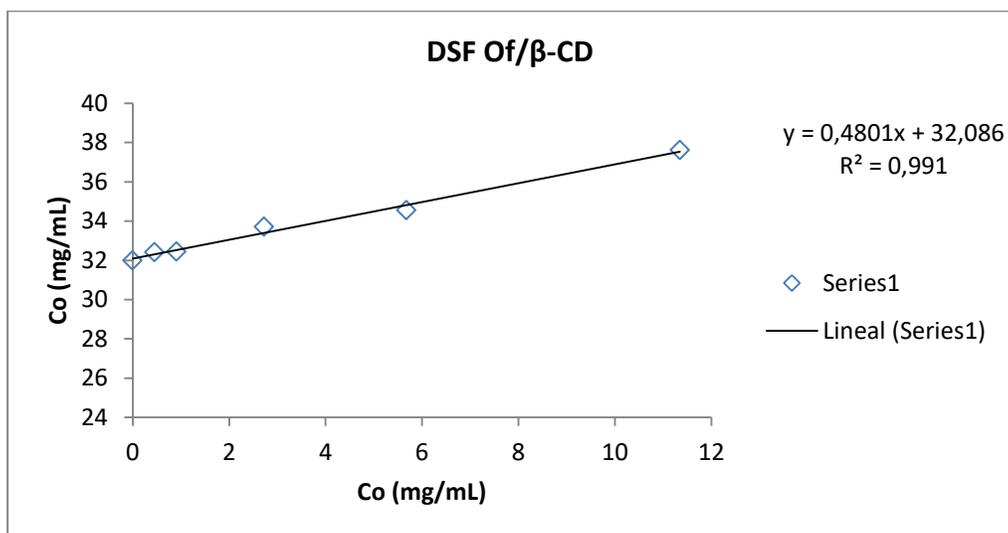


Gráfico 3. Diagrama de solubilidad de fase Ofloxacino/β-CD

La construcción de los diagramas de solubilidad de fase es una de las técnicas más empleadas en la determinación de la estequiometría de la formación de los complejos de inclusión con ciclodextrinas y se obtiene de los resultados de solubilidad de la molécula huésped en función del incremento de la concentración de las ciclodextrinas. De acuerdo con el modelo propuesto por Higuchi y Connors (Higuchi y Connors, 1965), los diagramas pueden ser de tipo A en donde la solubilidad de la molécula huésped aumenta a medida que aumenta la concentración de la ciclodextrina indicando la formación de complejos solubles, o de tipo B, cuando el complejo es insoluble y la concentración de la molécula huésped disminuye conforme aumenta la concentración de la ciclodextrina, tal como se observa en el gráfico 4.

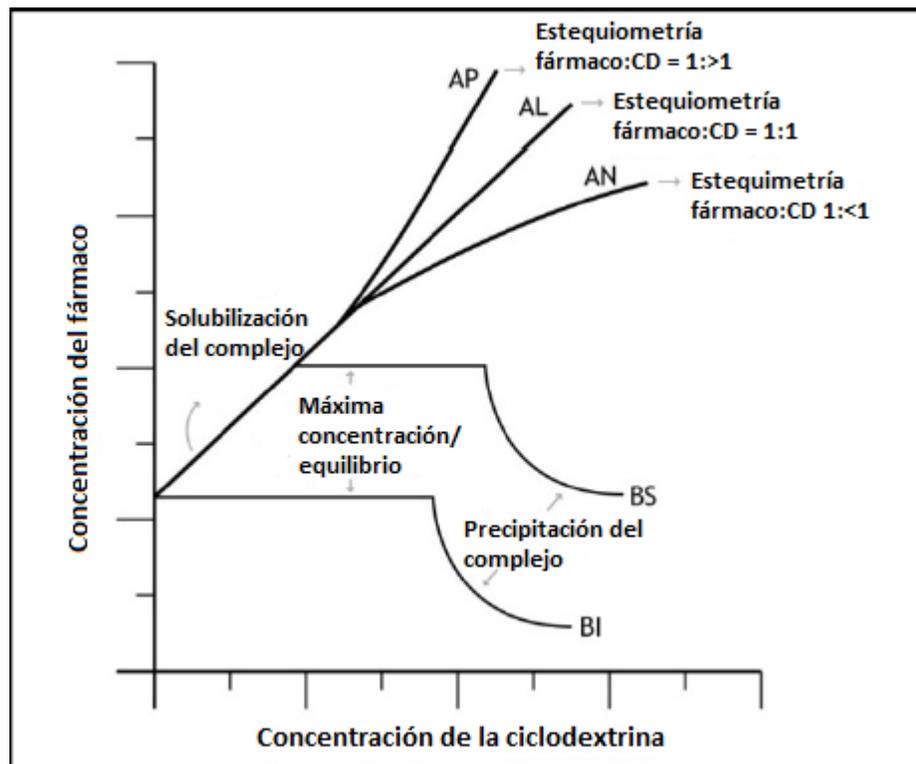


Gráfico 4. Diferentes tipos de diagramas de solubilidad de fase obtenidos de la complejación de fármacos con ciclodextrinas.

Los diagramas de tipo B pueden tomar la forma BS (soluble) en la que el complejo tiene una solubilidad limitada. Inicialmente hay una concentración creciente de la molécula huésped y cuando se alcanza el límite de solubilidad ocurre la precipitación, lo que disminuye la

concentración. El diagrama tipo BI se presenta cuando el complejo es insoluble y hay un cierto equilibrio inicial, pero después de cierta concentración se produce la precipitación del complejo.

Como se observa en los gráficos 2 y 3 los diagramas obtenidos son del tipo AL por lo tanto la relación entre la solubilidad del fármaco es proporcional a la concentración de las ciclodextrinas lo que indica que la complejación se da en relación estequiométrica 1:1. En los gráficos también se incluye la ecuación del análisis de regresión lineal para cada uno de los sistemas con su respectivo coeficiente de determinación, que es una buena aproximación para asumir la linealidad de la curva. Los resultados de la cantidad de fármaco disuelto para cada uno de los sistemas aparecen en las tablas 6 y 7. Otro dato importante que es posible obtener por medio de la construcción de los diagramas de solubilidad de fase es el relacionado al cálculo de la constante de formación (K_c) asociada a la interacción entre el fármaco con cada una de las ciclodextrinas así como la eficiencia “teórica” de complejación (Brewster y Loftsson, 2007). Los resultados se muestran en la tabla 8.

Hay que resaltar que esta eficiencia de complejación (EC) “teórica” es resultado del comportamiento que presenta el aumento de la solubilidad del fármaco en presencia de cantidades crecientes de ciclodextrinas observado en los diagramas de solubilidad de fase más no de la evaluación de la eficiencia de complejación calculada después de preparar los complejos. Sin embargo, resulta una aproximación útil para poder visualizar las diferencias en la fuerza de interacción del fármaco con cada una de las ciclodextrinas.

Tabla 8. Constantes de formación y eficiencias de complejación obtenidos de los diagramas de solubilidad de fase

| K_c | | EC | |
|-----------------------|------------------------|-----------|--------|
| HP-β-CD | β-CD | HP-β-CD | β-CD |
| 332.2 M ⁻¹ | 1039.9 M ⁻¹ | 29.8 % | 92.3 % |

Los mayores valores de K_c y EC que presentan los sistemas preparados con β-CD se pueden explicar observando los diagramas de solubilidad de fase. El incremento en la solubilidad del fármaco se produce aun cuando el incremento en la concentración de la β-CD es menor en comparación con la HP-β-CD.

Un incremento de igual magnitud en la solubilidad de fármaco se produce con una menor cantidad de β -CD en comparación con la HP- β -CD. Por ejemplo, para obtener un incremento en la cantidad de ofloxacino disuelto igual a 37.6 mg/mL se requiere una concentración de β -CD de 11.35 mg/mL (tabla 7) y para obtener la misma cantidad de fármaco disuelto en los sistemas con HP- β -CD, por interpolación de resultados, se necesitaría una concentración de ciclodextrina igual a 22.7 mg/mL, es decir, un aumento del doble. De la misma manera, para obtener una concentración de 57.7 mg/mL de ofloxacino utilizando β -CD, se necesitaría una concentración aproximada de 53.4 mg/mL de la misma, es decir, sólo la mitad de la cantidad necesaria que cuando se utiliza HP- β -CD.

6.3 Pruebas de solubilidad

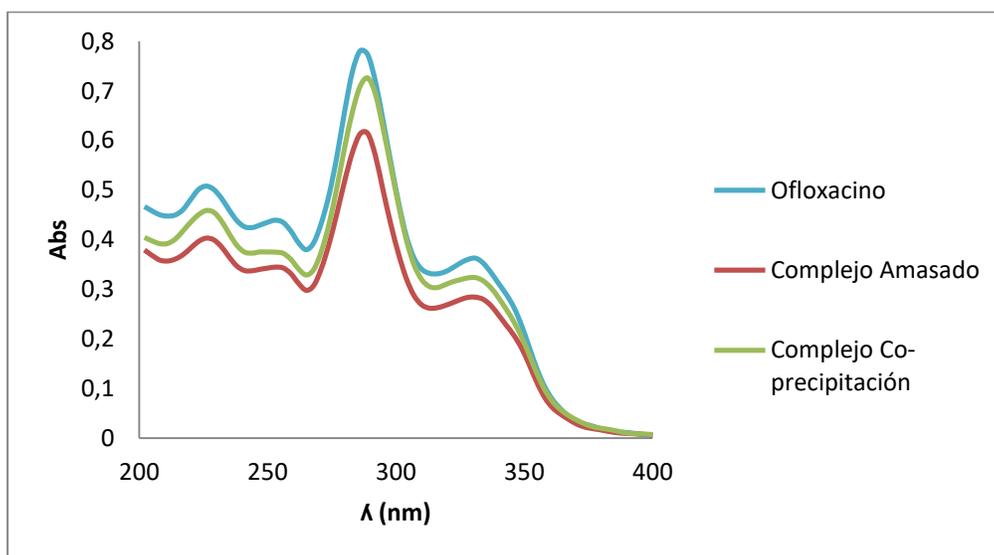


Grafico 5. Espectro de absorción del Ofloxacino y sus complejos formados con β -CD.

La longitud del paso óptico es de 1cm.

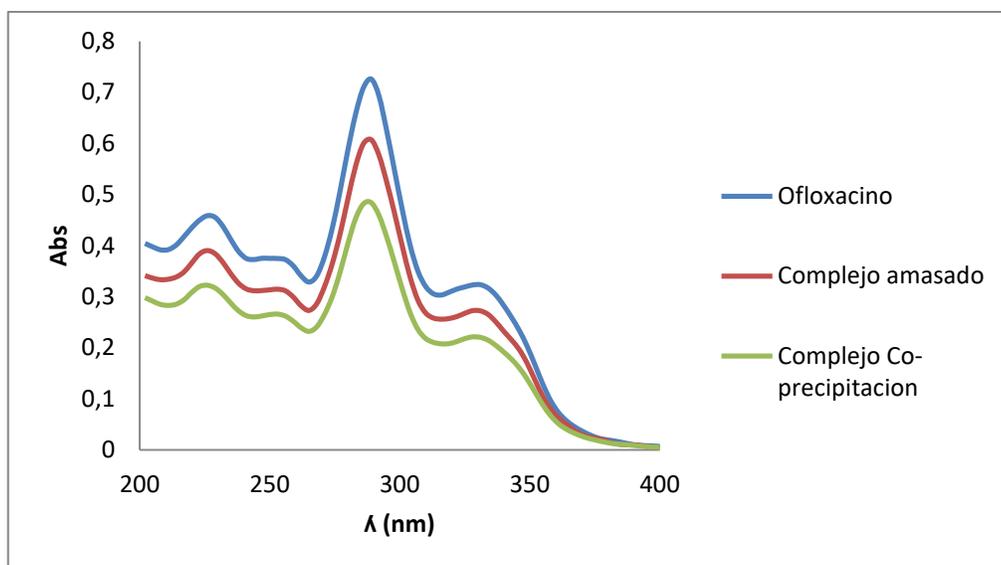


Gráfico 6. Espectro de absorción del Ofloxacino y sus complejos formados con HP-β-CD.

La longitud del paso óptico es de 1 cm.

Los resultados obtenidos por medio de las pruebas de solubilidad de la cantidad de fármaco incluido en los complejos se muestran en la tabla 9 y en el gráfico 7. Se obtuvo una mayor cantidad de fármaco incluido por medio del método de co-precipitación y usando β-CD; con el mismo método pero usando HP-β-CD se observó la menor cantidad.

Tabla 9. Cantidad promedio de Ofloxacino en los complejos de inclusión.

| Amasado | | Co-precipitación | |
|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| Co (μg/mL) | | | |
| HP-β-CD | β-CD | HP-β-CD | β-CD |
| 8,3184 ± 0.1185 | 8,5968 ± 0.0546 | 6,6448 ± 0.0827 | 9,4646 ± 0.0916 |
| 83,2 % | 86 % | 66,4 % | 94,6 % |

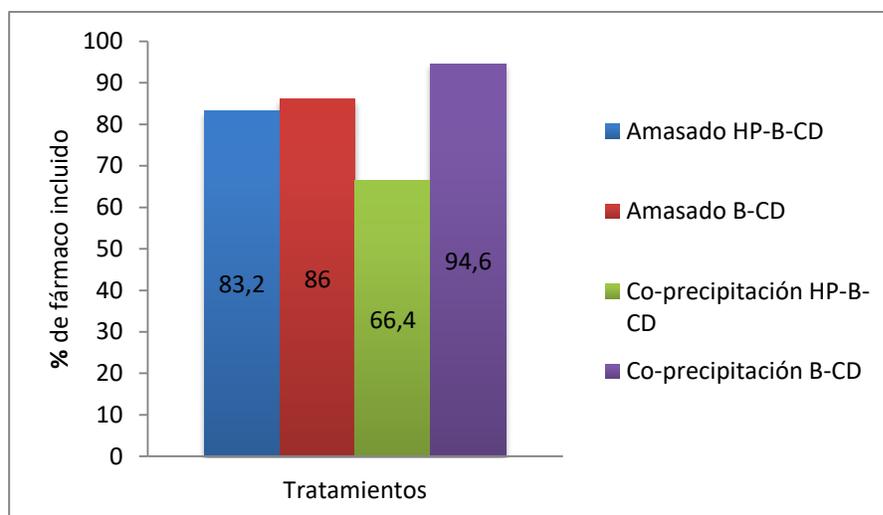


Gráfico 7. Comparativa entre tratamientos

La espectrofotometría UV-vis es un método simple, económico, rápido y ampliamente usado en el estudio de la formación de los complejos de inclusión en solución fármaco-ciclodextrinas. (Cannavá et al., 2010, Song et al., 2011). Dependiendo de la posición del grupo cromóforo en el fármaco, el paso de un medio acuoso a la cavidad interna no polar de la ciclodextrina puede modificar su espectro de absorción original, a causa del reemplazo total o parcial de la capa de solvatación de la molécula huésped por el interior de la ciclodextrina lo que genera nuevas interacciones con el entorno (Szejtli, 1988).

Los efectos batocrómico e hipsocrómico en el espectro de absorción de la molécula huésped, y/o un incremento o decremento en la intensidad del mismo pueden ser observados como consecuencia de la formación del complejo de inclusión. En el caso del espectro del complejo preparado por el método de co-precipitación y utilizando β -CD mostrado en el gráfico 5, es posible observar la presencia del efecto hipsocrómico ya que la longitud de onda de máxima absorción del Ofloxacino disminuyó de 289 nm a 286 nm. Para los demás complejos, se mantuvo la longitud de onda del fármaco libre (Gráfico 6).

6.4 Espectroscopía de Infrarrojo

Cuando una molécula absorbe energía de una radiación electromagnética, puede sufrir varios tipos de excitación:

- excitación electrónica
- excitación rotacional
- excitación que induce cambios del spin nuclear
- excitación de deformación de enlace
- ionización

Todas estas absorciones aparecen en regiones diferentes del espectro electromagnético, ya que cada modo de excitación requiere una cantidad específica de energía. La porción infrarroja del espectro electromagnético se divide en tres regiones; el infrarrojo cercano, medio y lejano, así nombrados por su relación con el espectro visible (Skoog, 2007). El infrarrojo lejano (aproximadamente $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$) se encuentra adyacente a la región de microondas, posee una baja energía y puede ser usado en espectroscopía rotacional. El infrarrojo medio (aproximadamente $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) puede ser usado para estudiar las vibraciones fundamentales y la estructura rotacional vibracional, mientras que el infrarrojo cercano ($14000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) puede excitar sobretonos o vibraciones armónicas. De las tres zonas del espectro de infrarrojo, la región comprendida entre los 4000 a los 400 cm^{-1} (región media o fundamental) es la más utilizada para el estudio estructural de las moléculas.

La espectroscopia infrarroja se basa en el hecho de que las moléculas tienen frecuencias a las cuales rotan y vibran, es decir, los movimientos de rotación y vibración moleculares tienen niveles de energía discretos (modos normales vibracionales). Las frecuencias resonantes o frecuencias vibracionales son determinadas por la forma de las superficies de energía potencial molecular, las masas de los átomos y, eventualmente por el acoplamiento vibracional asociado.

Dentro de la región del I.R. fundamental existen dos regiones, una de ellas es la llamada de los grupos funcionales de 4000cm^{-1} a 1300 cm^{-1} , y la región dactilar de 1300 cm^{-1} a 400 cm^{-1} . En la región de los grupos funcionales la posición del pico de absorción es mayor o menor dependiendo solamente del grupo funcional donde llega la absorción y no de la estructura

molecular completa. La posición de los picos en la región dactilar es dependiente de la estructura molecular completa.

