



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN
CLORAMBUCILO – HIDROXI ETIL β
CICLODEXTRINA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A :

ANA MARÍA XOCHITL CALDERÓN DUARTE

**ASESORES: DRA. ADRIANA FLORA GANEM RONDERO
M. EN C. MARÍA GUADALUPE NAVA ARZALUZ**



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
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Formación y Caracterización de complejos de inclusión

Clorambucilo-Hidroxi Etil β Ciclodextrina

que presenta la pasante: Ana María Xochitl Calderón Duarte

con número de cuenta: 40000959-3 para obtener el título de :

Química Farmacéutica Bióloga

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 4 de Julio de 2005

PRESIDENTE QFB. Guadalupe Rebollar Barrera

VOCAL Dra. Adriana Flora Ganem Rondero

SECRETARIO MC. Lidia Rangel Trujano

PRIMER SUPLENTE MFC. Cecilia Hernández Barba

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Bertha Ortiz Vázquez

*“No hay oscuridad sin luz,
no hay esperanzas malgastadas,
no hay amor sin dolor,
son sólo sueños que se pierden
para luego regresar.”*

P. Damián C.C.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Cirilo Calderón y Paula Duarte:

Porque sin su apoyo incondicional y desinteresado a lo largo de mi vida no habría logrado llegar al punto en el que hoy me encuentro. Gracias de corazón por su buen ejemplo de superación y perseverancia, por el incansable apoyo y cariño demostrado a lo largo de mi vida. Los quiero mucho.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM

Por haberme acogido durante mi desarrollo profesional, por la calidez y sencillez que emana, porque en esta gloriosa institución adquirí parte fundamental en mi desarrollo académico.

A mi asesora de tesis Dra. Adriana F. Ganem Rondero

Por el grandioso regalo que me dio al permitirme trabajar con ella puesto que aprendí mucho y recibí, tanto valioso conocimiento a nivel académico como apoyo a nivel personal. Estoy y estaré infinitamente agradecida.

A mi coasesora M. en C. Maria Guadalupe Nava Arzaluz

Por brindarme su apoyo y sus conocimientos de manera incondicional, Lupita Gracias.

A el Dr. David Quintanar Guerrero

Por brindarme su apoyo incondicional y hacer placentera la estancia en el laboratorio, con su buen humor.

A el Técnico Rodolfo Robles

Del laboratorio de Microscopia de la FES Cuautitlán
Por su asistencia en los estudios de Microscopia Electrónica de Barrido.

A la M. en C. Ana Maria Velázquez

Del laboratorio de Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR)
Por su tiempo y colaboración en la caracterización de algunas muestras por medio de esta técnica.

DEDICATORIAS

A **Cirilo y Paula** he aquí la culminación de una de las etapas de mi vida, este trabajo es suyo pues me ayudaron y apoyaron a lo largo de la realización de éste. Con todo mi corazón: es de ustedes.

A mis hermanos: **Arianna y Sonia** por compartir conmigo todo un largo proceso, desde la infancia hasta ahora, por su tiempo y paciencia, **Alfredo** por ayudarme, ser mi niño tierno y siempre mi gran inspiración.
Los quiero.

Para ustedes a mis amigos del alma que durante la licenciatura colaboraron conmigo, en lo académico, lo personal, por tantos momentos gratos
Gracias **Ángel, Gabriel, Hugo, Magnolia, Miguel, Raúl** por sus consejos y apoyo incondicional.

Mashe definitivamente eres punto y aparte, la mejor persona que se pudo haber cruzado en mi camino, gracias amiga por los años tan maravillosos compartidos, gracias por que siempre me has hecho saber que cuento contigo. Para ti !

Al excelente grupo de trabajo que me acompañó en el laboratorio, **Zaida y Karen (amiguis), Gilberto, Elizabeth P., Marlen, Luis Antonio, Edgar, Luis, José Juan**, fue muy lindo trabajar con ustedes y tener la oportunidad de conocerlos.

A ti **Damián** por tu incansable apoyo, comprensión, cariño y amor. Por ser esa luz que siempre me guía en momentos difíciles. He aquí por fin la culminación de un sueño, este logro es tan tuyo como mío.
No hay mejor lugar a donde pueda ir o donde pueda estar.
Te amo.