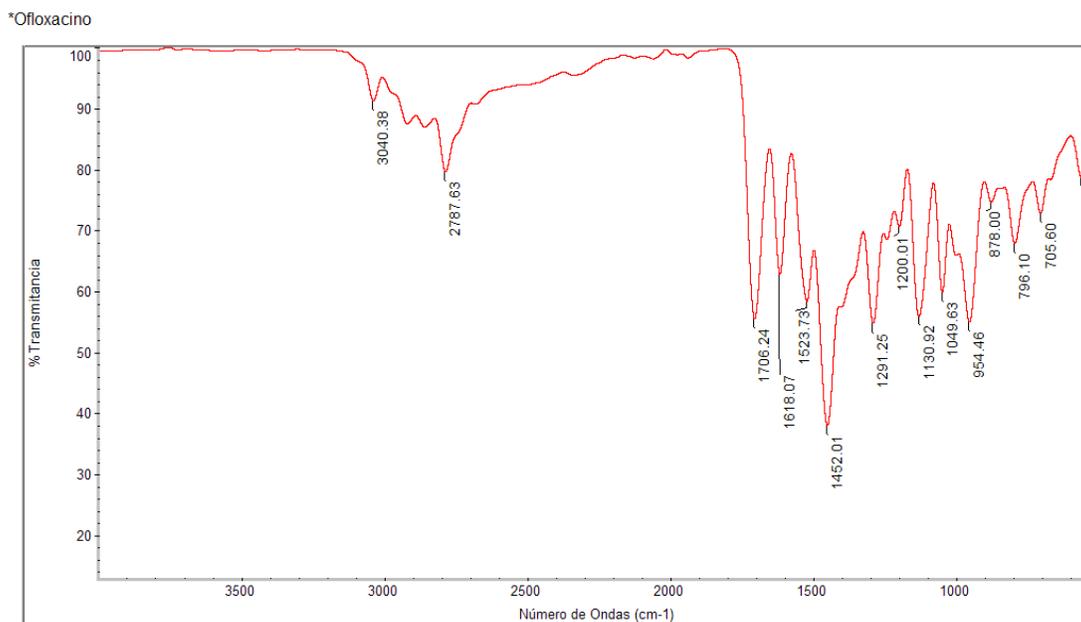


Gráfico 8. Espectro IR del Ofloxacino

En el espectro correspondiente al ofloxacino que se observa en el gráfico 8, la primer señal importante que se observa, interpretándolo de izquierda a derecha, es a 2787 cm^{-1} siendo muy probable que se trate del grupo OH asociado al ácido carboxílico presente en la estructura de la molécula; este tipo de grupos en las funcionalidades ácido carboxílico presentan bandas de absorción que pueden aparecer desde los 2500 cm^{-1} hasta los 3200 cm^{-1} . Esta misma señal se observa también en los espectros de los complejos obtenidos por el método de amasado al mismo número de onda. La siguiente señal en importancia aparece a los 1706 cm^{-1} que se puede asociar al doble enlace carbono oxígeno del grupo funcional ácido carboxílico que puede presentar absorancias en el intervalo de 1700 a 1725 cm^{-1} por lo que se puede deducir que se trate de la señal dada por este tipo de enlace al ser un grupo funcional característico de la molécula. La absorción de este grupo carbonilo proporciona una banda aguda e intensa en una región muy característica próxima 1750 cm^{-1} . La frecuencia exacta varía en cada compuesto. Así, el carbonilo de un anhídrido absorbe a frecuencias más altas que el de un éster o el de un ácido carboxílico y este a su vez absorbe a frecuencias más altas que una cetona, mientras que una amida lo hace a frecuencias más bajas.

Después tenemos una serie de bandas a los 1618, 1523 y 1452 cm^{-1} de los que se asume pertenecen a la absorción provocada por los dobles enlaces carbono-carbono en el anillo aromático de la estructura principal de la molécula los cuales también se observan en los espectros de los complejos obtenidos por el método de amasado. Esta serie de bandas observadas en los tres espectros mencionados presentan una variación en los valores de absorbancia de $\pm 7 \text{ cm}^{-1}$ para cada banda de los espectros individuales por lo que se deduce que pueden ser asociados al tipo de enlace antes mencionado, también observándose variaciones en la intensidad de la señal. La banda observada a 1290 cm^{-1} puede atribuirse al enlace carbono-flúor. La región entre 1400 y 800 cm^{-1} es generalmente muy complicada ya que hay muchos acoplamientos entre las diferentes frecuencias de tensión carbono-carbono y de deformación carbono-hidrógeno, que hacen complicada la asignación de cada banda a enlaces individuales. Prácticamente todas las moléculas orgánicas producen estas bandas. La región es característica propia para cada molécula, por eso esta región del espectro es denominada de la “huella digital”.

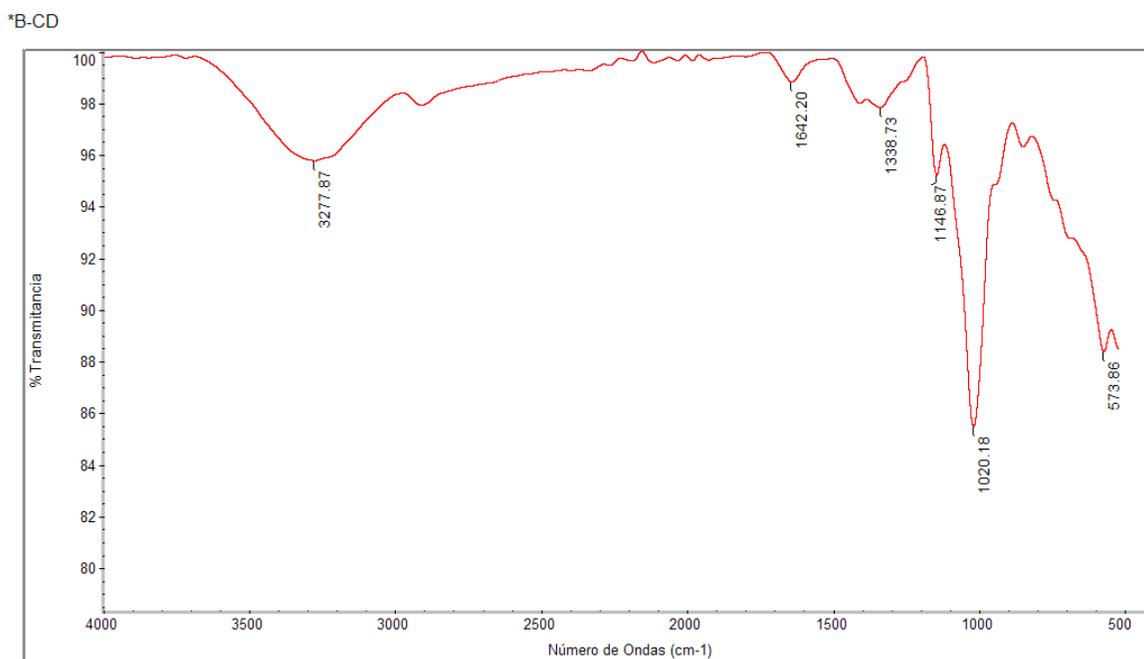


Gráfico 9. Espectro IR de β -CD

Hp-B-CD

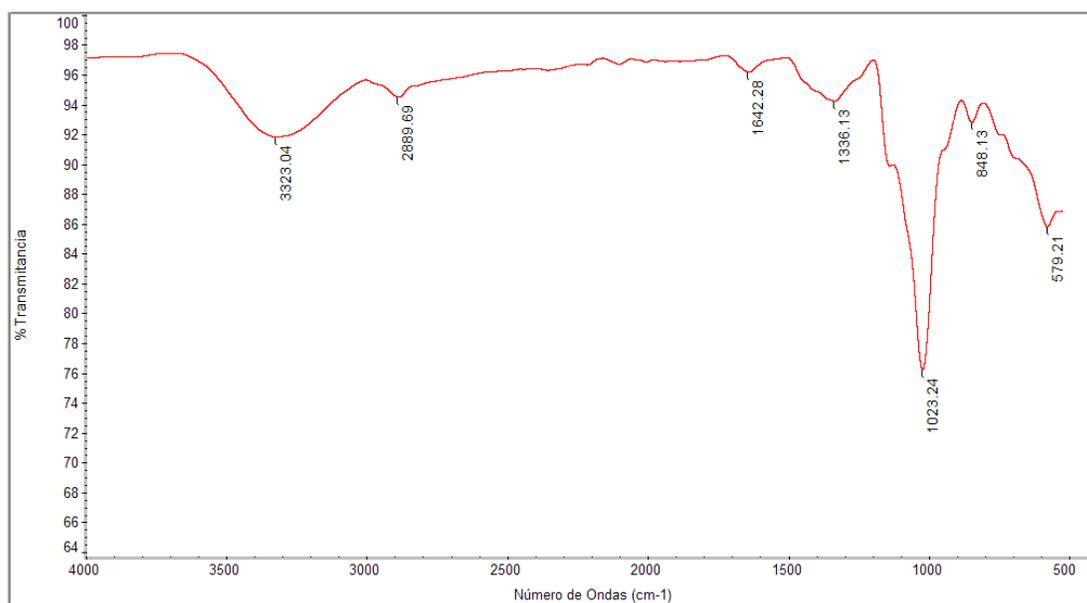


Gráfico 10. Espectro IR de HP-β-CD

Para el caso de los espectros correspondientes a las ciclodextrinas, en los gráficos 9 y 10, casi no se encuentra diferencia alguna entre uno y otro lo cual era de esperarse tomando en cuenta que se trata de la misma estructura molecular de los compuestos y que solo varían en que la hidroxipropil beta ciclodextrina presenta este tipo de grupos (hidroxipropil) unidos a los hidroxilos libres situados en el exterior de la molécula. Una de las señales más importantes a identificar en los espectros para la caracterización de este tipo de compuestos, tomando en cuenta el número de estos grupos presentes en la molécula, son las asociadas a la absorción de los grupos OH. Esta señal se muestra ancha y aparece desde los 3200 a los 3400 cm⁻¹, y en el caso de la observada en los espectros, aparece a los 3323 y a los 3277 cm⁻¹ para la hidroxipropil beta ciclodextrina y beta ciclodextrina respectivamente. La banda mostrada a 1337 +/- 1 cm⁻¹ en los dos espectros también puede ser asociada a los grupos OH aunque la más característica aparece en la región de los 3200 a los 3400 cm⁻¹. Otra de las señales a considerarse es la que se puede identificar para ambos espectros, a los 1123 +/- 3 cm⁻¹ y que se asocia a los grupos éter de tipo cíclico presentes en cada una de las unidades de glucosa que se unen para dar forma a la estructura de la ciclodextrina. Esta señal se observa como una banda intensa, delgada y característica porque resalta en los dos espectros. Finalmente, la pequeña banda observada a los 573 +/- 6 cm⁻¹ se puede asociar a los enlaces carbono-carbono que como ya se mencionó con

anterioridad, prácticamente todas las moléculas orgánicas las presentan, incluso también se encuentra presente en el espectro del ofloxacino a 562 cm^{-1} .

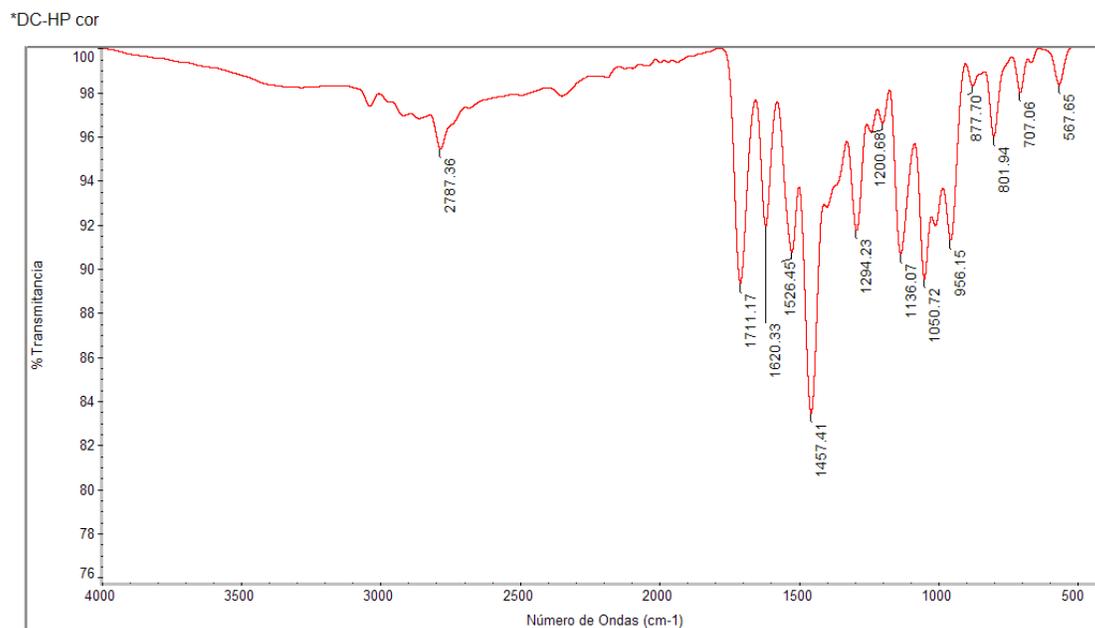


Gráfico 11. Espectro IR del complejo obtenido por el método de amasado con HP- β -CD

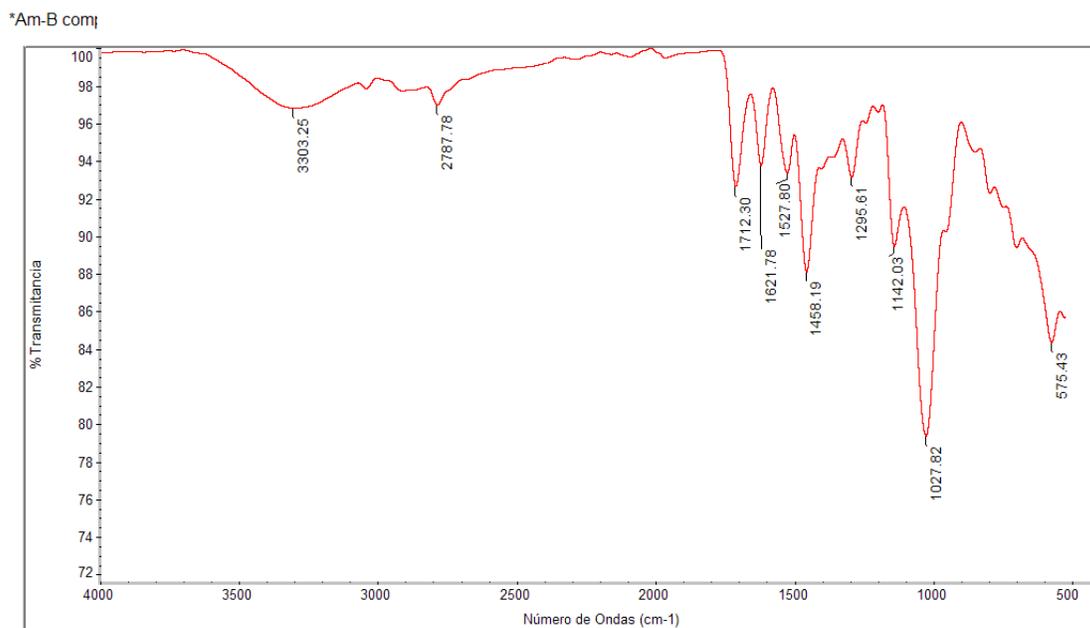


Gráfico 12. Espectro IR del complejo obtenido por el método de amasado con β -CD

Prácticamente los espectros de los diferentes complejos obtenidos por ambos métodos, observados en los gráficos 11 a 14, muestran características y bandas presentes en los espectros individuales de cada compuesto, algunos más atenuados que otros. Lo anterior se explica porque aunque se haya formado el complejo, la complejación no se da en un 100% de eficiencia quedando parte del fármaco sin complejar, recordando además que se trata de complejos dinámicos. Por ejemplo, prácticamente en todos los espectros de los complejos de inclusión aparece la señal asociada a los grupos OH de las ciclodextrinas ($3200-3400\text{ cm}^{-1}$), las bandas asociadas a los dobles enlaces carbono-carbono en el anillo aromático de la estructura del fármaco (aprox. 1450 , 1500 , 1580 y 1600 cm^{-1}) y la banda asociada al grupo éter cíclico en la estructura de las ciclodextrinas ($1070-1150\text{ cm}^{-1}$). Un punto a resaltar es el hecho de que los espectros de los complejos de inclusión son diferentes a los obtenidos para las especies químicas individuales por lo que se pone en evidencia la formación del complejo, además de observarse diferencias en cuanto al porcentaje de transmitancia a la que aparecen las bandas características de los componentes individuales con respecto de las mismas bandas observadas en los espectros de los complejos de inclusión. Por ejemplo, existen diferencias en la banda que se observa aproximadamente a los 1452 cm^{-1} en el espectro del fármaco ya que en los espectros de los complejos aparece a un porcentaje de transmitancia mayor a un número de onda muy similar. Lo mismo sucede, aunque en menor medida, en las bandas que aparecen aproximadamente a los 3300 cm^{-1} en los espectros de las ciclodextrinas puras además de ligeros desplazamientos en el número de onda, en comparación con las mismas bandas en los espectros de los complejos de inclusión.