ÍNDICE

	Página
Lista de Abreviaturas	V
Lista de Figuras	XIII
Lista de Tablas	X
Lista de Gráficas	XII
Lista de Anexos	XIV
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1. Ciclodextrinas	3
2.1.1. Generalidades de la Ciclodextrinas	3
2.1.2. Propiedades Físicoquímicas de las Ciclodextrinas	5
2.1.3. Las Ciclodextrinas como excipientes innovadores	7
2.1.3.1. Aplicaciones de las Ciclodextrinas	8
2.2. Clorambucilo	16
2.2.1. Características y Propiedades Físicoquímicas del Clorambucilo	16
2.2.2. Propiedades farmacológicas del Clorambucilo	18
2.2.3. Sistemas propuestos y formas comerciales con Clorambucilo	20
2.3. Complejos de Inclusión	21
2.3.1. Preparación de Complejos de Inclusión	28
2.3.2. Caracterización de los Complejos	30
2.3.2.1. Diagramas de solubilidad de Higuchi y Connors para complejos de inclusión	30
2.3.2.2. Espectrofometría, Calorimetría Diferencial de Barrido, Microscopía Electrónica de Barrido, Espectroscopia infrarrojo y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)	33

	Página
2.4. Estabilidad	36
2.4.1. Condiciones propuestas para una prueba de estabilidad acelerada para complejos en estado sólido y solución acuosa	39
2.5 La mucosa bucal como vía de administración	40
2.5.1 Características de la mucosa bucal	41
2.5.2. Transporte de Fármacos a través de la mucosa bucal	43
2.5.2.1 Aplicaciones de la liberación de fármacos vía mucosa bucal	44
2.5.3. Mecanismo de acción de las Ciclodextrinas como sistemas de liberación	46
2.6 Condiciones sink en disolución	48
3. Objetivos	49
4. Materiales y reactivos	51
5. Metodología	53
5.1 Diagrama General	53
5.2 Curvas de calibración	54
5.3 Diagramas de solubilidad	54
5.4 Estudios de cinética de degradación	55
5.5 Formación del complejo de inclusión	55
5.5.1 Método de amasado	55
5.5.1.1 Efecto del tiempo de amasado	55
5.5.2 Método de liofilizado	56
5.5.3 Método de coevaporación	56
5.6 Caracterización de los complejos	57
5.6.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	57
5.6.2 Espectrofotometría UV/VIS	57
5.6.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	57

	Página
5.6.4 Espectroscopía de Infrarrojo	58
5.6.5 Tasa de complejación	58
5.7 Estudios de Estabilidad	58
5.8. Estudios de permeación <i>in vitro</i>	60
5.8.1 Estudios de solubilidad para determinar condiciones sink	60
5.8.2 Permeación a través de mucosa bucal porcina	60
6. Resultados y discusión	61
6.1 Diagramas de solubilidad para CHL	61
6.2 Cinéticas de degradación	65
6.3 Obtención de los complejos de inclusión	72
6.3.1 Descripción de los complejos	72
6.3.2 Rendimiento aparente	73
6.4 Caracterización cualitativa y cuantitativa de los complejos de inclusión	74
6.4.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	74
6.4.2 Espectrofotometría UV/VIS	78
6.4.3 Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR)	80
6.4.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	84
6.4.5 Estudio del tiempo de amasado	89
6.4.5.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	89
6.4.5.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)	90
6.4.5.3 Espectrofotometría UV/VIS	93
6.4.5.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	95
6.4.6 Tasa de complejación (HPLC)	97

	Página
6.5 Estudios de Estabilidad	100
6.6 Estudios de permeación <i>in vitro</i>	104
6.6.1 Estudios de solubilidad para determinar condiciones sink	104
6.6.2 Estudios de permeación <i>in vitro</i>	104
6.6.3 Cantidad retenida de CHL en membrana bucal porcina	115
6.7 Comparación de los resultados con aquellos obtenidos en trabajos previos	116
7. Conclusiones	122
8. Perspectivas	124
9. Bibliografía	126
10. Anexos	132

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Amstrong
Å ³	Amstrong cúbico
A _L	Diagrama de solubilidad tipo A _L con estequiometría del complejo 1:1
Ama	Método de obtención y/o complejación por amasado
ANADEVA	Análisis de Varianza
A _N	Diagrama de solubilidad tipo A _N con estequiometría del complejo 1:1 y pendiente negativa
A _P	Diagrama de solubilidad tipo A _P con estequiometría del complejo 1:1 y pendiente positiva
β-CDs	Beta Ciclodextrinas
B _I	Diagrama de solubilidad tipo B _I el complejo formado es algo insoluble y de estequiometría diferente a 1:1, con comportamiento inicial similar a A _L
B _S	Diagrama de solubilidad tipo B _S comportamiento inicial de la solubilidad y de estequiometría diferente a 1:1, con comportamiento inicial similar a A _L
C.M.A.	Cantidad Máxima Acumulada
CD	Ciclodextrina
CDs	Ciclodextrinas
CMβCD	Carboxi Metil-β-Ciclodextrina
CoevEt	Método de obtención y/o complejación por coevaporación en etanol
CoevMet	Método de obtención y/o complejación por coevaporación en metanol
CHL	Clorambucilo
DMβCD	Heptakis(2,6-di-O-metil)-β-Ciclodextrina
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido (por sus siglas en Ingles)
e.g.	por ejemplo (<i>exempli gratia</i>)
Et	Etanol
FTIR	Espectroscopía Infrarroja por Transformadas de Fourier
HEβCD	2-HE-β -CD 2 Hidroxi Etil βCiclodextrina
HPβCD	2-Hidroxipropil-β-Ciclodextrina

HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (por sus siglas en Inglés)
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
IR	Infrarrojo
J	Flujo
K _a :b	Constante de asociación o de estabilidad
K _{1:1}	Constante de unión (estequiométrica)
K _c	Constante de complejación
K _o	Constante de degradación de CHL solo
K _{obs}	Constante de degradación observada para el CHL en presencia de β CDs
K _R	Factor de promoción
K _{st}	Constante aparente de estabilidad
Lio	Método de obtención y/o complejación por liofilización
Log P	Coefficiente de partición
M	Concentración molar
M.F.	Mezcla Física
M ⁻¹	Concentración molar a la menos uno (1 / M)
MCT	Monoclorotriacínil
Met	Metanol
MLβCD	Maltosil-β-Ciclodextrina
mod.	Modelo
n	Número de repeticiones
NOM	Norma Oficial Mexicana
PAAM	Mostaza Ácida Fenilacética
pka	Logaritmo base 10 de la constante de acidez
PVP	Polivinilpirrolidona
RMβCD	β-Ciclodextrina metilada al azar
S	Solubilidad
SD	Desviación Estándar
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido (por sus siglas en Inglés)
So	Solubilidad inicial o del fármaco por si mismo

SSA	Secretaria de Salud y Asistencia
Rf	Factor de retardo
TGA	Temperatura de transición vítrea
TIF	Tipo Inspección Federal
t_{lag}	Tiempo de latencia
TM β CD	Heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- β -Ciclodextrina
tr	Tiempo de retención
USA	United States of America
UV	Ultravioleta
UV/VIS	Rango del ultravioleta y del visible en el espectro de luz
α	Alfa
β	Beta
γ	gama
ε	Constante dieléctrica

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- Estructura química de las ciclodextrinas, α -CDs es igual a 1; en las β -CDs $n = 2$ y en las γ -CDs $n = 3$	4
Figura 2.- Termograma obtenido a partir de succinato de almidón de papa Muestra el perfil calorimétrico que siguen la mayoría de las CDs	7
Figura 3.- Simulación de proceso de complejación. Obtenido de Frömring and Szejtli	22
Figura 4.- Proceso de equilibrio que describe la interacción entre una CD y una molécula de un fármaco insoluble para formar un complejo soluble o insoluble	23
Figura 5.- Importancia del acomodo de la molécula "huésped" dentro de la cavidad de la CD. Obtenido de Frömring and Szejtli	25
Figura 6.- Diagramas de solubilidad de fases	32
Figura 7.- Esquema de un corte transversal de la mucosa oral que muestra el epitelio, la lámina basal y el tejido conectivo	41
Figura 8.- Representación esquemática de la cavidad oral abierta, mostrando las regiones queratinizadas (blanco) y las no queratinizadas (gris) de la boca	42
Figura 9.- Representación esquemática del posible mecanismo de la liberación de fármacos a partir de una matriz polimérica hidratada	46
Figura 10.- Celda tipo Franz y condiciones bajo las cuales se llevo a cabo la permeación <i>in vitro</i>	61
Figura 11.- Mecanismo de reacción ocurrido durante la cinética de degradación de CHL libre y en presencia de distintas concentraciones de HE β CD	69
Figura A.- Cristales CHL 45X	84
Figura B.- Cristal CHL 450X	84
Figura C.- Unidades de HE β CD 450X	84
Figura D.- Unidades de HE β CD 3000X	84
Figura E.- Mezcla física CHL/ HE β CD 1500X	85
Figura F.- Mezcla física CHL/ HE β CD 1500X	85
Figura G.- Complejo obtenido por amasado 45X	86
Figura H.- Complejo obtenido por amasado 450X	86
Figura I.- Complejo obtenido por amasado 1000X	86

	Página
Figura J.- Complejo obtenido por liofilizado (suspensión) 1000X	87
Figura K.- Complejo obtenido por liofilizado (solución) 1000X	87
Figura L.- Complejo obtenido por CoevEt 45X	87
Figura M.- Complejo obtenido por CoevMet 45X	87
Figura N.- Complejo obtenido por CoevEt 1500X	87
Figura O.- Tiempo Amasado 30 min 1500X	95
Figura P.- Tiempo Amasado 60 min 1500X	95
Figura Q.- Tiempo Amasado 90 min 1500X	96
Figura R.- Tiempo Amasado 120 min 1500X	96
Figura S.- Tiempo Amasado 150 min. 1500X	96
Figura 12.- Esquema de la liberación y absorción del fármaco a partir del complejo de inclusión. Modificada de: http://club.telepolis.com/fjtorres/doc/USC/ciclodextrinas_imagenes.htm	108