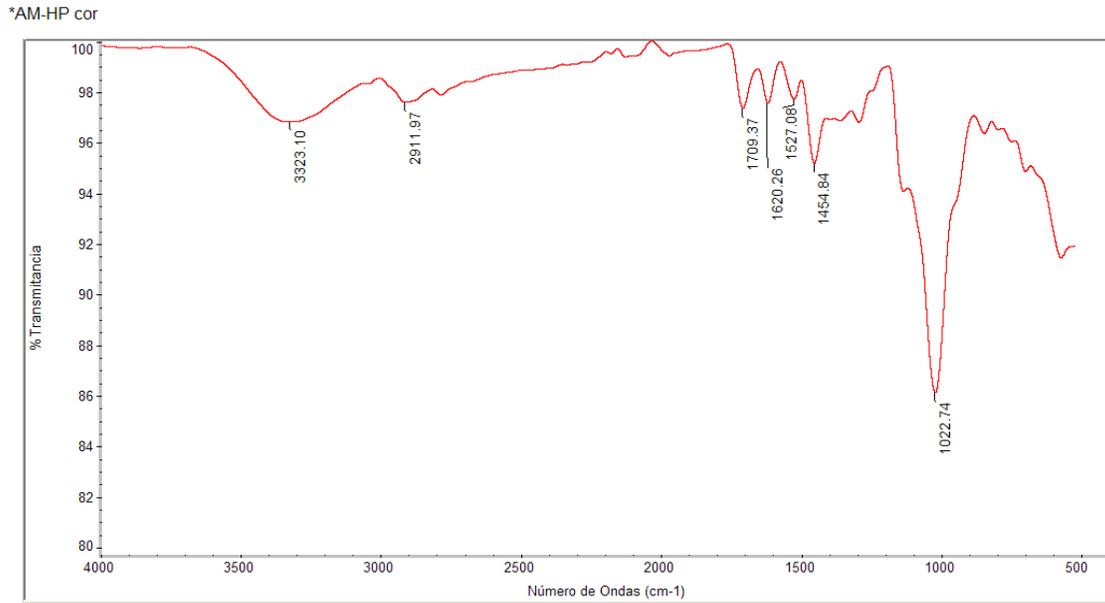


Gráfico 13. Espectro IR del complejo obtenido por el método de co-precipitación con HP-β-CD

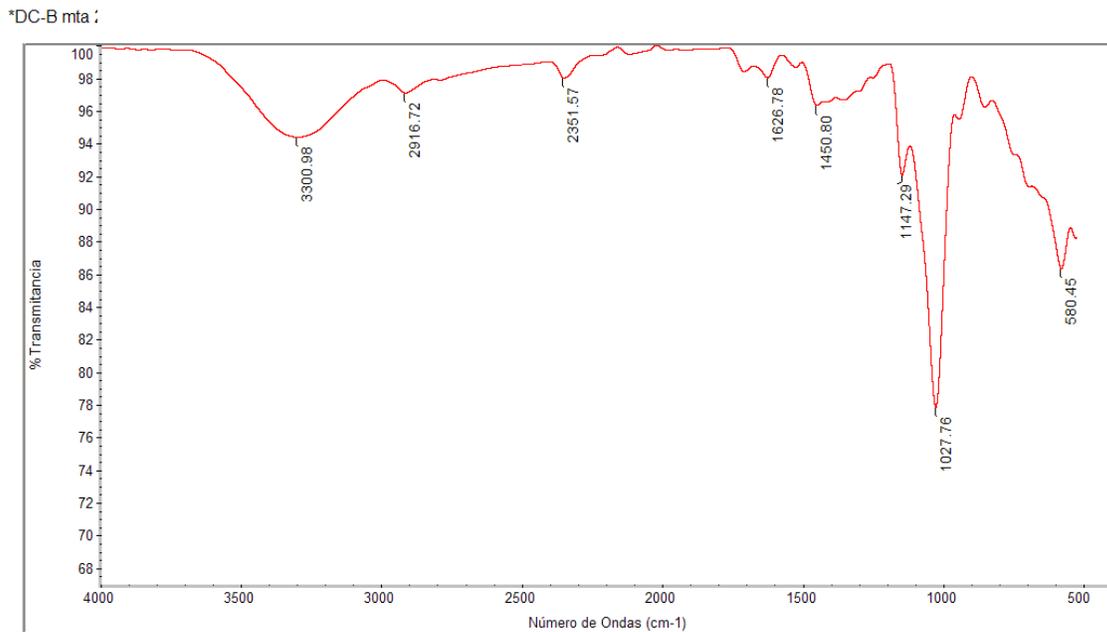


Gráfico 14. Espectro IR del complejo obtenido por el método de co-precipitación con β-CD

6.5 Microscopía Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica de barrido, por sus siglas en inglés (SEM), es una de las técnicas más versátiles disponibles para el examen y análisis de la microestructura morfológica y la caracterización del estado sólido, basada en el principio de la microscopía óptica en la que se sustituye la fuente de iluminación y la lente del condensador con un haz de electrones y bobinas electromagnéticas respectivamente con lo que se puede conseguir, en algunos casos, hasta 100 Å de resolución, muy superior a cualquier instrumento óptico. Se utiliza un haz de electrones enfocado para escanear sistemáticamente a través de la superficie de la muestra produciendo un gran número de señales electrónicas las cuales son finalmente convertidas en una señal visual por medio de un tubo de rayos catódicos.

En microscopía electrónica de barrido es necesario acelerar los electrones en un campo eléctrico, para aprovechar de esta manera su comportamiento ondulatorio, lo cual se lleva a cabo en la columna del microscopio, donde se aceleran mediante una diferencia de potencial de 1000 a 30000 voltios. Los electrones acelerados salen del cañón, y se enfocan mediante las lentes condensadora y objetiva, cuya función es reducir la imagen del filamento, de manera que incida en la muestra un haz de electrones lo más pequeño posible (para así tener una mejor resolución). Con las bobinas deflectoras se barre este fino haz de electrones sobre la muestra, punto por punto y línea por línea. Al alcanzar el haz la superficie de la muestra se generan principalmente las siguientes partículas:

- Electrones retrodispersados (e1)
- Electrones secundarios (e2)

Además de radiación electromagnética (rayos X) y otras partículas menos significativas. El microscopio se encuentra internamente equipado con unos detectores que recogen la energía y la transforman en las siguientes imágenes y datos:

- Detector de electrones secundarios (SEI – Secondary Electron Image) con los que se obtienen las imágenes en alta resolución.

- Detector de electrones retrodispersados (BEI – Backscattered Electron Image) con menor resolución de imàgen pero mayor contraste para obtener la topografía de la superficie.
- Detector de energía dispersiva (EDS – Energy Dispersive Spectrometer) que detecta los rayos X generados y permite realizar un análisis espectrográfico de la composición de la muestra.

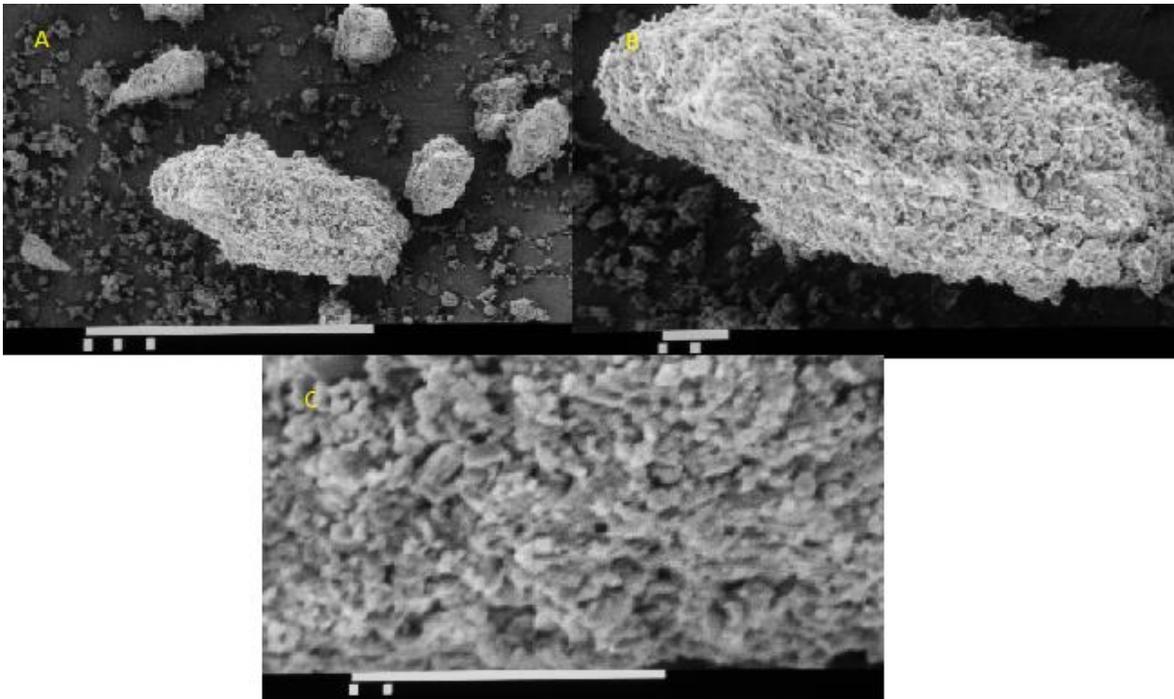


Figura 10. Imágenes SEM del ofloxacino; A (450x); B (1000x); C (4500x)

En la figura 10 se muestran las micrográficas correspondientes a la muestra del ofloxacino vista a diferentes aumentos. A los 450 aumentos se observan partículas con forma irregular y de tamaños variados y en la siguiente imagen vista a 1000 aumentos se observa en primer plano una de las partículas con un tamaño aproximado de un poco menos de 100 μm , además es posible observar la textura de la superficie de la partícula en algunos puntos. Ya a los 4500 aumentos se pone en evidencia que la superficie es sumamente irregular y característica en todas las partículas del fármaco observadas en las diferentes zonas de la muestra.

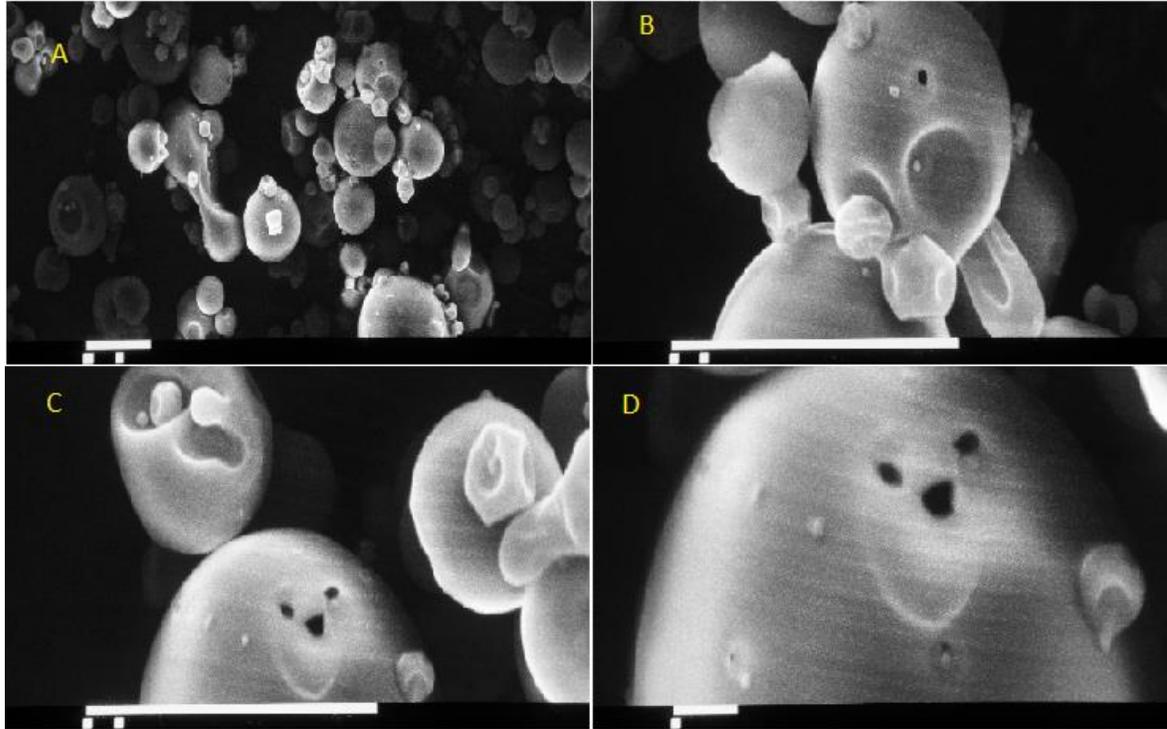


Figura 11. Imágenes SEM de la HP- β -CD; A (1000 x); B (4500 x); C (4500 x); D (10000

La figura 11 corresponde a las micrografías de la hidroxipropil beta ciclodextrina en las que se observan partículas de forma esférica de diferentes tamaños. En las imágenes tomadas a 4500 aumentos incluso se pueden ver pequeños poros en la superficie de las partículas, además de que la superficie se observa claramente lisa. También a este número de aumentos de puede observar que algunas partículas presentan una especie de hundimientos en su superficie donde a veces se encuentran introducidas otras partículas de menor tamaño pero con las mismas características de forma y superficie que las mayores. Es muy peculiar la morfología de este tipo de ciclodextrina.

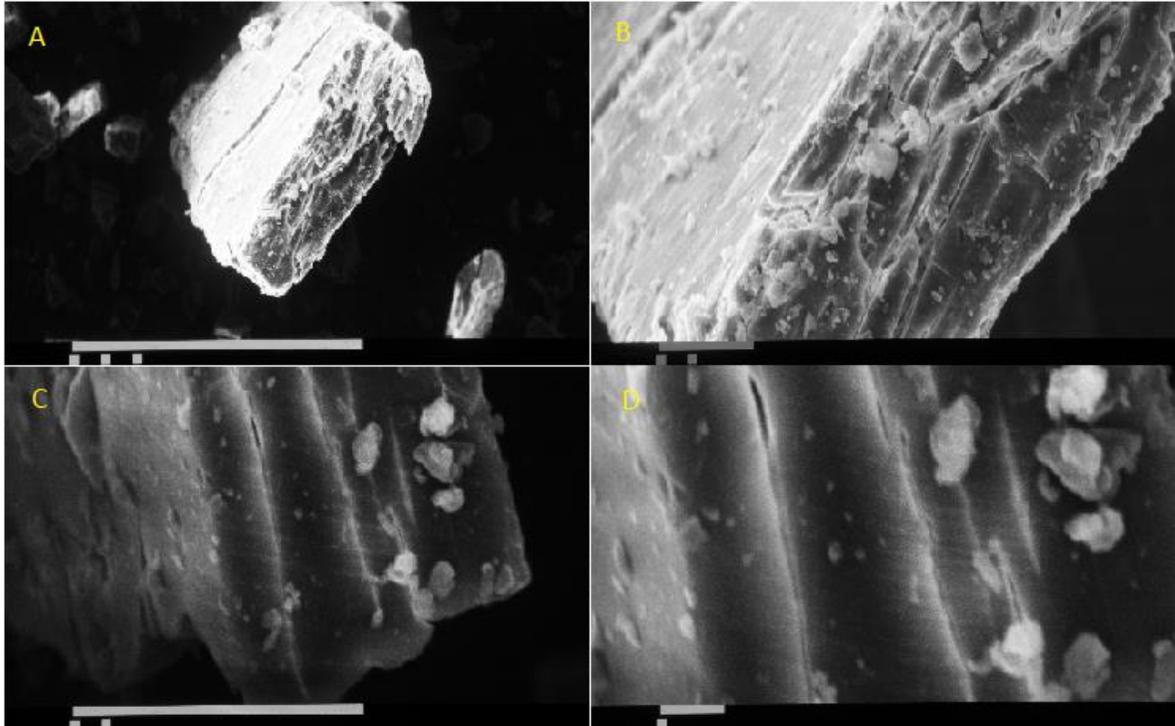


Figura 12. Imágenes SEM de la β -CD; A (450 x); B (1500 x); C (4500 x); D (10000 x).

Las micrografías de la imagen 12 corresponden a la beta ciclodextrina. En la imagen a los 450 aumentos se observa una estructura en forma vertical con respecto al plano, con una superficie algo irregular con una forma característica; otras estructuras observadas al mismo número de aumentos se observan con formas muy similares. A los 1500 aumentos se observa más a detalle la superficie de la estructura y se observan una especie de grietas, surcos e irregularidades en el borde expuesto al primer plano. En otra de las partículas observada a 4500 aumentos que parece tener la misma forma como una especie de “ladrillo” con un espesor de aprox. 10 μm , es posible observar con un poco más a detalle los surcos descritos y a los 10000 aumentos también se observan pequeñas partículas adheridas a la superficie de la partícula principal incluso de tamaños nanométricos. También la morfología de la beta ciclodextrina es muy particular.

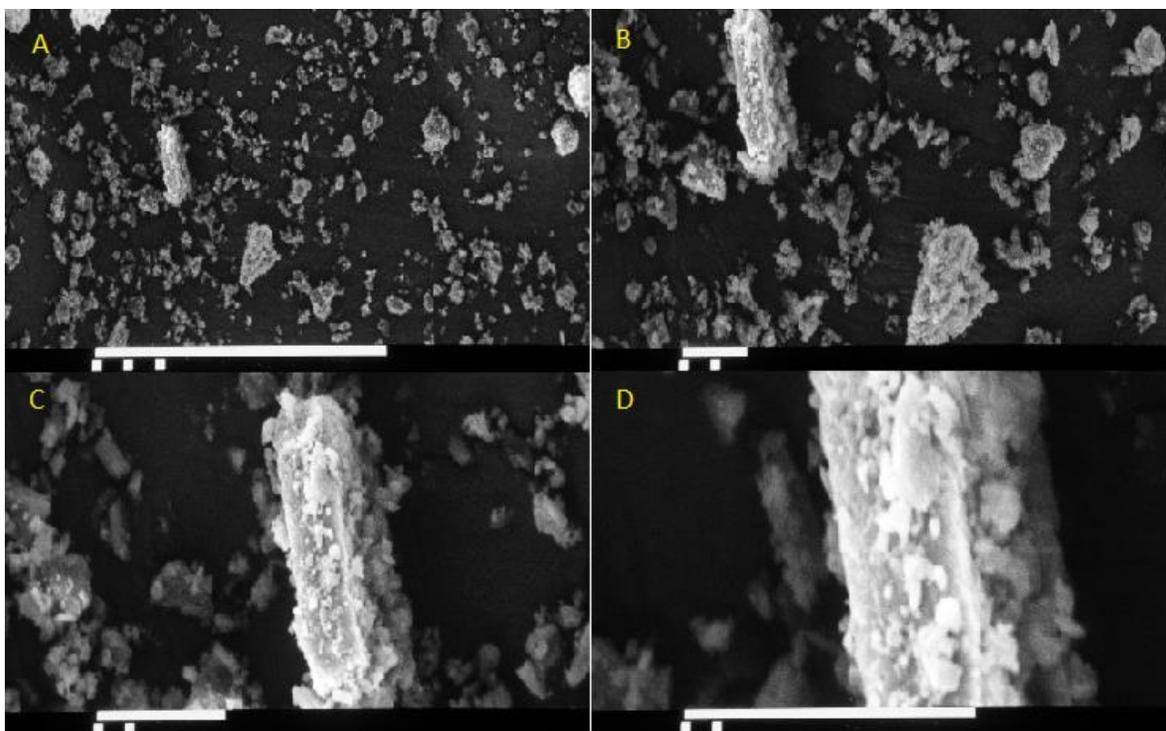


Figura 13. Imágenes SEM del complejo obtenido con β -CD por el método de amasado; A (450 x); B (1000 x); C (2000 x); D (4500 x).

La figura 13 muestra las imágenes del complejo de inclusión obtenido por el método de amasado con beta ciclodextrina y es evidente que hubo un cambio tanto en la morfología como en el tamaño de las partículas. A los 450 y a los 1000 aumentos se observan en el fondo de las micrografías partículas como una especie de “copos de nieve” de tamaños menores a los 10 μm que no se observaban en ninguna de las micrografías de los componentes individuales. La partícula que se observa en el primer plano a los 2000 aumentos tiene un ancho aproximado de 7 μm y se observan partículas adheridas a su superficie, que se evidencian en la imagen a los 4500 aumentos, como si no formaran parte de la estructura original.

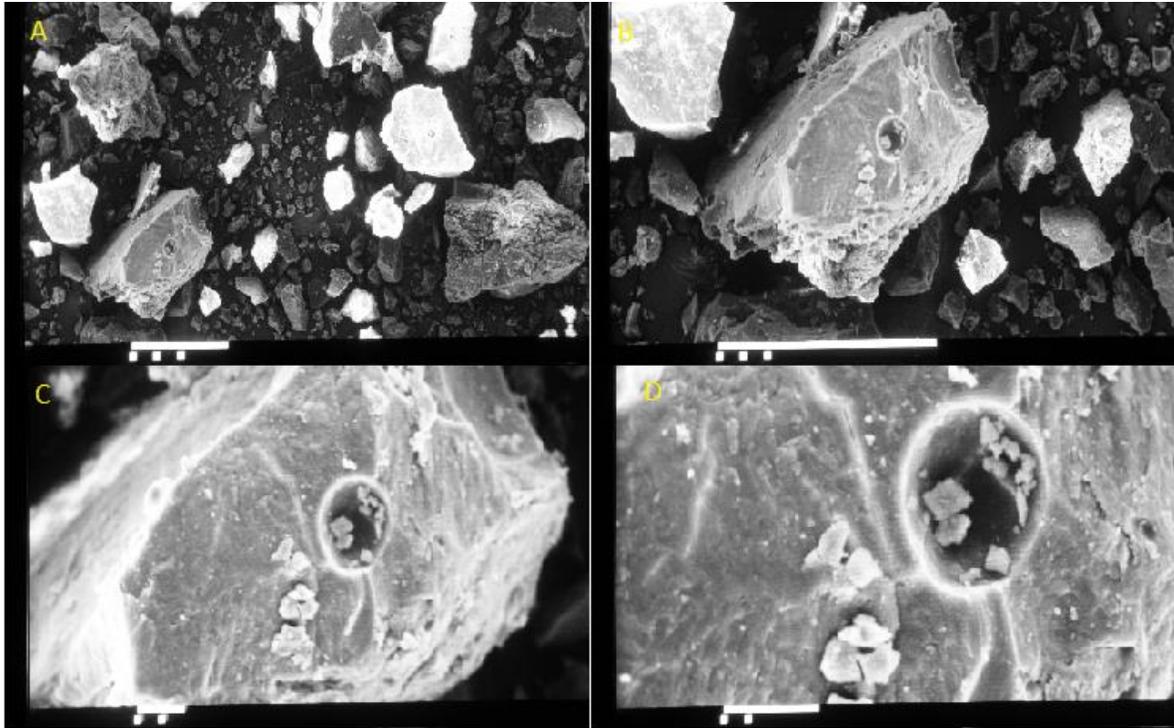


Figura 14. Imágenes SEM del complejo obtenido con HP- β -CD por el método de amasado; A (200 x); B (450 x); C (1000 x); D (2000 x).

En el caso del complejo obtenido también por amasado pero utilizando la hidroxipropil beta ciclodextrina mostrado en la figura 14, en la imagen a 200 aumentos, se observan partículas muy peculiares de forma irregular con tamaños aproximados de los 10 a los 100 μm . En los 450 aumentos se observa una estructura parecida a una roca con una especie de cráter central, que se observa más a detalle en su superficie a los 1000 y 2000 aumentos. La superficie se observa no totalmente lisa con algunos bordes y pequeñas partículas menores de los 7 μm dentro del “cráter”. Este tipo de morfología observada tampoco se parece a la mostrada por los componentes individuales ni en tamaño ni en forma.

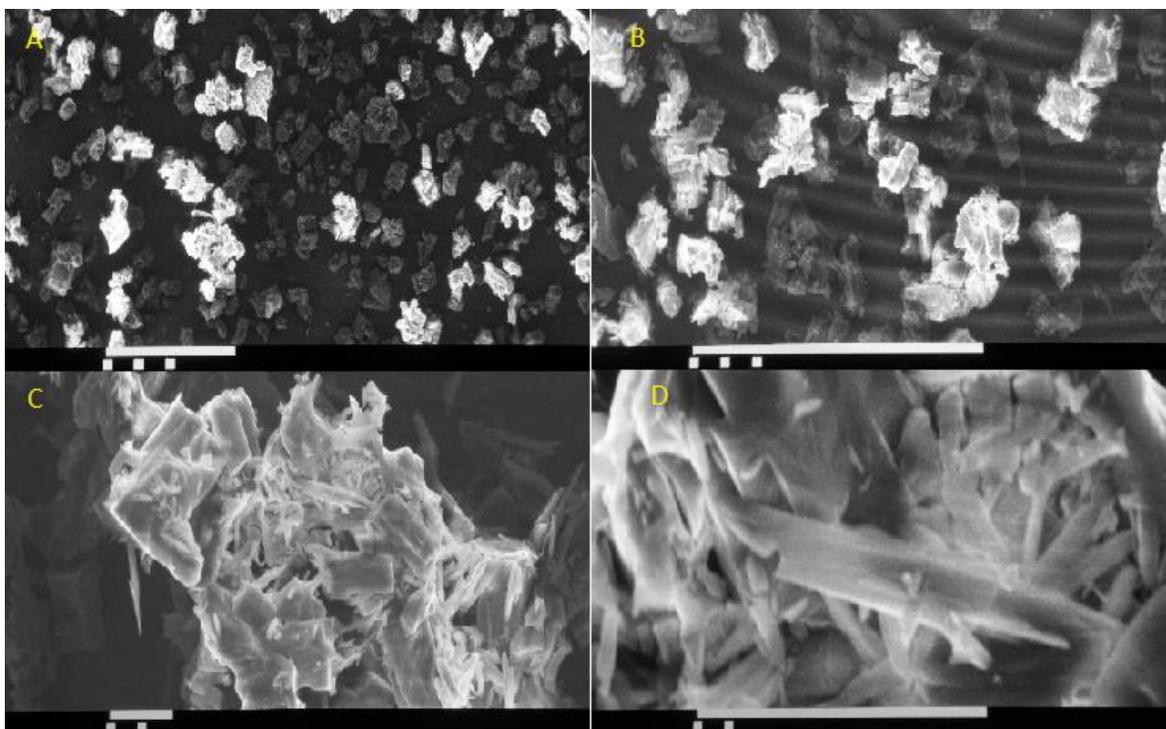


Figura 15. Imágenes SEM del complejo obtenido con β -CD por el método de co-precipitación; A (200 x); B (450 x); C (1000 x); D (4500 x).

La forma de los complejos obtenidos por el método de co-precipitación con beta ciclodextrina mostrados en la figura 15, es sumamente irregular con tamaños menores a los 20 μm como se observa en las micrografías tomadas a los 200 y 450 aumentos. A los 1000 aumentos se observa la superficie de las partículas como una especie de agujas de cristales compactadas irregularmente y a los 4500 aumentos se ven con mejor detalle. Finalmente las partículas observadas a 450 aumentos del complejo de inclusión también por precipitación pero con hidroxipropil beta ciclodextrina mostrado en la figura 16, tienen un tamaño aproximado de 15 a 30 μm . A los 1000 aumentos se observan dos partículas algo esféricas con una superficie irregular y en las imágenes a 2000 y 4500 aumentos se pone en evidencia la rugosidad de su superficie.

Prácticamente en ninguna de las imágenes de los complejos de inclusión formados por ambos métodos es posible observar la morfología ni de las ciclodextrinas ni la del fármaco habiendo diferencia también en tamaño y forma con lo cual se pone en evidencia la formación de los complejos.

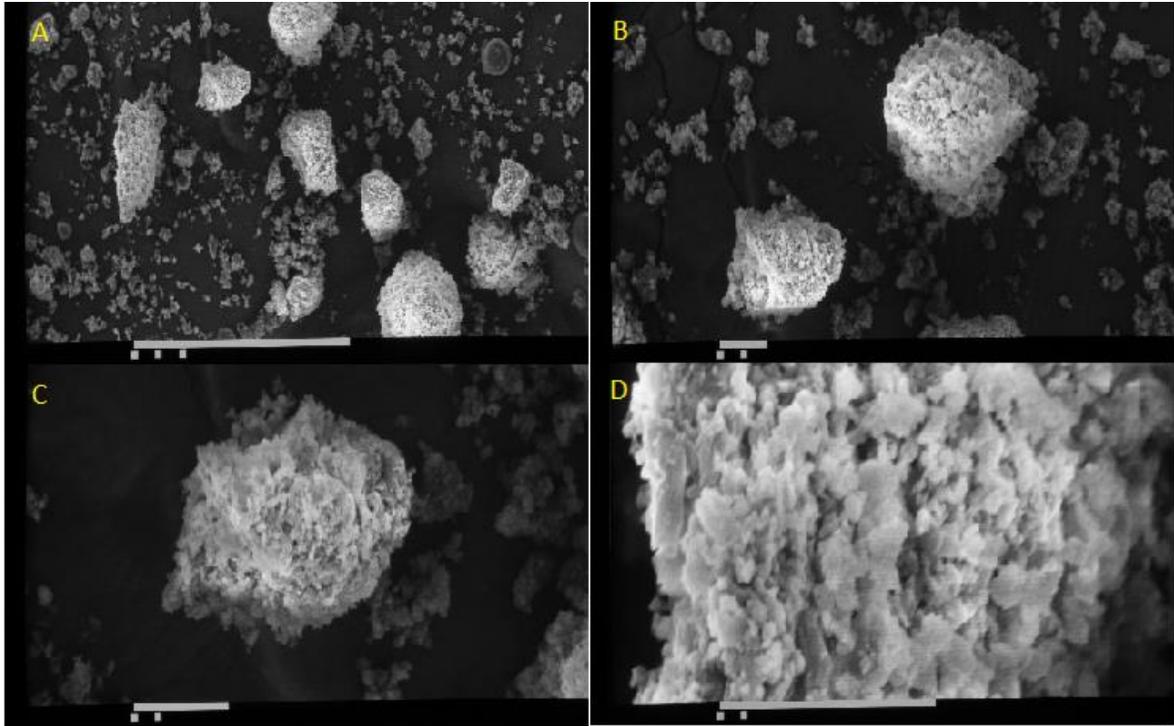


Figura 16. Imágenes SEM del complejo obtenido con HP-β-CD por método de co-precipitación; A (450 x); B (1000 x); C (2000); D (4500 x).

6.6 Calorimetría Diferencial de Barrido

La calorimetría diferencial de barrido es el método térmico más utilizado en la investigación de las interacciones en estado sólido entre fármacos y ciclodextrinas debido a la capacidad de proporcionar información detallada acerca de las propiedades físicas y energéticas asociadas a los complejos (Mura et al., 2003). La comparación de los termogramas de los componentes individuales, de la mezcla física y de los complejos de inclusión puede proporcionar una idea de las modificaciones e interacciones del estado sólido como consecuencia de la aplicación de los métodos de preparación y de la formación de los complejos.

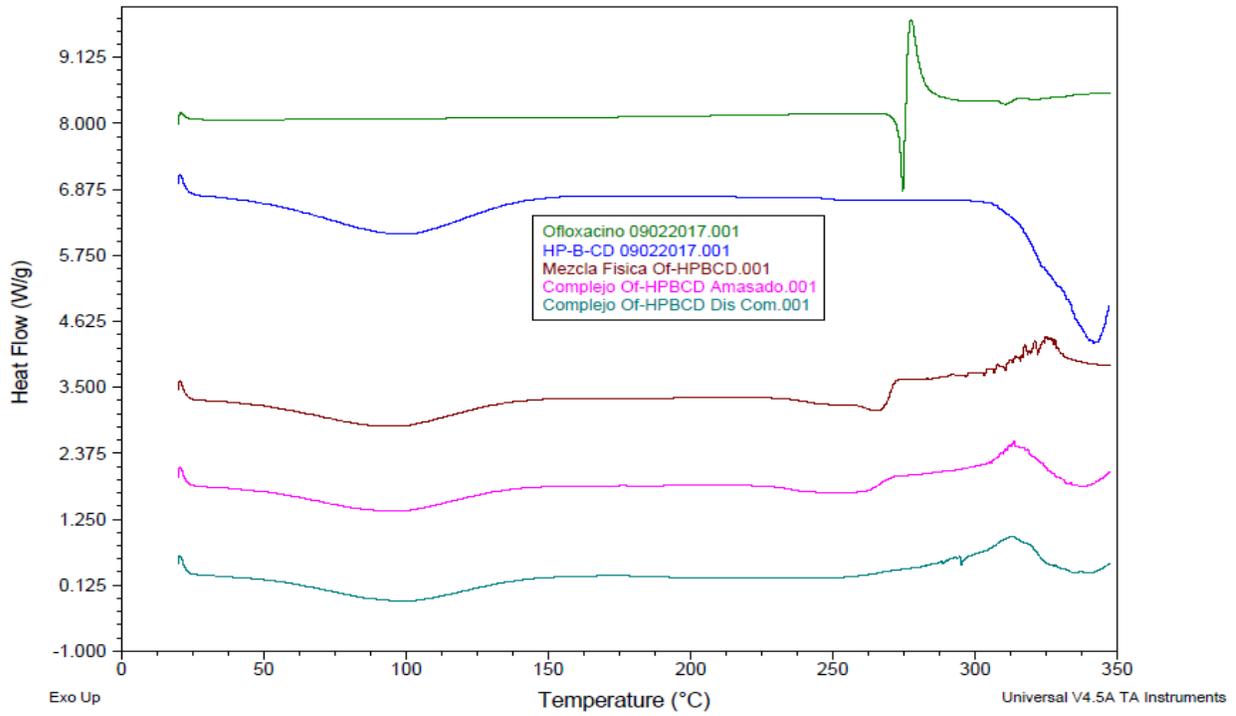


Gráfico 15. Comparación de los termogramas relacionados a los complejos con HP-β-CD

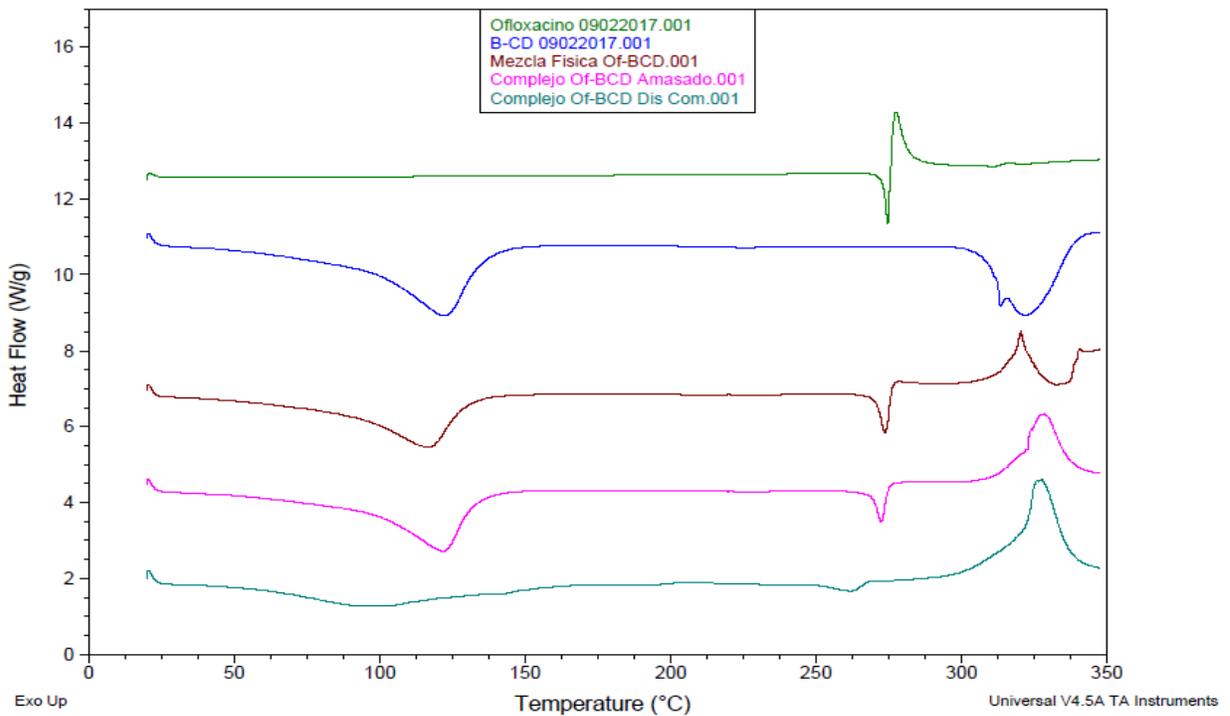


Gráfico 16. Comparación de los termogramas relacionados a los complejos con β-CD

Los termogramas de las ciclodextrinas se caracterizan por presentar un pico endotérmico alrededor de los 90-130 °C correspondiente a la deshidratación de la molécula seguido por la descomposición total que se presenta después de los 300 °C lo cual se puede observar en los termogramas de los gráficos 15 y 16 asociados a las ciclodextrinas evaluadas de manera individual. Si la molécula huésped se presenta en su forma cristalina, se observará un pico también endotérmico de forma definida asociado al proceso de fusión de la misma. En el caso del ofloxacino, este pico se presenta, de manera experimental, a los 274.5 °C y presenta una estructura cristalina del tipo monocónica (Holstein et al., 2011).

Los termogramas correspondientes a la mezcla física deben ser la simple suma de los picos asociados a los componentes individuales apareciendo el pico correspondiente a la deshidratación de las ciclodextrinas así como el asociado al punto de fusión del fármaco. Cabe mencionar que la presencia residual del pico del punto de fusión del ofloxacino es indicativo de que la complejación no se da en un 100 % sino que parte del fármaco quedó sin complejar y por lo tanto aun aparece el pico de fusión aunque de un menor tamaño y de diferente forma (Al-Marzouqi et al., 2007). En el caso de los complejos preparados por el método de co-precipitación es más evidente la desaparición del pico de fusión del Ofloxacino lo que representa como una mayor eficiencia en la formación del complejo de inclusión.