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1.- Características Físicas de las CDs en general	5
Tabla 2.- Fármacos modificados para su permeación a través de piel o mucosa bucal	45
Tabla 3.- Estudios de estabilidad realizados a los complejos de inclusión	59
Tabla 4.- Constantes de complejación para CHL a diferentes concentraciones de HE β CD a 23 °C	66
Tabla 5.- Constantes de complejación para CHL a diferentes concentraciones de HE β CD a 37 °C	66
Tabla 6.- Parámetros cinéticos para la hidrólisis del CHL a diferentes temperaturas	71
Tabla 7.- Porcentaje de rendimiento total del complejo	73
Tabla 8.- Efecto de la complejación de CHL con HE β CD en la banda de absorción infrarrojo	83
Tabla 9.- Áreas bajo la curva de los posibles productos de degradación del CHL	92
Tabla 10.- Eficiencia de Encapsulamiento para CHL en los complejos	98
Tabla 11.- Degradación de los complejos en estado sólido y en solución acuosa de acuerdo a las condiciones de estabilidad acelerada de la NOM-073	100
Tabla 12.- Degradación de los complejos en estado sólido de acuerdo a las condiciones de estabilidad establecidas en el trabajo	101
Tabla 13.- Valores de solubilidad para CHL en solución de HE β CD 5 %	104
Tabla 14.- Tiempo de latencia para las diferentes muestras (estudio de permeación <i>in vitro</i>)	111
Tabla 15.- Cantidad Máxima Acumulada (C.M.A.) para las diferentes muestras (estudio de permeación <i>in vitro</i>)	112
Tabla 16.- Flujo obtenido para las diferentes muestras (estudio de permeación <i>in vitro</i>)	113
Tabla 17.- Factor de promoción para las diferentes muestras (estudio de permeación <i>in vitro</i>)	114

	Página
Tabla 18.- Tipo de diagramas de solubilidad y constantes de unión para el CHL en función de 4 β -CDs	116
Tabla 19.- Valores de las constantes observadas y relación K_o/K_{obs} para el CHL en función de distintas concentraciones de 4 β -CDs diferentes	118
Tabla 20.- Eficiencia de encapsulamiento para CHL en los complejos de inclusión obtenidos por los distintos métodos y con las diferentes β -CDs	120
Tabla 21.- Valores de flujo del complejo CHL- β -CD a través de mucosa bucal porcina	121

LISTA DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1.- Diagramas de solubilidad para el CHL a 23 ° C y 37 ° C	63
Gráfica 2.- Cromatogramas de la cinética de degradación del CHL en presencia de HEβCD (1.322 x 10 ⁻³ M) a 23 ° C y 37 ° C	64
Gráfica 3.- Hidrólisis del CHL a 23 ° C y 37 ° C	65
Gráfica 4.- Cinéticas de degradación de CHL a 23 ° C en presencia de diferentes concentraciones de HEβCD	67
Gráfica 5.- Cinéticas de degradación de CHL a 37 ° C en presencia de diferentes concentraciones de HEβCD	68
Gráfica 6.- Efecto de la HEβCD sobre el valor de la constante de pseudo primer orden de degradación del CHL a 23 ° C y 37 ° C	68
Gráfica 7.- Comportamiento de las constantes y datos obtenidos de acuerdo a la correlación ($k_o - k_{obs}$) en función de ($k_o - k_{obs}$) (HEβCD) a 23 ° C y 37 ° C	70
Gráfica 8.- Cromatogramas de la cinética de degradación de CHL a 37 ° C en presencia de la concentración más alta y más baja de HEβCD	72
Gráfica 9.- Termogramas obtenidos mediante un DSC Refrigerador Cooling System TA Instruments NRTL LISTED MET®, con un flujo de nitrógeno de 50 ml/min y una rampa de calentamiento 0-300 ° C, a una velocidad de calentamiento de 10 ° C/min para el CHL y sus complejos de inclusión	76
Gráfica 10.- Espectros de absorción UV para los estándares (CHL y HEβCD) así como de los complejos de inclusión. Obtenidos mediante un UV-Vis.; Varian®, mod. Cary IE 95031003	79
Gráfica 11.- Espectros Infrarrojo para el CHL y sus complejos de inclusión.	82
Gráfica 12.- Termogramas obtenidos mediante un DSC Refrigerador Cooling System TA Instruments NRTL LISTED MET®, con un flujo de nitrógeno de 50 ml/min y una rampa de calentamiento 0-300 ° C, a una velocidad de calentamiento de 10 ° C/min para el CHL y sus complejos de inclusión (estudio amasado)	90