6.7 Preparación de las películas poliméricas

Las dispersiones poliméricas del tipo látex y pseudolátex son dispersiones coloidales que contienen partículas esféricas sólidas o semisólidas y la diferencia entre un tipo y otro es el método de producción. Las dispersiones látex se producen por polimerización en emulsión en un medio acuoso y que por lo tanto, está limitado a monómeros que pueden ser emulsificados en fase acuosa (McGinity y Felton, 2008), como es el caso de las dispersiones de Eudragit®. La formación de la película a partir de las dispersiones látex o pseudolátex es causada por la coalescencia de las partículas individuales ya que en dispersión, las partículas permanecen separadas por fuerzas estabilizantes del tipo electrostáticas y estéricas.

El proceso de secado y formación de la película puede ser dividido en diferentes etapas (Stewart et al., 2000). La evaporación de agua de la superficie ocurre en la etapa I y ésta dura hasta que el polímero ha alcanzado aproximadamente de un 60-70% en fracción volumen. En la etapa II, las partículas del polímero entran en contacto irreversible y se comienzan a deformar, además, la tasa general de pérdida de agua disminuye en gran medida a causa de la formación de una estructura polimérica muy densa. Es al inicio de la etapa III que comienza la formación de una película continua. En esta etapa, la evaporación de agua se ralentiza ya que tiene que difundir a través de la película polimérica que ha comenzado a formarse y al final, este proceso se consuma con la interpenetración de las cadenas poliméricas. Las partículas individuales presentes al inicio, se transforman finalmente en una película polimérica continua.

El factor más importante que se relaciona con la coalescencia total de las partículas poliméricas es la temperatura mínima de formación de la película que se describe como la temperatura por encima de la cual se forma una película transparente. Por debajo de la temperatura de formación mínima se forman películas frágiles que son el resultado de una incompleta coalescencia de las partículas (Van Tent y Kenijenhuis, 2000).

La temperatura mínima de formación de la película puede ser efectivamente abatida por la adición de plastificantes (Felton, 2013) los cuales son generalmente sustancias orgánicas con un alto punto de ebullición que aumentan la resistencia de las partículas poliméricas, aumentan la flexibilidad y disminuyen la temperatura de transición vítrea asociada al polímero. Esto se logra por la reducción de las fuerzas intermoleculares cohesivas a lo largo de las cadenas poliméricas.

Una vez analizados los resultados de las pruebas de caracterización de los complejos se seleccionó el fabricado por el método de amasado utilizando HP- β -CD para la preparación de las películas. Cabe mencionar que aunque se obtuvo una mayor cantidad de fármaco incluido en los complejos preparados por el método de co-precipitación con β -CD, las películas fabricadas resultaron demasiado quebradizas aún con la adición del plastificante por lo que se optó por utilizar el complejo obtenido por el método de amasado utilizando HP- β -CD.

Tabla 10. Espesor y resistencia a la ruptura promedio de las películas poliméricas con un área de 9 cm².

| Blanco | | Ofloxacino | | Complejo | |
|---------------|---|---------------|---|---------------|---|
| Espesor (mm) | Resistencia a la ruptura (N/mm ²) | Espesor (mm) | Resistencia a la ruptura (N/mm ²) | Espesor (mm) | Resistencia a la ruptura (N/mm ²) |
| 0.209 ± 0.009 | 2.589 ± 0.034 | 0.242 ± 0.011 | 4.384 ± 0.052 | 0.267 ± 0.014 | 10.983 ± 0.084 |

Tabla 11. Espesor y masa promedio de los insertos oculares con un área de 0.159 cm².

| Blanco | | Ofloxacino | | Complejo | |
|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|
| Espesor (mm) | masa (mg) | espesor (mm) | masa (mg) | espesor (mm) | masa (mg) |
| 0.209 ± 0.009 | 4.1 ± 0.1 | 0.242 ± 0.011 | 4.8 ± 0.1 | 0.267 ± 0.014 | 5.1 ± 0.1 |

Tabla 12. Valoración y uniformidad de contenido en insertos oculares cargados con fármaco y con complejo

| Ofloxacino | | Complejo | |
|----------------|------------------------------|----------------|------------------------------|
| Valoración (%) | Uniformidad de contenido (%) | Valoración (%) | Uniformidad de contenido (%) |
| 103.5 ± 1.3 | 101.1 ± 2.3 | 96.4 ± 1.6 | 97.8 ± 2.2 |

Como se puede observar en la tabla 10, comparadas con las películas blanco, las películas que contenían ofloxacino resultaron tener un mayor espesor y mayor masa como resultado de la adición de un componente más a la formulación; se observó el mismo efecto con las películas que contenían el fármaco en forma de complejo obteniéndose valores mayores en comparación con las películas cargadas con fármaco y con las películas blanco. Los resultados de las pruebas de tensión siguieron la misma tendencia; se necesitó una fuerza mayor para fragmentar las películas que contenían al fármaco en forma de complejo comparado con la fuerza necesaria para lograr el mismo efecto en las películas que contenían solo fármaco y las películas blanco. Sin embargo el porcentaje de elongación fue mayor en las películas blanco y menor para las películas con el complejo. Los tres tipos de película tenían un área superficial de 9 cm².

En la tabla 11 se reportan los resultados de masa y espesor de los insertos ya cortados a partir de su respectiva película. Como se observa, la masa de los insertos también aumenta conforme aumenta su espesor siendo mayor para el caso de los insertos cargados con el complejo de inclusión y menor para el caso de los insertos obtenidos a partir de las películas blanco.

Los resultados de valoración y uniformidad de contenido se muestran en la tabla 12, obteniéndose valores que están en un rango que va del 90 al 110%, indicando que se mantienen dentro de las especificaciones que se señalan tanto en la FEUM como en la USP.

6.8 Liberaciones del Ofloxacino en los insertos oculares

La liberación de los activos a partir de sistemas poliméricos se da por medio del fenómeno de difusión, así como a causa de las restricciones de transferencia de masa en la interface polímero-líquido (Peppas y Franson, 1983). El coeficiente de difusión del fármaco a través del polímero depende de las características estructurales y morfológicas del mismo así como de la concentración del activo. El paso del fármaco al medio de disolución desde una matriz polimérica implica un proceso de absorción de agua o fluido y un proceso simultáneo de disolución del fármaco controlado por el proceso de hinchamiento que presenta el polímero (Hopfenberg et al., 1981).

La entrada de disolvente en un polímero que se encuentra en estado vítreo induce un aumento en la movilidad macromolecular lo que implica un abatimiento en la temperatura de transición vítrea. Si el medio de disolución es poco compatible con el polímero, el descenso en la temperatura de transición vítrea no será suficiente para que éste alcance su estado elastomérico y por lo tanto, cuando el sistema alcance el equilibrio termodinámico, la liberación del activo se verá disminuida al grado de no ejercer el efecto terapéutico deseado. Por otro lado, si el medio de disolución es compatible, se alcanzará el estado elastomérico y el fármaco difundirá sin dificultades desde la matriz hacia el medio externo (Korsmeyer y Peppas, 1984).

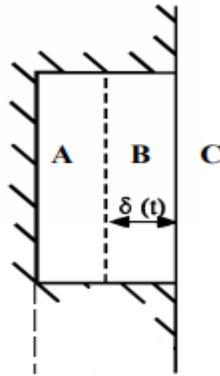


Figura 17. Representación esquemática del hinchamiento dinámico de un polímero en estado vítreo.
 A. Polímero en estado vítreo conteniendo el fármaco. B. Polímero en hinchamiento continuo con fármaco difundiéndose hacia el exterior. C. Medio de disolución. (modificado de maaz.ihmc.us)

En la figura 17 se observa que el comportamiento del hinchamiento se caracteriza por la presencia de dos frentes; la interface de hinchamiento que es la que separa el polímero en estado vítreo y el polímero en estado elastomérico y la interface polimérica que es la que separa el polímero hinchado del medio de disolución y que se mueve hacia el exterior (Peppas y Franson, 1983). Generalmente, el proceso de difusión desde sistemas elastoméricos en equilibrio de hinchamiento sigue la ley de Fick (Figura 18), es decir, es de tipo Fickiano.

$$J = -D \frac{dC}{dx}$$

Figura 18. Expresión de la ecuación de la primera ley de Fick.

Donde J es el flujo difusivo, D es el coeficiente de difusión, dC es la diferencial de la concentración y dx es la diferencial de la longitud.

Por otro lado, en sistemas donde no se ha alcanzado el equilibrio, la difusión puede ser de tipo No Fickiana. En este caso, la difusión se atribuye a la existencia de fenómenos de relajación lentos de la matriz polimérica inducidos por el proceso de hinchamiento. Estos procesos de relajación se relacionan con los tiempos que necesitan las cadenas poliméricas para responder a la presión osmótica de hinchamiento y ordenarse para permitir el paso de las moléculas del medio hacia el interior de la matriz (Peppas y Franson, 1983). Tomando en cuenta lo anterior, el

hecho de que el proceso de difusión siga un comportamiento del tipo Fickiano o no, depende del grado de relajación de las cadenas poliméricas en el proceso de hinchamiento.

Una vez realizadas las pruebas de liberación se encontró que el fármaco difundió hacia el medio de disolución de una manera muy rápida, ya que prácticamente a los 15 minutos ya se había liberado la totalidad del activo lo que dificulta la caracterización de un perfil completo evaluado en un tiempo mayor. Esto se observó tanto en los insertos que contenían solo fármaco como en los insertos que contenían al fármaco en forma de complejo de inclusión. Por lo tanto, no fue posible retrasar la liberación del ofloxacino en los insertos oculares. El hecho de que el activo haya difundido tan rápido hacia el exterior implica que la relajación de las cadenas poliméricas se presenta en un alto grado y que por lo tanto, las moléculas del medio de disolución ingresan al sistema en una cantidad tal que logran tal efecto en la velocidad de difusión, considerando también que el Eudragit® RL 30D es un tipo de polímero muy permeable por la proporción de los grupos amonio cuaternario que presenta su estructura. Este comportamiento puede atribuirse también a que el proceso de curado de las películas no haya sido el adecuado y que no se hubiera logrado el entrecruzamiento ideal para poder presentar el perfil de liberación deseado. (Hudovornik y Vrečer, 2015).

En cierto grado, era de esperarse que en el caso de los insertos que contenían fármaco libre, el proceso de difusión se diera de una manera rápida pero en el caso de los insertos que contenían los complejos de inclusión, se esperaba que se retrasara la liberación ya que se ha reportado que en el proceso de complejación de activos con ciclodextrinas se han obtenido perfiles de liberación controlada (Lavoine et al., 2014). Es por lo anterior que se decidió utilizar el Eudragit® RL 30D pensando en el hecho de que con incorporar el activo en forma de complejos de inclusión se obtendría un perfil de liberación modificada y que esta se extendiera por al menos 6 horas de liberación, presentando ventajas en cuanto a la administración del fármaco mediante un sistema de liberación tradicional como lo es en solución oftálmica.

Este trabajo sienta las bases para continuar con el desarrollo de esta línea de investigación y conseguir el objetivo de contar con un sistema oftálmico de liberación prolongada.

7. Conclusiones

- Se prepararon complejos de inclusión ofloxacino-ciclodextrina por los métodos de amasado y co-precipitación, evidenciando su formación mediante las técnicas de análisis descritas, observando diferencias relacionadas al tipo de ciclodextrina y al método empleado.
- La formación de los complejos de inclusión ofloxacino-ciclodextrina ocurre en una proporción estequiométrica 1:1
- Los complejos con β -Ciclodextrina resultaron tener una constante de formación mayor en comparación con los complejos con HP- β -CD lo que indica una mayor estabilidad.
- Existen diferencias significativas en cuanto al porcentaje de fármaco incluido en los complejos obtenidos por los diferentes métodos y diferentes ciclodextrinas; el complejo obtenido por Co-precipitación y utilizando β -CD resultó ser más eficiente en cuanto a la cantidad de fármaco incluido.
- Fue posible aumentar la solubilidad acuosa del ofloxacino por medio del uso de ciclodextrinas, lo que evita la adición de algún tipo de ácido o disolvente orgánico durante el proceso de preparación de las películas.
- Las películas poliméricas preparadas con el complejo de inclusión formado por el método de amasado usando HP- β -CD presentaron propiedades mecánicas más adecuadas en relación a las otras películas preparadas y por lo tanto, se consideran más aptas para ser utilizadas en la obtención de los insertos oculares.
- Al realizar las pruebas de liberación del fármaco contenido en los insertos en forma libre y como complejo, no se observa una diferencia significativa. En ambos casos, el ofloxacino es liberado en los primeros minutos.

-
- Es recomendable trabajar en la modificación de la película, de modo que se consiga la liberación sostenida del ofloxacino.

8. Perspectivas

- Utilizar un polímero menos permeable y menos hidrofílico como Eudragit® RS 30D en la fabricación de las películas con el objetivo de retardar la liberación y evaluarla tanto en las películas que contienen al activo en su forma libre como en las películas que lo contienen en forma de complejo de inclusión.
- Utilizar mezclas de ambos tipos de polímero, tanto Eudragit® RL 30D (más permeable) como Eudragit® RS 30D (menos permeable) en la fabricación de las películas y evaluar la liberación.
- Fabricar películas poliméricas en una especie de sistema multicapa alternando los dos tipos de polímero (Eudragit® RL 30 D y RS 30D) y evaluar la liberación.

9. Referencias

- Abarca, R.L., Rodríguez, F.J., Guarda, A., Galotto, M.J., Bruna, J.E. (2016). Characterization of beta-cyclodextrin complexes containing an essential oil component. *Food Chemistry*, 196, 968-975.
- Abbaszadegan, S., Al-Marzouqi, A.H., Salem, A.A., Amin, A. (2015). Physicochemical characterizations of safranal- β -cyclodextrin inclusion complexes prepared by supercritical carbon dioxide and conventional methods. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 83, 215-226.
- Al-Marzouqi, A.H., Jobe, B., Dowaidar, A., Maestrelli, F., Mura, P. (2007). Evaluation of supercritical fluid technology as preparative technique of benzocaine-cyclodextrin complexes, comparison with conventional methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 566-574.
- Alvarez-Lorenzo, C., Bromberg, L., Concheiro, A. (2009). Light-sensitive intelligent drug delivery systems. *Photochemistry and Photobiology*, 85, 848-860.
- Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R., Simal-Gándara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 23, (7), 1631-1640.
- Baino, F., Perero, S., Ferraris, S., Miola, M., Balagna, C., Verne, E., Vitale-Brovarone, C., Coggiola, A., Dolcino, D., Ferraris, M. (2014). Biomaterials for orbital implants and ocular prostheses: overview and future prospects. *Acta Biomaterialia*, 10, 1064-1087.
- Barar, J., Javadzadeh, A.R., Omid, Y. (2008). Ocular novel drug delivery: impacts of membranes and barriers. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5, 567-581.
- Benedetti, M.S., Whomsley, R., Poggesi, I., Cawello, W., Mathy, F.X., Delporte, M.L. (2009). Drug metabolism and pharmacokinetics. *Drug Metabolism Reviews*, 41, 344-390.
- Bibby, D.C., Davies, N.M., Tucker, I.G. (2000). Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 197, 1-11.
- Bin Choy, Y., Park, J.H., Prausnitz, M.R. (2008). Mucoadhesive microparticles engineered for ophthalmic drug delivery, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 69, 1533-1536.

-
- Blokhina, S.V., Sharapova, A.V., Ol'khovich, M.V., Volkova, T.V., Perlovich, G.L. (2016). Solubility, lipophilicity and membrane permeability of some fluoroquinolone antimicrobials. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93, 29-37.
 - Boateng, J.S., Popescu, A.M. (2016). Composite bi-layered erodible films for potential ocular drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145, 353-361.
 - Boddu, S.H., Jwala, J., Vaishya, R., Earla, R., Karla, P.K., Pal, D., Mitra, A.K. (2010). Novel nanoparticulate gel formulations of steroids for the treatment of macular edema. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 26, 37-48.
 - Bone, S. (2006). Dielectric studies of water clusters in cyclodextrins: relevance to the transition between slow and fast forms. *Journal of Physical Chemical B*, 110, 20609-20614.
 - Brewster, M., Loftsson, T. (2007). Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 645-666.
 - Buvári-Barcza, Á., Barcza L. (1999) Physical and Chemical Changes in the Properties of β -Cyclodextrin on Inclusion Complex Formation. En: Labandeira J.J.T., Vila-Jato J.L. (Eds) *Proceedings of the Ninth International Symposium on Cyclodextrins*. Springer, Dordrecht
 - Buvári-Barcza, Á., Barcza L. (1999). Influence of the guests, type and degree of substitution on inclusion complex formation of substituted β -cyclodextrins. *Talanta*, 49, 577-585.
 - Cannavà, V., Ficarra, P., Guardo, M., Majolino, D., Mazzaglia, A., Stancanelli, R., Venuti, V. (2010). Physico-chemical characterization of an amphiphilic cyclodextrin-genistein complex. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 1064-1068.
 - Chen, X., Li, X., Zhou, Y., Wang, X., Zhang, Y., Fan, Y., Huang, Y., Liu, Y. (2012). Chitosan-based thermosensitive hydrogel as a promising ocular drug delivery system: preparation, characterization, and in vivo evaluation. *Journal of Biomaterials Applications*, 27, 391-402.
 - Chieng, N., Rades, T., Aaltonen, J. (2011). An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 618-644.
 - Chivunova, E.S., Kumeev, R.S., Tereknova, I.V. (2015). Thermodynamic study on salt effects on complex formation of α , β - and γ cyclodextrins with p-aminobenzoic acid. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 91, 30-34.

-
- Cholkar, K., Patel, A., Vadlapudi, A.D., Mitra, A.K. (2012). Novel nanomicellar formulation approaches for anterior and posterior segment ocular drug delivery. *Recent Patents Nanomedicine*, 2 82-95,
 - Davis, M., Brewster, M. (2004). Cyclodextrin-based pharmaceuticals, past, present and future. *Nature Reviews, Drug Discovery*, 3, 1023-1035.
 - Di Colo, G., Zambito, Y. (2002). A study of release mechanisms of different ophthalmic drugs from erodible ocular inserts based on poly(ethylene oxide). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 54, 193-199.
 - Driot, J.Y., Novack, G.D., Rittenhouse, K.D., Milazzo, C., Pearson, P.A. (2004). Ocular pharmacokinetics of fluocinolone acetonide after Retisert intravitreal implantation in rabbits over a 1-year period. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 20, 269-275.
 - Duchêne, D., Bochot, A. (2016). Thirty years with cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 514, 58-72.
 - Duncan, R. (2003). The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 347-360.
 - Edwards, A., Prausnitz, M.R. (2001). Predicted permeability of the cornea to topical drugs. *Pharmaceutical Research*, 18, 1497-1508.
 - Elgindy, N., Samy, W. (2009). Evaluation of the mechanical properties and drug release of cross-linked Eudragit films containing metronidazole. *International Journal of Pharmaceutics*, 376, 1-6.
 - Espinosa, B., Hernández, G. (2005). Formación, evaluación y caracterización del complejo de inclusión piroxicam/hidroxiopropil- β -ciclodextrina. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, (36), 1, 18-24.
 - Felton, L.A. (2013). Mechanisms of polymeric film formation. *International Journal of Pharmaceutics*, 457, (2), 423-427.
 - Fresta, M., Guccione, S., Beccari, A.R., Furneri, P.M., Puglisi, G. (2002). Combining molecular modeling with experimental methodologies: mechanism of membrane permeation and accumulation of ofloxacin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10, 3871-3889.
 - Frömring, K.H., Szejtli, J., (1994). *Cyclodextrins in Pharmacy*. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers.

-
- Ganong, W. (1998). Fisiología médica. (16 ed.) México D.F. El manual moderno.
 - Gaudana, R., Ananthula, H.K., Parenky, A., Mitra, A.K. (2010). Ocular drug delivery. The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal, 12, 348–360.
 - Ghate, D., Edelhauser, H.F. (2006). Ocular drug delivery. Expert Opinion on Drug Delivery, 3, 275–287.
 - Glaessl, B., Siepmann, F., Tucker, I., Rades, T., Siepmann, J. (2010). Deeper insight into the drug release mechanisms in Eudragit RL-based delivery systems. International Journal of Pharmaceutics, 389, 139-146.
 - González-Chomón, C., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C. (2011). Drug-Eluting Intraocular Lenses. Materials, 4, 1927-1940.
 - Hashimoto, H. (1991). Preparation, structure, property and application of branched cyclodextrins, En D. Duchene (Ed.), New Trends in Cyclodextrins and Derivatives (pp. 97-156). Paris, Editions de Santé.
 - Hashimoto, H. (2003). Present status of industrial application of cyclodextrins in Japan. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 44, 57–62.
 - He, Z., Wang, Z., Zhang, H., Pan, X., Su, W., Liang, D., Wu, C. (2011). Doxycyclin and hydroxipropil- β -cyclodextrin complex in poloxamer thermal sensitive hydrogel for ophthalmic delivery. Acta Pharmaceutica Sinica B, (4), 1, 254-260.
 - Higuchi, T., Connors, K.A. (1965). Phase Solubility Techniques. Advanced Analytical Chemistry of Instrumentation, 4, 117-212.
 - Holst, M., Röpke, C. (2006). Innate and adaptive immunity of the eye, En Jorge Fischbarg (Ed.), The biology of the eye (pp. 291-301). Elsevier
 - Holstein, J., Bertram, C., Dittrich, B. (2012). Electrostatic properties of nine fluoroquinolone antibiotics derived directly from their crystal structure refinements. CrystEngComm, 14, 2520
 - Hooper, D.C. (2001). Mechanisms of action antimicrobials: focus on fluoroquinolones. Clinical Infections Diseases, 32, (Supl. 1) pp. S9-S15.
 - Hopfenberg, H.B., Apicella, A., Saleeby, D.E. (1981). Factors affecting water sorption in and solute release from glassy ethylene-vinyl alcohol copolymers. Journal of Membrane Science, 8, 273–281.

-
- Hudovornik, G., Vrečer, F. (2015). Impact of the curing parameters on drug release from Eudragit RS and RL 30D coated pellets: Design of experiments. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 30, 146-153.
 - Hughes, P.M., Olejnik, O., Chang-Lin, J.E., Wilson, C.G. (2005). Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. *Advances Drug Delivery Review*, 57, 2010–2032.
 - Jarvinen, K., Jarvinen, T., Urtti, A. (1995). Ocular absorption following topical delivery. *Advances Drug Delivery Reviews*, 16, 3–19.
 - Kfoury, M., Auezova, L., Grige-Gerges, H., Fourmentin, S. (2015). Promising applications of cyclodextrins in food: Improvement of essential oils retention, controlled release and antiradical activity. *Carbohydrate Polymers*, 131, 264-272.
 - Kim, Y.C., Chiang, B., Wu, X., Prausnitz, M.R. (2014). Ocular delivery of macromolecules. *Journal of Controlled Release*, 190, 172-181.
 - Kimura, H., Ogura, Y. (2001). Biodegradable polymers for ocular drug delivery. *Ophthalmologica*, 215, 143–155.
 - Kompella, U.B., Bandi, N., Ayalashomayajula, S.P., (2003). Subconjunctival nano and microparticles sustained retinal delivery of budesonide, a corticosteroid capable of inhibiting VEGF expression. *Investigate Ophthalmology & Visual Science*, 44, 1192–1201.
 - Korhonen, K., Poikolainen, M., Korhonen, O., Ketolainen, J., Laitinen, R. (2016). Systematic evaluation of a spraying method for preparing thin Eudragit-drug films by Design of Experiments. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 35, 241-251.
 - Korsmeyer, R.W., Peppas, N.A. (1984). Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. III. Drug release from glassy poly(HEMA-co-NVP) copolymers, *Journal of Controlled Release*, 1, 89-98.
 - Kurkov, S., Loftsson, T. (2012). Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 453, 167-180.
 - Lavione, N., Taraby, N., Desloges, I., Martel, B., Bras, J. (2014). Controlled release of chlorhexidine digluconate using β -cyclodextrin and microfibrillated cellulose. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 121, 196-205.
 - Lee, V.H.L. (1990). Mechanisms and facilitation of corneal drug penetration. *Journal of Controlled Release*, 11, 79–90.

-
- Lehmann, K. (1982). The application and processing of acrylic coatings in the form of aqueous dispersions compared with organic solutions. *Acta Pharmaceutica*, 91, 225-238.
 - Leyva, E., Moctezuma, E., Leyva, R., Oros, S. (2004). Estudio de los complejos de inclusión de ácido nalidíxico y ácido oxolínico con ciclodextrinas. *Revista de la sociedad Química de México*, 48, 189-195.
 - Li, J., Zhao, H., Okeke, C.I., Li, L., Liu, Z., Yin, Z., Zhuang, P., Sun, J., Wu, T., Wang, M., Li, N., Pi, J., Zhang, Q., Zhang, R., Ma, Li., Pang, X., Liu, Z., Zhang, L., Fan, L. (2013). Comparison of systemic absorption between ofloxacin ophthalmic in situ gels and ofloxacin conventional ophthalmic solutions administration to rabbit eyes by HPLC-MS/MS. *International Journal of Pharmaceutics*, 450, 104-113.
 - Li, N., Zhang, Y.H., Xiong, X.L., Li, Z.G., Jin, X.H., Wu, Y.N. (2005). Study of the physicochemical properties of trimethoprim with β -cyclodextrin in solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38, 370-374.
 - Limwikrant, W., Higashi, K., Yamamoto, K., Moribe, K. (2009). Characterization of ofloxacin-oxalic acid complex by PXRD, NMR and THz spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, 382, 50-55.
 - Lin, S.Y., Chen, K.S., Run-Chu, L. (2000). Organic esters of plasticizers affecting the water absorption, adhesive property, glass transition temperature and plasticizer permanence of Eudragir acrylic films. *Journal of Controlled Release*, 68, 343-350.
 - Lin, S.Y., Lee, C.J., Lin, Y.Y. (1995). Drug-polymer interaction affecting the mechanical properties, adhesion strength and release kinetics of piroxicam-loaded Eudragit E film plasticized with different plasticizers. *Journal of Controlled Release*, 33, 375-381.
 - Liu, S., Jones, L., Gu, F.X. (2012). Nanomaterials for ocular drug delivery. *Macromolecular Bioscience*, 12, 608-620.
 - Loftsson, T., Duchêne, D. (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 329, 1-11.
 - Loftsson, T., Järvinen, T. (1999). Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36, 59-79.
 - Loftsson, T., Stefánsson, E. (2017). Cyclodextrins and topical drug delivery to the anterior and posterior segments of the eye. *International Journal of Pharmaceutics*, 531, 413-423.

-
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J.C., Moro, M.A., Portolés, A. (2000). Velazquez, Farmacología Básica y Clínica (18 ed.) México D.F., Editorial Médica Panamericana.
 - Mahapatra, S., Venugopala, K.N., Guru-Row, T.N. (2010). A Device to Crystallize Organic Solids: Structure of Ciprofloxacin, Midazolam, and Ofloxacin as Targets. *Crystal Growth & Design*, 10, 1866-1870.
 - Manickavasagam, D., Oyewumi, M.O. (2013). Critical assessment of implantable drug delivery devices in glaucoma management. *Journal of Drug Delivery*, 2013
 - Marques, M.R., Loebenberg, R., Almukainzi, M. (2011). Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolution Technologies*, 15-28.
 - Martínez, G., Gómez, M.A. (2007). Ciclodextrinas: Complejos de inclusión con polímeros. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, (8), 4, 300-312.
 - McGinity, J.W., Felton, L.A. (2008). *Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms*. (3 ed.) Estados Unidos, CRC Press.
 - Misiuk W., Josefowicz, M. (2015). Study on a host-guest interaction of hydroxypropil- β -cyclodextrin with ofloxacin. *Journal of Molecular Liquids*, 202, 101-106.
 - Moshfeghi, A.A., Peyman, G.A. (2005). Micro and nanoparticles. *Advances Drug Delivery Reviews*, 57, 2047-2052.
 - Moya-Ortega, M.D., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Loftsson, T. (2012). Cyclodextrin-based nanogels for pharmaceutical and biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 428, 152-163.
 - Mura, P. (2014). Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101, 238-250.
 - Mura, P. (2015). Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113, 226-238.
 - Mura, P., Maestrelli, F., Cirri, M., Furlanetto, S., Pinzauti, S. (2003). Differential scanning calorimetry as an analytical tool in the study of drug-cyclodextrin interactions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 73, 635-646.

-
- Nerome, H., Machmudah, S., Fukuzato, R., Higashiura, T., Youn, Y., Lee, Y., Goto, M. (2013). Nanoparticle formation of lycopene/ β -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent precipitation. *The Journal of Supercritical Fluids*, 83, 97-103.
 - Nollenberger, K., Alberts, J. (2013). Poly(meth)acrylate-based coatings. *International Journal of Pharmaceutics*, 457, 361-369.
 - Occhiutto, M.L., Freitas, F.R., Maranhao, R.C., Costa, V.P. (2012). Breakdown of the blood ocular barrier as a strategy for the systemic use of nanosystems. *Pharmaceutics*, 4, 252-275.
 - Omari, D.M., Sallam, A., Abd-Elbary, A., El-Samaligy, M. (2004). Lactic acid-induced modifications in film of Eudragit RL and RS aqueous dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, 274, 85-96.
 - Park, K., Mersny, R.J. (2000). *Controlled Drug Delivery: Designing Technologies for the Future*. Washington D.C., American Chemical Society.
 - Peppas, N.A., Franson, N.M. (1983). The swelling interface number as a criterion for prediction of diffusional solute release mechanisms in swellable polymers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 21, 983-997.
 - Qian, Y., Wang, F., Li, R., Zhang, Q., Xu, Q. (2010). Preparation and evaluation of in situ gelling ophthalmic drug delivery system for methazolamide. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 36, 1340-1347.
 - Quinten, T. (2010). *Evaluation of injection molding as a pharmaceutical production technology for sustained-release matrix tablets (Tesis doctoral)*. Universidad de Gante, Bélgica.
 - Remington, (2000). *Farmacología*. (20 ed.), EUA, Editorial Medica Panamericana, tomo I
 - Ribeiro, A., Veiga, F., Santos, D., Torres-Labandeira, J.J., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C. (2012). Hydrophilic acrylic hydrogels with built-in or pendant cyclodextrins for delivery of anti-glaucoma drugs. *Carbohydrate Polymers*, 88, 977-985.
 - Romañuk, C.B., Garro, Y., Chattah, A.K., Monti, G.A., Cuffini, S.L., Garland, M.T., Baggio, R., Manzo, R.H., Olivera, M.E. (2010). Crystallographic, thermal and spectroscopic characterization of a ciprofloxacin saccharinate polymorph. *International Journal of Pharmaceutics*, 391, 197-202.

-
- Rosa dos Santos, J.F., Alvarez-Lorenzo, C., Silva, M., Balsa, L., Couceiro, J., Torres-Labandeira, J.J., Concheiro, A. (2009). Soft contact lenses functionalized with pendant cyclodextrins for controlled drug delivery. *Biomaterials*, 30, 1348-1355.
 - Sánchez-López, E., Espina, M., Doktorovova, S., Souto, E.B., García, M.L. (2016). Lipid nanoparticles (SNL, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye – Part I – Barriers and determining factors in ocular delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 110, 70-75.
 - Scalia, S., Tursilli, R., Iannuccelli, V. (2007). Complexation of the sunscreen agent, 4-methylbenzylidene camphor with cyclodextrins: Effect on photostability and human stratum corneum penetration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, 29-34.
 - Sherwood, L. (2011). *Fisiología humana, de las células a los sistemas*. (7 ed,) México D.F. Cengage Learning.
 - Siepmann, F., Siepmann, J., Walther, M., MacRae, R.J., Bodmeier, R., (2008). Polymer blends for controlled release coatings. *Journal of Controlled Release*, 125, 1-15.
 - Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch S.R. (2007) *Principles of Instrumental Analysis*, (6 ed.) Thomson Brooks/Cole.
 - Song, W., Yu, X., Wang, S., Blasier, R., Markel, D.C., Mao, G., Shi, T., Ren, W. (2011). Cyclodextrin–erythromycin complexes as a drug delivery device for orthopedic application. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 3173–3186.
 - Stella, V., He, Q. (2008). Cyclodextrins, *Toxicologic Phatology*, 36, 30-42.
 - Steward, P.A., Hearn, J., Wilkinson, M.C. (2000). Overview of polymer latex film formation and properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 86, 195-267.
 - Szejtli, J. (1988). *Cyclodextrin Technology*. The Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
 - Szente, L., Szejtli, J., (2004). Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in food Science & Technology*, 15, 137-142.
 - Szente, L., Szemán, J., Sohajda, T. (2016). Analytical characterization of cyclodextrins: History, official methods and recommended new techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, 347-365.
 - Takahashi, A.I., Baptista, F.J., Gomes, H. (2012). A literature review of cyclodextrins inclusion complexes characterization-part 1: phase solubility diagram, dissolution and scanning

electron microscopy. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, (12), 1.

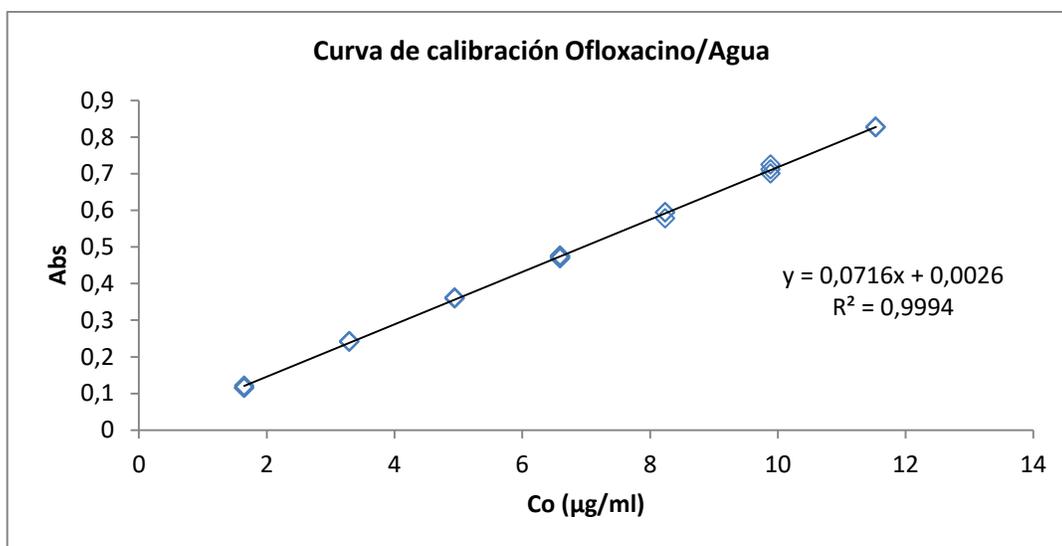
- Tortora, G.J., Reynolds, S. (2005). *Principios de anatomía y fisiología*. (9 ed.) México D.F. Oxford University Press.
- Uchegbu, I.F., Schätzlein, A.G. (2006). *Polymers in Drug Delivery*. Florida, CRC Press.
- van Tent, A., te Nijenhuis, K. (2000). The film formation of polymer particles in drying thin films of aqueous acrylic Lattices II. Coalescence, studied with transmission Spectrophotometry. *Journal of Colloid and Interface Science*, 232, 350-363.
- Vaution, C., Hutin, M., Glomot, F., Duchene, D., (1987). The use of cyclodextrins in various industries. En D. Duchene (Ed.), *Cyclodextrins and Their Industrial Uses*. (pp. 299-350) Paris, Editions de Santé.
- Wagner, K.G., McGinity, J.W. (2002). Influence of chloride ion exchange on the permeability and drug release of Eudragit RS 30D films. *Journal of Controlled Release*, 82, 385-397.
- Weisse, S., Perly, B., Creminon, C., Ouvrard-Baraton, F., Ojeda, F. (2004). Enhancement of vitamin A skin absorption by cyclodextrins. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 14, 77-86.
- Yin, H., Gong, C., Shi, S., Liu, X., Wei, Y., Qian, Z. (2010). Toxicity evaluation of biodegradable and thermosensitive PEG-PCL-PEG hydrogel as a potential in situ sustained ophthalmic drug delivery system. *Journal of Biomedical Materials Research, B Applied Biomaterials*, 92, 129-137.