	Página
Gráfica 13 .- Cromatogramas obtenidos mediante un HPLC ProStar 210, Varian, por medio de una columna C18 fase reversa de 25 cm de longitud, diámetro interno 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm, empleando como fase móvil acetonitrilo:agua:ácido acético 59:40:1 A -30 min.-, B - 60 min.-, C -90 min.-, D -120 min.-, E -150 min	91
Gráfica 14 .- Espectros de absorción UV para los diferentes tiempos de amasado Obtenidos mediante un Espectrofotómetro UV-Vis.; Varian®, Cary A -30 min.-, B - 60 min.-, C -90 min.-, D -120 min.-, E -150 min	94
Gráfica 15.- Perfil de estabilidad o degradación para los complejos por Amasado y CoevMet de acuerdo a la estabilidad acelerada de la NOM-073.	102
Gráfica 16.- Perfil de estabilidad para los complejos por Amasado y CoevEt de acuerdo a las condiciones de estabilidad establecidas en el trabajo	103
Gráfica 17.- Perfiles de permeación en mucosa bucal porcina a 37 ° C para el CHL y sus complejos de inclusión	105
Gráfica 18.- Cantidad de CHL que se retuvo en la membrana bucal porcina por unidad de área de cada una de las permeaciones realizadas	115

LISTA DE ANEXOS

	Página
<i>Anexo i</i> Curva de calibración de CHL en mezcla buffer de fosfatos – pH 7.4-metanol (80:20)	132
<i>Anexo ii</i> Curva de calibración de CHL solución de HE β CD al 5 % en mezcla buffer de fosfatos pH 7.4– metanol (80:20) previo contacto con mucosa bucal 8 horas	134
<i>Anexo iii</i> Curva de calibración de CHL en mezcla buffer de fosfatos pH 7.4–metanol (80:20) previo contacto con mucosa bucal 24 horas	136
<i>Anexo iv</i> Prueba de ANADEVA para la comparación de las pendientes en las cinéticas de degradación de CHL en presencia de diferentes concentraciones de HE β CD 23° C	138
<i>Anexo v</i> Prueba de ANADEVA para la comparación de las pendientes en las cinéticas de degradación de CHL en presencia de diferentes concentraciones de HE β CD 37° C	139
<i>Anexo vi</i> Ficha técnica de la 2-hidroxi-etil- β -ciclodextrina (HE β CD) de acuerdo a proveedor	140
<i>Anexo vii</i> Conversión e hidrólisis del clorambucilo (CHL) para comparación con sus complejos de inclusión	141
<i>Anexo viii</i> Tratamiento de datos: permeaciones a través de mucosa bucal porcina de CHL y sus complejos de inclusión	144
<i>Anexo ix</i> Prueba de ANADEVA para la comparación de la cantidad máxima acumulada (C.M.A.) por unidad de área para las permeaciones a través de mucosa bucal porcina	146

	Página
<i>Anexo x</i> Prueba de ANADEVa para la comparación del flujo obtenido en las permeaciones a través de mucosa bucal porcina	147
<i>Anexo xi</i> Prueba de Tukey para establecer entre cuales tratamientos existe diferencia significativa de la cantidad máxima acumulada obtenida en las permeaciones a través de mucosa bucal porcina	148
<i>Anexo xii</i> Prueba de Tukey para establecer entre cuales tratamientos existe diferencia significativa del flujo obtenido en las permeaciones a través de mucosa bucal porcina	149

1. INTRODUCCIÓN

Es conocido para los profesionales en el ámbito químico la teoría que en palabras simples dice: "Igual disuelve a igual", refiriéndose a la polaridad y el carácter de los solventes para poder estar en solución. Con los compuestos en estado sólido pasa lo mismo al querer ponerlos en solución, se requiere que ambos posean la misma polaridad; lo anterior nos deja vislumbrar los problemas que siempre se han tenido con moléculas, compuestos y/o fármacos de carácter lipídico que son no polares y por tanto hidrofóbicos para la formulación y biodisponibilidad de éstos.

En su mayoría, los fármacos, al ser formulados, requieren ser puestos en solución, o por lo menos, ser mojados para llevar a cabo cierto tipo de procesos, y como sabemos, el solvente universal es el agua. Los fármacos de carácter lipídico encuentran como primer obstáculo su incorporación al solvente polar y por tanto la formación de los enlaces como puentes de hidrógeno. Para ello se han buscado maneras alternativas de incluir fármacos lipofílicos al solvente acuoso mediante la utilización de diversos métodos, técnicas, excipientes e incluso por la incorporación de otros fármacos.

Las ciclodextrinas son frecuentemente consideradas como un nuevo grupo de excipientes farmacéuticos de los cuales se tiene conocimiento desde hace 100 años. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos formados por un número variable de residuos de α -D glucopiranososa unidos por enlaces alfa 1-4, poseen una cavidad central relativamente hidrofóbica y una superficie externa hidrofílica. (1)

En la actualidad un gran número de fármacos han mejorado sus propiedades así como su estabilidad en solución acuosa como resultado de su complejación con ciclodextrinas.