10. Anexos

10.1 Anexo I Curvas de calibración

10.1.1. Curva de calibración Ofloxacino en agua.

| Sistema | Co (µg/ml) | Abs | Abs/Co | Co Estimada (µg/mL) | Residuo | Error Rel. |
|--------------|------------|--------|----------------|---------------------|---------|------------|
| 1 | 1,648 | 0,1207 | 0,073 | 1,650 | 0,002 | 0,116 |
| 1 | 1,648 | 0,1161 | 0,070 | 1,586 | -0,062 | -3,785 |
| 1 | 1,648 | 0,1149 | 0,070 | 1,569 | -0,079 | -4,802 |
| 2 | 3,296 | 0,2413 | 0,073 | 3,335 | 0,039 | 1,192 |
| 2 | 3,296 | 0,2414 | 0,073 | 3,337 | 0,041 | 1,234 |
| 2 | 3,296 | 0,2428 | 0,074 | 3,356 | 0,060 | 1,828 |
| 3 | 4,944 | 0,3614 | 0,073 | 5,014 | 0,070 | 1,409 |
| 3 | 4,944 | 0,3592 | 0,073 | 4,983 | 0,039 | 0,787 |
| 3 | 4,944 | 0,3612 | 0,073 | 5,011 | 0,067 | 1,352 |
| 4 | 6,592 | 0,4737 | 0,072 | 6,583 | -0,009 | -0,136 |
| 4 | 6,592 | 0,4684 | 0,071 | 6,509 | -0,083 | -1,260 |
| 4 | 6,592 | 0,4718 | 0,072 | 6,556 | -0,036 | -0,539 |
| 4 | 6,592 | 0,4705 | 0,071 | 6,538 | -0,054 | -0,814 |
| 4 | 6,592 | 0,4768 | 0,072 | 6,626 | 0,034 | 0,521 |
| 4 | 6,592 | 0,4748 | 0,072 | 6,598 | 0,006 | 0,097 |
| 5 | 8,24 | 0,595 | 0,072 | 8,278 | 0,038 | 0,463 |
| 5 | 8,24 | 0,5946 | 0,072 | 8,273 | 0,033 | 0,396 |
| 5 | 8,24 | 0,5784 | 0,070 | 8,046 | -0,194 | -2,352 |
| 6 | 9,888 | 0,7118 | 0,072 | 9,910 | 0,022 | 0,227 |
| 6 | 9,888 | 0,7008 | 0,071 | 9,757 | -0,131 | -1,328 |
| 6 | 9,888 | 0,7253 | 0,073 | 10,099 | 0,211 | 2,135 |
| 7 | 11,536 | 0,8269 | 0,072 | 11,519 | -0,017 | -0,148 |
| 7 | 11,536 | 0,8289 | 0,072 | 11,547 | 0,011 | 0,094 |
| 7 | 11,536 | 0,8275 | 0,072 | 11,527 | -0,009 | -0,075 |
| Media | | | 0,072 | | | |
| S | | | 0,001 | | | |
| CV | | | 1,472 % | | | |



| Estadísticas de la regresión | |
|--|-------------|
| Coefficiente de correlación múltiple | 0,999686678 |
| Coefficiente de determinación R ² | 0,999373454 |
| R ² ajustado | 0,999344975 |
| Error típico | 0,005769673 |
| Observaciones | 24 |

| Presición y Exactitud | |
|-----------------------|-----------------|
| Co (µg/mL) | Abs |
| 6,592 | 0,4737 |
| 6,592 | 0,4684 |
| 6,592 | 0,4718 |
| 6,592 | 0,4705 |
| 6,592 | 0,4768 |
| 6,592 | 0,4748 |
| Media | 0,4727 |
| S | 0,0030 |
| CV | 0,6442 % |

| Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) con base en la señal de ruido | |
|--|-------------|
| LD | 0,049 µg/mL |
| LC | 0,165 µg/mL |

Análisis de varianza

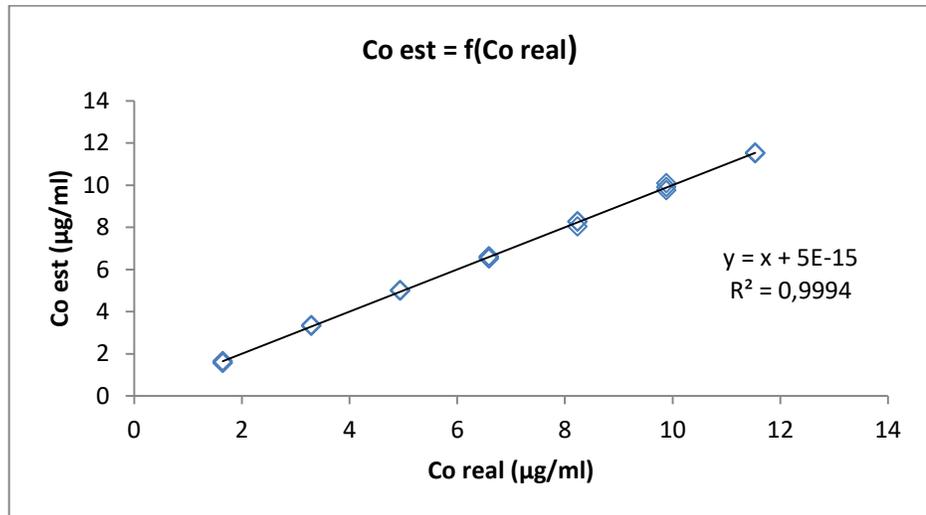
| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | F | Valor crítico de F |
|------------------|--------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|
| Regresión | 1 | 1,168153258 | 1,168153258 | 35091,1391 | 9,8266E-37 |
| Residuos | 22 | 0,000732361 | 3,32891E-05 | | |
| Total | 23 | 1,168885618 | | | |

| | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad | Inferior 95% | Superior 95% |
|---------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------------|--------------------|
| Intercepción | 0,002636905 | 0,002779898 | 0,948561738 | 0,3531478 | -0,003128251 | 0,00840206 |
| Co (µg/ml) | 0,071557154 | 0,000381992 | 187,3262904 | 9,8266E-37 | 0,070764951 | 0,072349357 |

Para evaluar la linealidad del sistema, se realizó el análisis de regresión lineal así como el análisis de varianza. Como se observa, el coeficiente de determinación (r^2) es mayor a 0.98 y el intervalo de confianza para la pendiente no contiene al cero, por lo tanto, existe una relación lineal entre la concentración del analito y su respuesta analítica con un 95 % de confianza. En la precisión y exactitud, el coeficiente de variación para la respuesta analítica es menor a 1.5 %. También se incluyen los valores de los límites de detección y cuantificación.

10.1.1.1. Análisis del poder predictivo

| Co (µg/ml) | Co Estimada (µg/mL) |
|------------|---------------------|
| 1,648 | 1,6499 |
| 1,648 | 1,5856 |
| 1,648 | 1,5689 |
| 3,296 | 3,3353 |
| 3,296 | 3,3367 |
| 3,296 | 3,3562 |
| 4,944 | 5,0137 |
| 4,944 | 4,9829 |
| 4,944 | 5,0109 |
| 6,592 | 6,5830 |
| 6,592 | 6,5090 |
| 6,592 | 6,5565 |
| 6,592 | 6,5383 |
| 6,592 | 6,6264 |
| 6,592 | 6,5984 |
| 8,24 | 8,2782 |
| 8,24 | 8,2726 |
| 8,24 | 8,0462 |
| 9,888 | 9,9104 |
| 9,888 | 9,7567 |
| 9,888 | 10,0991 |
| 11,536 | 11,5189 |
| 11,536 | 11,5469 |
| 11,536 | 11,5273 |



Estadísticas de la regresión

| | |
|--|--------------------|
| Coefficiente de correlación múltiple | 0,999686678 |
| Coefficiente de determinación R² | 0,999373454 |
| R² ajustado | 0,999344975 |
| Error típico | 0,080630271 |
| Observaciones | 24 |

Análisis de varianza

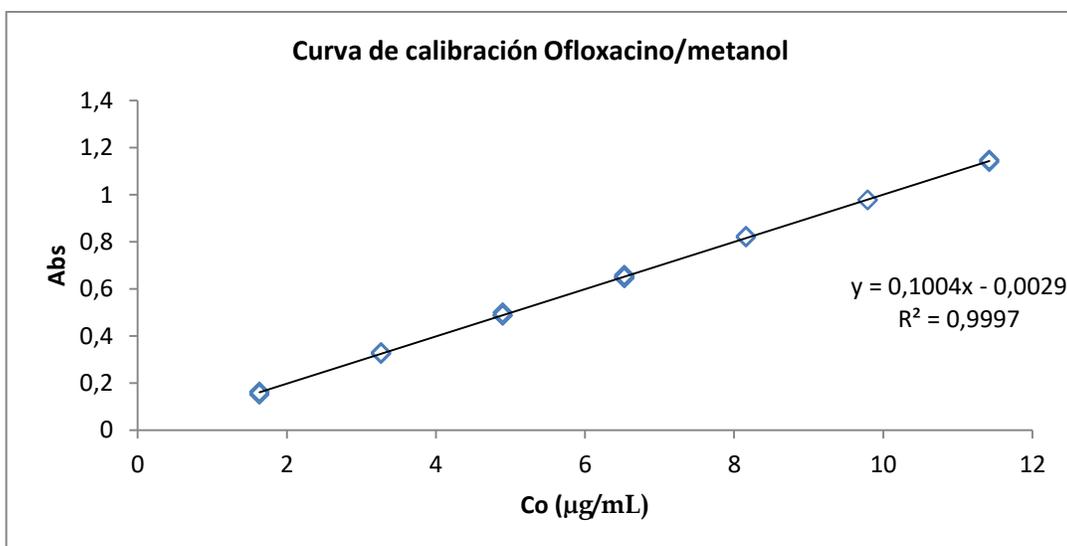
| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | F | Valor crítico de F |
|------------------|--------------------|-------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|
| Regresión | 1 | 228,135936 | 228,135936 | 35091,13906 | 9,8266E-37 |
| Residuos | 22 | 0,143027292 | 0,006501241 | | |
| Total | 23 | 228,2789633 | | | |

| | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad | Inferior 95% | Superior 95% |
|---------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------------|--------------------|
| Intercepción | -1,77636E-15 | 0,038848636 | -4,57251E-14 | 1 | -0,080567141 | 0,080567141 |
| Co (µg/ml) | 1 | 0,005338279 | 187,3262904 | 9,8266E-37 | 0,988929087 | 1,011070913 |

10.1.2 Curva de calibración Ofloxacino en metanol

| Sistema | Co (µg/mL) | Abs | Abs/Co | Co Estimada (µg/mL) | Residuo | Error Rel. |
|---------|------------|--------|--------|---------------------|---------|------------|
| 1 | 1,632 | 0,1625 | 0,100 | 1,647 | 0,015 | 0,940 |
| 1 | 1,632 | 0,1508 | 0,092 | 1,531 | -0,101 | -6,200 |
| 1 | 1,632 | 0,1599 | 0,098 | 1,621 | -0,011 | -0,647 |
| 2 | 3,264 | 0,3258 | 0,100 | 3,274 | 0,010 | 0,296 |
| 2 | 3,264 | 0,3303 | 0,101 | 3,318 | 0,054 | 1,669 |
| 2 | 3,264 | 0,3243 | 0,099 | 3,259 | -0,005 | -0,161 |
| 3 | 4,896 | 0,5 | 0,102 | 5,009 | 0,113 | 2,299 |
| 3 | 4,896 | 0,4887 | 0,100 | 4,896 | 0,000 | 0,000 |
| 3 | 4,896 | 0,4862 | 0,099 | 4,871 | -0,025 | -0,508 |
| 4 | 6,528 | 0,6585 | 0,101 | 6,587 | 0,059 | 0,905 |
| 4 | 6,528 | 0,6542 | 0,100 | 6,544 | 0,016 | 0,249 |
| 4 | 6,528 | 0,646 | 0,099 | 6,463 | -0,065 | -1,002 |
| 4 | 6,528 | 0,6482 | 0,099 | 6,485 | -0,043 | -0,666 |
| 4 | 6,528 | 0,6468 | 0,099 | 6,471 | -0,057 | -0,880 |
| 4 | 6,528 | 0,6521 | 0,100 | 6,523 | -0,005 | -0,071 |
| 5 | 8,160 | 0,8239 | 0,101 | 8,234 | 0,074 | 0,911 |
| 5 | 8,160 | 0,8224 | 0,101 | 8,219 | 0,059 | 0,728 |
| 5 | 8,160 | 0,8187 | 0,100 | 8,183 | 0,023 | 0,276 |
| 6 | 9,792 | 0,978 | 0,100 | 9,769 | -0,023 | -0,234 |
| 6 | 9,792 | 0,9761 | 0,100 | 9,750 | -0,042 | -0,428 |
| 6 | 9,792 | 0,9775 | 0,100 | 9,764 | -0,028 | -0,285 |
| 7 | 11,424 | 1,1390 | 0,100 | 11,372 | -0,052 | -0,451 |
| 7 | 11,424 | 1,1438 | 0,100 | 11,420 | -0,004 | -0,033 |
| 7 | 11,424 | 1,1479 | 0,100 | 11,461 | 0,037 | 0,325 |

| | |
|--------------|----------------|
| Media | 0,100 |
| S | 0,002 |
| CV | 1,768 % |



| Estadísticas de la regresión | | Precisión y Exactitud | | Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) con base en la señal de ruido | |
|--|--------------------|-----------------------|-----------------|--|-------------|
| | | Co (µg/mL) | Abs | | |
| Coefficiente de correlación múltiple | 0,99987291 | 6,528 | 0,6585 | LD | 0,247 µg/mL |
| Coefficiente de determinación R ² | 0,999745836 | 6,528 | 0,6542 | | |
| R ² ajustado | 0,999734283 | 6,528 | 0,646 | LC | 0,824 µg/mL |
| Error típico | 0,005105491 | 6,528 | 0,6482 | | |
| Observaciones | 24 | 6,528 | 0,6468 | | |
| | | 6,528 | 0,6521 | | |
| | | Media | 0,6510 | | |
| | | S | 0,0049 | | |
| | | CV | 0,7468 % | | |

Análisis de varianza

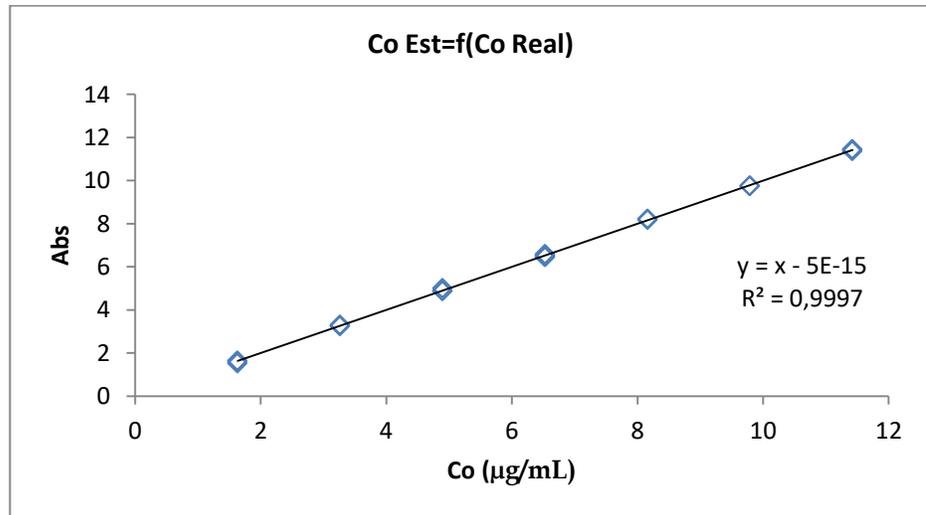
| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | F | Valor crítico de F |
|------------------|--------------------|-------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|
| Regresión | 1 | 2,25565744 | 2,25565744 | 86536,25677 | 4,80952E-41 |
| Residuos | 22 | 0,000573453 | 2,6066E-05 | | |
| Total | 23 | 2,256230893 | | | |

| | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad | Inferior 95% | Superior 95% |
|---------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------------|--------------------|
| Intercepción | -0,002909524 | 0,002459887 | -1,182787518 | 0,249518692 | -0,008011018 | 0,00219197 |
| Co (µg/mL) | 0,100409956 | 0,000341333 | 294,1704553 | 4,80952E-41 | 0,099702075 | 0,101117836 |

Para evaluar la linealidad del sistema, se realizó el análisis de regresión lineal así como el análisis de varianza. Como se observa, el coeficiente de determinación (r^2) es mayor a 0,98 y el intervalo de confianza para la pendiente no contiene al cero, por lo tanto, existe una relación lineal entre la concentración del analito y su respuesta analítica con un 95 % de confianza. En la precisión y exactitud, el coeficiente de variación para la respuesta analítica es menor a 1,5 %. También se incluyen los valores de los límites de detección y cuantificación.

10.1.2.1. Análisis del poder predictivo

| Co (µg/mL) | Co Estimada (µg/mL) |
|------------|---------------------|
| 1,632 | 1,647 |
| 1,632 | 1,531 |
| 1,632 | 1,621 |
| 3,264 | 3,274 |
| 3,264 | 3,318 |
| 3,264 | 3,259 |
| 4,896 | 5,009 |
| 4,896 | 4,896 |
| 4,896 | 4,871 |
| 6,528 | 6,587 |
| 6,528 | 6,544 |
| 6,528 | 6,463 |
| 6,528 | 6,485 |
| 6,528 | 6,471 |
| 6,528 | 6,523 |
| 8,160 | 8,234 |
| 8,160 | 8,219 |
| 8,160 | 8,183 |
| 9,792 | 9,769 |
| 9,792 | 9,750 |
| 9,792 | 9,764 |
| 11,424 | 11,372 |
| 11,424 | 11,420 |
| 11,424 | 11,461 |



Estadísticas de la regresión

| | |
|--|--------------------|
| Coefficiente de correlación múltiple | 0,99987291 |
| Coefficiente de determinación R² | 0,999745836 |
| R² ajustado | 0,999734283 |
| Error típico | 0,050846463 |
| Observaciones | 24 |

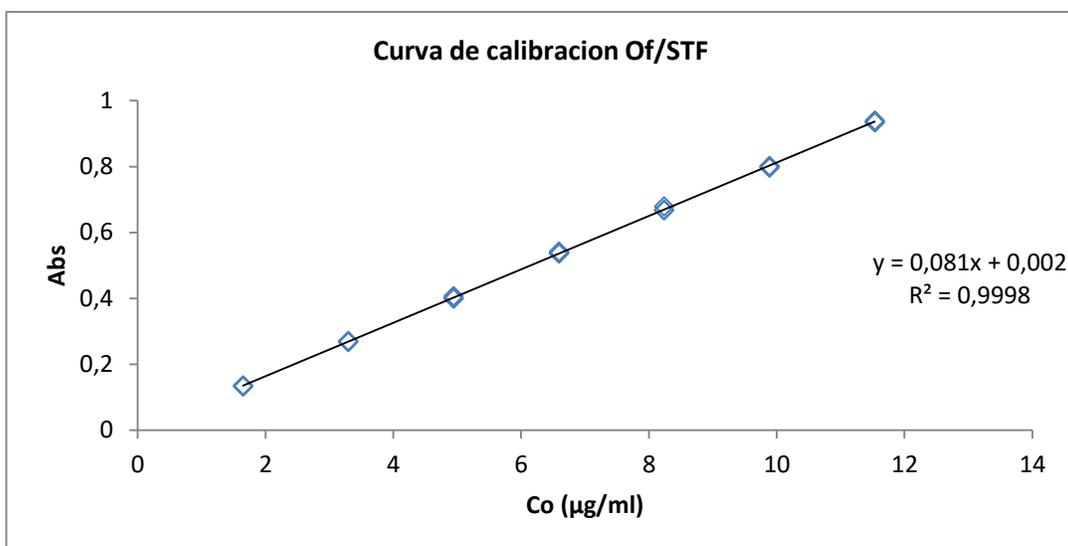
Análisis de varianza

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | F | Valor crítico de F |
|------------------|--------------------|-------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|
| Regresión | 1 | 223,727616 | 223,727616 | 86536,25677 | 4,80952E-41 |
| Residuos | 22 | 0,056877981 | 0,002585363 | | |
| Total | 23 | 223,784494 | | | |

| | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad | Inferior 95% | Superior 95% |
|---------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------------|--------------------|
| Intercepción | 0 | 0,024498439 | 0 | 1 | -0,050806652 | 0,050806652 |
| Co (µg/mL) | 1 | 0,00339939 | 294,1704553 | 4,80952E-41 | 0,992950097 | 1,007049903 |

10.1.3 Curva de calibración en Fluido Lacrimal Simulado

| Sistema | Co (µg/ml) | Abs | Abs/Co | Co Estimada (µg/mL) | Residuo | Error rel. |
|--------------|------------|--------|----------------|---------------------|---------|------------|
| 1 | 1,648 | 0,1314 | 0,080 | 1,597 | -0,051 | -3,082 |
| 1 | 1,648 | 0,1348 | 0,082 | 1,639 | -0,009 | -0,535 |
| 1 | 1,648 | 0,1347 | 0,082 | 1,638 | -0,010 | -0,610 |
| 2 | 3,296 | 0,27 | 0,082 | 3,308 | 0,012 | 0,378 |
| 2 | 3,296 | 0,2672 | 0,081 | 3,274 | -0,022 | -0,671 |
| 2 | 3,296 | 0,2692 | 0,082 | 3,299 | 0,003 | 0,078 |
| 3 | 4,944 | 0,3995 | 0,081 | 4,907 | -0,037 | -0,741 |
| 3 | 4,944 | 0,3992 | 0,081 | 4,904 | -0,040 | -0,816 |
| 3 | 4,944 | 0,4059 | 0,082 | 4,986 | 0,042 | 0,857 |
| 4 | 6,592 | 0,5407 | 0,082 | 6,651 | 0,059 | 0,890 |
| 4 | 6,592 | 0,5351 | 0,081 | 6,582 | -0,010 | -0,158 |
| 4 | 6,592 | 0,5396 | 0,082 | 6,637 | 0,045 | 0,684 |
| 4 | 6,592 | 0,5399 | 0,082 | 6,641 | 0,049 | 0,741 |
| 4 | 6,592 | 0,5378 | 0,082 | 6,615 | 0,023 | 0,347 |
| 4 | 6,592 | 0,5396 | 0,082 | 6,637 | 0,045 | 0,684 |
| 5 | 8,24 | 0,6782 | 0,082 | 8,348 | 0,108 | 1,315 |
| 5 | 8,24 | 0,6664 | 0,081 | 8,203 | -0,037 | -0,453 |
| 5 | 8,24 | 0,6677 | 0,081 | 8,219 | -0,021 | -0,258 |
| 6 | 9,888 | 0,8009 | 0,081 | 9,863 | -0,025 | -0,250 |
| 6 | 9,888 | 0,8001 | 0,081 | 9,853 | -0,035 | -0,350 |
| 6 | 9,888 | 0,7965 | 0,081 | 9,809 | -0,079 | -0,799 |
| 7 | 11,536 | 0,9391 | 0,081 | 11,570 | 0,034 | 0,291 |
| 7 | 11,536 | 0,9345 | 0,081 | 11,513 | -0,023 | -0,201 |
| 7 | 11,536 | 0,9347 | 0,081 | 11,515 | -0,021 | -0,180 |
| Media | | | 0,081 | | | |
| S | | | 0,001 | | | |
| CV | | | 0,746 % | | | |



| Estadísticas de la regresión | | Precisión y Exactitud | | Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) con base en la señal de ruido | |
|--|--------------------|-----------------------|-----------------|--|-------------|
| | | Co (µg/mL) | Abs | | |
| Coefficiente de correlación múltiple | 0,999906988 | 6,592 | 0,5407 | LD | 0,066 µg/mL |
| Coefficiente de determinación R ² | 0,999813984 | 6,592 | 0,5351 | | |
| R ² ajustado | 0,999805528 | 6,592 | 0,5396 | LC | 0,330 µg/mL |
| Error típico | 0,003557557 | 6,592 | 0,5399 | | |
| Observaciones | 24 | 6,592 | 0,5378 | | |
| | | 6,592 | 0,5396 | | |
| | | Media | 0,5388 | | |
| | | S | 0,0020 | | |
| | | CV | 0,3785 % | | |

Análisis de varianza

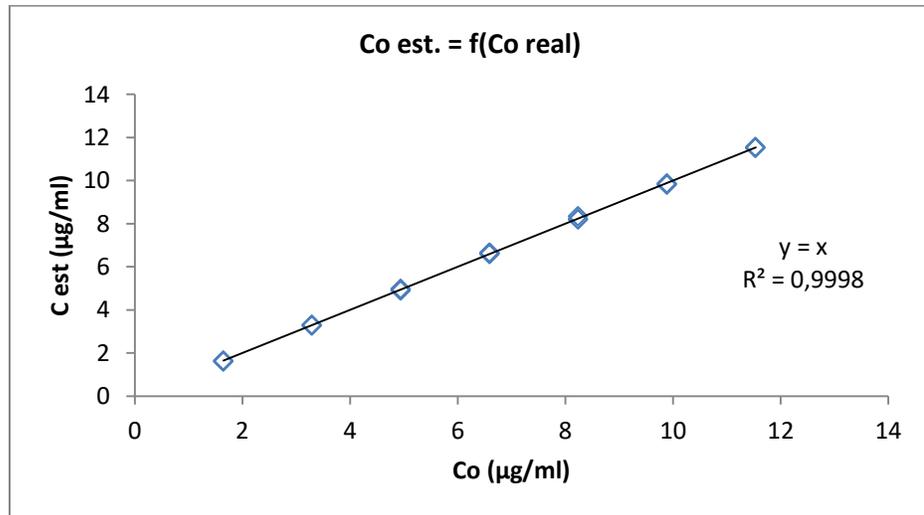
| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | F | Valor crítico de F |
|------------------|--------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|
| Regresión | 1 | 1,496561743 | 1,496561743 | 118247,233 | 1,552E-42 |
| Residuos | 22 | 0,000278437 | 1,26562E-05 | | |
| Total | 23 | 1,49684018 | | | |

| | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad | Inferior 95% | Superior 95% |
|---------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------------|--------------------|
| Intercepción | 0,00203631 | 0,001714074 | 1,187994154 | 0,24750338 | -0,001518462 | 0,005591081 |
| Co (µg/ml) | 0,080993556 | 0,000235535 | 343,8709539 | 1,552E-42 | 0,080505087 | 0,081482026 |

Para evaluar la linealidad del sistema, se realizó el análisis de regresión lineal así como el análisis de varianza. Como se observa, el coeficiente de determinación (r^2) es mayor a 0.98 y el intervalo de confianza para la pendiente no contiene al cero, por lo tanto, existe una relación lineal entre la concentración del analito y su respuesta analítica con un 95 % de confianza. En la precisión y exactitud, el coeficiente de variación para la respuesta analítica es menor a 1.5 %. También se incluyen los valores de los límites de detección y cuantificación.

10.1.3.1. Análisis del poder predictivo

| Co (µg/ml) | Co Estimada (µg/mL) |
|------------|---------------------|
| 1,648 | 1,597 |
| 1,648 | 1,639 |
| 1,648 | 1,638 |
| 3,296 | 3,308 |
| 3,296 | 3,274 |
| 3,296 | 3,299 |
| 4,944 | 4,907 |
| 4,944 | 4,904 |
| 4,944 | 4,986 |
| 6,592 | 6,651 |
| 6,592 | 6,582 |
| 6,592 | 6,637 |
| 6,592 | 6,641 |
| 6,592 | 6,615 |
| 6,592 | 6,637 |
| 8,24 | 8,348 |
| 8,24 | 8,203 |
| 8,24 | 8,219 |
| 9,888 | 9,863 |
| 9,888 | 9,853 |
| 9,888 | 9,809 |
| 11,536 | 11,570 |
| 11,536 | 11,513 |
| 11,536 | 11,515 |



Estadísticas de la regresión

| | |
|--|--------------------|
| Coefficiente de correlación múltiple | 0,999906988 |
| Coefficiente de determinación R² | 0,999813984 |
| R² ajustado | 0,999805528 |
| Error típico | 0,043923947 |
| Observaciones | 24 |

Análisis de varianza

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | F | Valor crítico de F |
|------------------|--------------------|-------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|
| Regresión | 1 | 228,135936 | 228,135936 | 118247,2329 | 1,552E-42 |
| Residuos | 22 | 0,042444888 | 0,001929313 | | |
| Total | 23 | 228,1783809 | | | |

| | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad | Inferior 95% | Superior 95% |
|---------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------------|--------------------|
| Intercepción | 0 | 0,021163087 | 0 | 1 | -0,043889556 | 0,043889556 |
| Co (µg/ml) | 1 | 0,002908068 | 343,8709539 | 1,552E-42 | 0,993969037 | 1,006030963 |

10.2 Anexo 2. Pruebas F y t para cantidad de fármaco en los complejos

10.2.1. Comparativa entre ciclodextrinas, método de amasado

| Intervalos de confianza. | µg/mL | |
|-------------------------------------|---------------|---------------|
| | HP-β-CD | β-CD |
| | 8,2989 | 8,6075 |
| | 8,4455 | 8,5377 |
| | 8,2109 | 8,6453 |
| Media | 8,3184 | 8,5968 |
| S | 0,1185 | 0,0546 |
| n | 3 | 3 |
| raiz n | 1,7321 | 1,7321 |
| S/raiz n | 0,0684 | 0,0315 |
| tg1=2, α = 0.05/2 | 4,3027 | 4,3027 |
| [tg1=2, α = 0.05/2]*S/raiz n | 0,2945 | 0,1355 |
| Limite inf de la media | 8,0240 | 8,4613 |
| Limite sup de la media | 8,6129 | 8,7324 |

| Prueba F | HP-β-CD | β-CD |
|--|--------------------|------------|
| Media | 8,318435754 | 8,59683426 |
| Varianza | 0,014050357 | 0,00297731 |
| Observaciones | 3 | 3 |
| Grados de libertad | 2 | 2 |
| F | 4,719152653 | |
| P(F<=f) una cola | 0,174851077 | |
| Valor crítico para F (una cola) | 19 | |

Prueba t suponiendo varianzas iguales

| | β-CD | HP-β-CD |
|--|--------------------|------------|
| Media | 8,596834264 | 8,31843575 |
| Varianza | 0,002977305 | 0,01405036 |
| Observaciones | 3 | 3 |
| Varianza agrupada | 0,008513831 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 3,695302687 | |
| P(T<=t) una cola | 0,010460646 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 2,131846786 | |
| P(T<=t) dos colas | 0,020921293 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2,776445105 | |

Para la prueba F, la F calculada es menor que la F crítica, por lo tanto, las varianzas son iguales.

Para la prueba t, el valor calculado es mayor que la t crítica para dos colas, por lo tanto, existe diferencia significativa entre la cantidad de fármaco que forma los complejos de inclusión utilizando diferentes ciclodextrinas con el método de amasado con un 95 % de confianza. El P-valor es de 0,021.

10.2.2. Comparativa entre ciclodextrinas, método de co-precipitación

Intervalos de confianza.

| | µg/mL | |
|-------------------------------------|-------------|-------------|
| | HP-β-CD | β-CD |
| | 6,5587 | 9,5587 |
| | 6,7235 | 9,3757 |
| | 6,6522 | 9,4595 |
| Media | 6,6 | 9,5 |
| S | 0,0827 | 0,0916 |
| n | 3 | 3 |
| raiz n | 1,7321 | 1,7321 |
| S/raiz n | 0,0477 | 0,0529 |
| tg1=2, α = 0.05/2 | 4,3027 | 4,3027 |
| [tg1=2, α = 0.05/2]*S/raiz n | 0,2053 | 0,2275 |
| Limite inf de la media | 6,44 | 9,24 |
| Limite sup de la media | 6,85 | 9,69 |

Prueba F

| | β-CD | HP-β-CD |
|--|--------------------|------------|
| Media | 9,46461825 | 6,64478585 |
| Varianza | 0,008388341 | 0,00683174 |
| Observaciones | 3 | 3 |
| Grados de libertad | 2 | 2 |
| F | 1,227848101 | |
| P(F<=f) una cola | 0,448863636 | |
| Valor crítico para F (una cola) | 19 | |

Prueba t suponiendo varianzas iguales

| | HP-β-CD | β-CD |
|--|--------------------|------------|
| Media | 6,644785847 | 9,46461825 |
| Varianza | 0,006831742 | 0,00838834 |
| Observaciones | 3 | 3 |
| Varianza agrupada | 0,007610041 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | -39,5890809 | |
| P(T<=t) una cola | 1,21611E-06 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 2,131846786 | |
| P(T<=t) dos colas | 2,43223E-06 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2,776445105 | |

Para la prueba F, la F calculada es menor que la F crítica, por lo tanto, las varianzas son iguales.

Para la prueba t, el valor calculado es menor que la t crítica para dos colas, por lo tanto, existe diferencia significativa entre la cantidad de fármaco que forma los complejos de inclusión utilizando diferentes ciclodextrinas con el método de co-precipitación con un 95 % de confianza. El P-valor es de 2.4 E-06.

10.2.3. Comparativa entre métodos, HP-β-CD

| Intervalos de confianza. | | | Prueba F | | |
|-------------------------------------|----------------|-------------------------|--|--------------------|-------------------------|
| | μg/mL | | | Amasado | Co-precipitación |
| | amasado | Co-precipitación | | | |
| | 8,2989 | 6,5587 | Media | 8,318435754 | 6,644785847 |
| | 8,4455 | 6,7235 | Varianza | 0,014050357 | 0,006831742 |
| | 8,2109 | 6,6522 | Observaciones | 3 | 3 |
| Media | 8,32 | 6,64 | Grados de libertad | 2 | 2 |
| S | 0,1185 | 0,0827 | F | 2,056628914 | |
| n | 3 | 3 | P(F<=f) una cola | 0,327157803 | |
| raiz n | 1,7321 | 1,7321 | Valor crítico para F (una cola) | 19 | |
| S/raiz n | 0,0684 | 0,0477 | | | |
| tg1=2, α = 0.05/2 | 4,3027 | 4,3027 | | | |
| [tg1=2, α = 0.05/2]*S/raiz n | 0,2945 | 0,2053 | | | |
| Limite inf de la media | 8,02 | 6,44 | | | |
| Limite sup de la media | 8,61 | 6,85 | | | |

Prueba t suponiendo varianzas iguales

| | Amasado | Co-precipitación |
|--|--------------------|-------------------------|
| Media | 8,318435754 | 6,644785847 |
| Varianza | 0,014050357 | 0,006831742 |
| Observaciones | 3 | 3 |
| Varianza agrupada | 0,010441049 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 20,06033448 | |
| P(T<=t) una cola | 1,82225E-05 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 2,131846786 | |
| P(T<=t) dos colas | 3,6445E-05 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2,776445105 | |

Para la prueba F, la F calculada es menor que la F crítica, por lo tanto, las varianzas son iguales.

Para la prueba t, el valor calculado es mayor que la t crítica para dos colas, por lo tanto, existe diferencia significativa entre la cantidad de fármaco que forma los complejos de inclusión utilizando diferentes métodos con HP-β-CD con un 95 % de confianza. El P-valor es de 3,6 E-05.

10.2.4. Comparativa entre métodos, β -CD

| Intervalos de confianza. | | | Prueba F | | |
|---|------------------|-------------------------|--|-------------------------|----------------|
| | $\mu\text{g/mL}$ | | | Co-precipitación | Amasado |
| | amasado | Co-precipitación | | | |
| | 8,6075 | 9,5587 | Media | 9,46461825 | 8,596834264 |
| | 8,5377 | 9,3757 | Varianza | 0,008388341 | 0,002977305 |
| | 8,6453 | 9,4595 | Observaciones | 3 | 3 |
| Media | 8,60 | 9,46 | Grados de libertad | 2 | 2 |
| S | 0,0546 | 0,0916 | F | 2,817427386 | |
| n | 3 | 3 | P(F<=f) una cola | 0,261956522 | |
| raiz n | 1,7321 | 1,7321 | Valor crítico para F (una cola) | 19 | |
| S/raiz n | 0,0315 | 0,0529 | | | |
| tgl=2, $\alpha = 0.05/2$ | 4,3027 | 4,3027 | | | |
| [tgl=2, $\alpha = 0.05/2$]*S/raiz n | 0,1355 | 0,2275 | | | |
| Limite inf de la media | 8,46 | 9,24 | | | |
| Limite sup de la media | 8,73 | 9,69 | | | |

Prueba t suponiendo varianzas iguales

| | Co-precipitación | Amasado |
|--|-------------------------|----------------|
| Media | 9,46461825 | 8,596834264 |
| Varianza | 0,008388341 | 0,002977305 |
| Observaciones | 3 | 3 |
| Varianza agrupada | 0,005682823 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 14,09857419 | |
| P(T<=t) una cola | 7,34502E-05 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 2,131846786 | |
| P(T<=t) dos colas | 0,0001469 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2,776445105 | |

Para la prueba F, la F calculada es menor que la F crítica, por lo tanto, las varianzas son iguales.

Para la prueba t, el valor calculado es mayor que la t crítica para dos colas, por lo tanto, existe diferencia significativa entre la cantidad de fármaco que forma los complejos de inclusión utilizando diferentes métodos con β -CD con un 95 % de confianza. El P-valor es de 1,4 E-04.