El presente trabajo es un estudio de los efectos de la 2-Hidroxi Etil Beta Ciclodextrina (HE β CD) sobre la solubilidad y estabilidad del Clorambucilo (CHL) en solución acuosa y en estado sólido.

El CHL es un fármaco antineoplásico, citotóxico utilizado en el tratamiento de enfermedades asociadas con la proliferación de células blancas de la sangre (leucocitos) tales como linfomas foliculares, el síndrome de Hodgkin y carcinoma en los ovarios. El CHL es un fármaco liposoluble, con un bajo punto de fusión y muy inestable en agua. Por estas características se busca mejorar la estabilidad, solubilidad y biodisponibilidad del fármaco en cuestión por medio de la complejación con la HE β CD.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 CICLODEXTRINAS

2.1.1 Generalidades de las Ciclodextrinas (CDs)

Las CDs son producidas a partir del almidón por la enzima CGTasa ciclodextrin-glicosiltransferasa mediante un proceso descubierto en 1891 por A. Villiers. Las estructuras de las ciclodextrinas fueron elucidadas por Schardinger entre 1903 y 1911 por ello a veces se les llama Schardinger ciclodextrinas.

Las CDs son macromoléculas formadas por un número variable de residuos de α D (+) glucopiranosos unidos mediante enlaces alfa 1-4. Las más utilizadas son las alfa, beta y gamma CD que contienen 6, 7 y 8 moléculas de glucopiranosos (Figura 1). Son muy hidrofílicas en su parte externa, pero en el interior de su estructura la cavidad de las CDs es apolar, por lo que son capaces de formar complejos de inclusión con distintos tipos de moléculas que se alojan en su interior. La mayoría de las aplicaciones de las CDs en la industria están encaminadas a mejorar las características del producto terminado (solubilidad, caracteres organolépticos) y a incrementar la estabilidad de los compuestos lábiles. La formación de complejos de inclusión incrementa la selectividad y la sensibilidad de la mayoría de los métodos analíticos. (1)

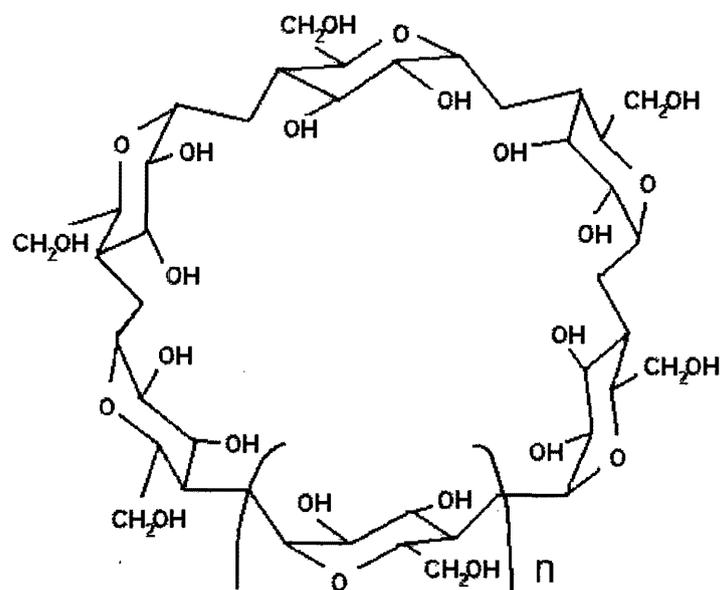


Figura 1. Estructura química de las ciclodextrinas, en donde el valor de n en las α -CDs es igual a 1; en las β -CDs $n = 2$ y en las γ -CDs $n = 3$. (1)

Las CDs α , β y γ son las llamadas CDs nativas o naturales y existen también CDs llamadas no nativas que surgieron por la necesidad de mejorar algunas propiedades de las CDs nativas por ejemplo la pobre solubilidad en solución acuosa de la β CD y así mismo disminuir su toxicidad en aplicaciones parenterales. Los grupos hidroxilos de las CDs son un buen punto para iniciar la modificación por incorporación de varios grupos funcionales; algunos de ellos son grupos alquilados como metil, etil, propil; hidroxialquilados como hidroxietil e hidroxipropil; CDs sulfo alquiladas; polímeros de CDs y CDs ramificadas. (2)

Las sustituciones en las moléculas de las CDs transforman las CDs cristalinas a mezclas amorfas que son los derivados isoméricos, de aquí el incremento dramático de la solubilidad en solución acuosa. (3)

2.1.2. Propiedades Físicoquímicas de las Ciclodextrinas

Peso molecular

De manera general y sin sustituyentes los pesos son los siguientes:

α CDs 972

β CDs 1135

γ CDs 1297

Características físicas de las Ciclodextrinas

Tabla 1. - Características Físicas de las CDs en general. (4)

Característica	Ciclodextrinas		
	α	β	γ
Diámetro de la cavidad (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Altura externa de la CD (Å)	7.9	7.9	7.9
Diámetro del perímetro (Å)	14.6	15.4	17.5
Volumen aprox. de la cavidad (Å ³)	174	262	472
Volumen que cabe dentro la cavidad expresado:			
Por mol de ciclodextrina (mol)	104	157	256
Por gramos de ciclodextrina (g)	0.1	0.14	0.20

Estructura molecular

La relativa naturaleza rígida de la estructura cíclica obliga al grupo hidroxilo primario y secundario a oponerse a los bordes de la cavidad con los restantes enlaces: C-H, C-C y C-O-C cubriendo así el interior de la cavidad. Estas características estructurales imparten el carácter hidrofílico e hidrofóbico del exterior y el interior de la cavidad respectivamente y son los responsables de la solubilidad en agua de las CDs así como de su capacidad para encapsular moléculas hidrofóbicas dentro de sus cavidades. (5)

Solubilidad

α CDs, β CDs y γ CDs tienen solubilidades en agua alrededor de 12.8 %, 1.8% y 25.6% (peso / volumen) respectivamente a temperatura ambiente.(5)

Higroscopicidad

α CDs, β CDs y γ CDs tienen un contenido de humedad de equilibrio de alrededor 10.2%, 14.5% y 17.7% respectivamente. Los niveles de humedad corresponden aproximadamente a los niveles característicos encontrados en los almidones de los que provienen. (5)

Estabilidad Química

Las CDs originalmente fueron denominadas como celulosinas y ciertamente su similitud con la celulosa les da una relativa resistencia a la hidrólisis. Son más resistentes a la hidrólisis ácida que el almidón, mientras que ácidos fuertes como el sulfúrico o el ácido clorhídrico pueden hidrolizarlas. El grado de hidrólisis depende de la temperatura, de la concentración y del tipo de ácido. Las CDs no son típicamente hidrolizadas por ácidos débiles como los ácidos orgánicos. No se ha encontrado inestabilidad en las bases por el contrario son estables en ellas. (5)

Estabilidad Térmica

La estabilidad térmica de las CDs es mucho mayor que la del almidón. Se han observado dos picos endotérmicos para las α CDs, β CDs y las γ CDs cuando se han analizado por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). El primer pico ocurre aproximadamente a 100 ° C debiendo ser la evaporación del agua; el segundo pico se presenta alrededor de los 300 ° C que corresponde simultáneamente a la fusión y descomposición de la CD. En contraste los termogramas obtenidos de almidones típicos exhiben picos adicionales correspondientes a los cambios en la estructura secundaria y terciaria de las moléculas de almidón. En la Figura 2 se muestra un termograma de succinato de almidón obtenido por DSC. (5)

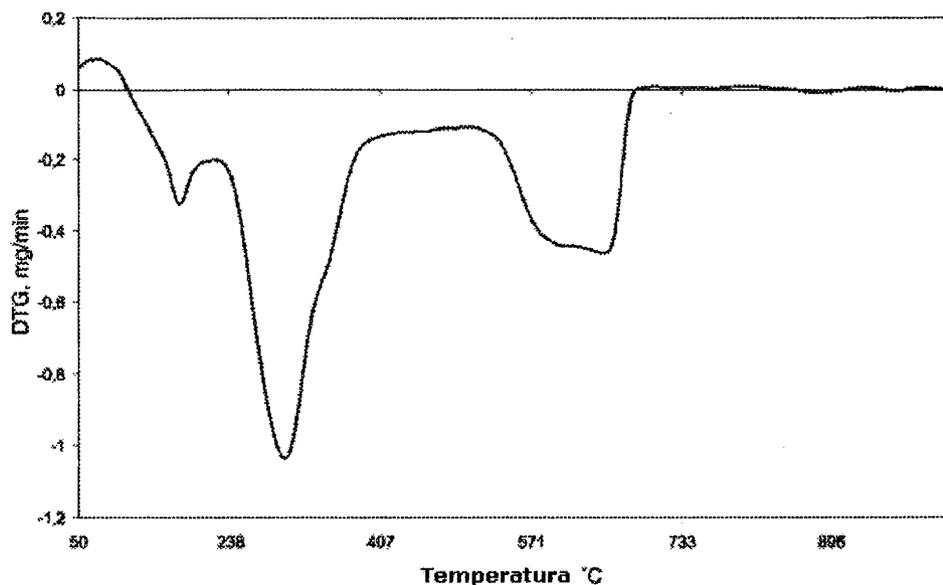


Figura 2. Termograma obtenido a partir de succinato de almidón de papa. Muestra el perfil calorimétrico que siguen la mayoría de las CDs. (6)

2.1.3. Las Ciclodextrinas como excipientes innovadores

Las CDs han sido usadas para formar complejos de inclusión con una gran variedad de moléculas de fármacos resultando una mejor solubilidad y por tanto mayor estabilidad. Esto influye en la disolución y la biodisponibilidad del fármaco para tener opciones más viables para su formulación y su administración. Los complejos de inclusión con CDs son utilizados también para enmascarar sabores desagradables de los principios activos o excipientes.

La liberación controlada de los fármacos encapsulados es muy importante en la disponibilidad de ingredientes activos en su sitio de acción y un aspecto muy importante en el desempeño de las CDs es que pueden controlar la liberación del fármaco que tienen encapsulado.

En general hay tres métodos que se aplican para la liberación controlada: la acelerada (rápida), la retardada (sostenida) y la provocada (selectiva). Para ello son utilizados diferentes tipos de CDs y derivados que frecuentemente facilitan alcanzar un control óptimo o el deseado en la liberación del fármaco. (2)

2.1.3.1. Aplicaciones de las Ciclodextrinas

Farmacéutica (8)

Una de las aplicaciones clásicas de las CDs es en el campo farmacéutico. Las industrias en este rubro se ven siempre en la necesidad de obtener o patentar nuevas formulaciones por dos aspectos principales: por propiedades físicas inadecuadas en ingredientes activos nuevos y para la reformulación de fármacos ya existentes. Las CDs ofrecen ventajas significativas sobre otros excipientes. Los complejos formados con los ingredientes activos pueden estabilizarse, incrementar su solubilidad, su biodisponibilidad y disminuir sus efectos adversos.

Las CDs actúan como un sistema de liberación para los fármacos y son un buen candidato para la liberación de algunos de ellos, por la habilidad que tienen de alterar las propiedades físicas, químicas y biológicas de las moléculas del fármaco por medio de la formación de complejos de inclusión. Su bioadaptabilidad y sus características multifuncionales hacen de ellas sustancias apropiadas para modificar propiedades indeseables en las moléculas del fármaco en varias rutas de administración: oral, rectal, nasal, ocular, transdermal y dermal.

Sistemas de liberación poliméricos, como las microesferas, nanoesferas y los filmes poliméricos formando complejos no covalentes con un determinado número de fármacos han sido desarrollados para su aplicación farmacéutica, haciendo que el fármaco tenga una liberación sin la alteración de sus propiedades fisicoquímica. Las CDs y sus derivados hidrofílicos son descritos como solubilizadores capaces de incrementar la capacidad de carga de liposomas y microparticulas.

Las CDs han jugado un rol vital en la formulación de fármacos para el tratamiento del cáncer. Se han realizado estudios del efecto de las CDs sobre la estabilidad física de la mitomicina C, un fármaco anticancerígeno muy usado el cual causa problemas dermatológicos severos después de su inyección. En un intento por reducir la necrosis de la piel se realizó la complejación de mitomicina C con ciclodextrinas obteniéndose buenos resultados.

Además de fármacos, diferentes péptidos y proteínas, oligosacáridos y oligonucleótidos han sido también liberados por la formación de complejos de inclusión con CDs ya que estas son capaces de interactuar con las membranas celulares y promover el paso a nivel celular. El uso más reciente de las CDs está basado en su habilidad de liberar agentes genoterapéuticos tales como los plásmidos, vectores virales y constructores antisentido. La estabilidad *in vitro* de las moléculas antisentido se ve incrementada dos a tres veces por la unión con CDs como la hidroxipropil β CD, además se incrementa el transporte celular de los constructores antisentido por la β CD hidroxialquilada y esto se ha notado en las células T de la leucemia H9 en humanos. Ciertamente las CDs modulan la distribución intracelular o la actividad de las moléculas antisentidos y pueden ser usadas para revertir la arteroesclerosis. Las CDs son también utilizadas en el desarrollo de formulaciones que incrementan la estabilidad física de vectores virales en la terapia génica por la suspensión de *adenovirus* y virus adeno asociados en las soluciones de CDs, carbohidratos complejos y varios surfactantes.

Bioconversión y Fermentación (8)

La eficiencia de procesos de bioconversión y la fermentación a menudo son restringidas por inhibición o por influencias tóxicas provenientes del sustrato o de un producto sobre la biocatálisis. Otro problema comúnmente encontrado en la biocatálisis es que ésta es más activa en un ambiente natural, usualmente en un medio acuoso, mientras que la vasta mayoría de los sustratos orgánicos son lipofílicos y pobremente solubles en agua; en consecuencia solo una cantidad limitada de sustrato es accesible para la biocatálisis.

Una alternativa cercana consiste en la adición de CDs en la bioconversión o en la fermentación a mitad del proceso.

Las CDs tienen una combinación de propiedades tales como: incrementar la solubilidad de compuestos orgánicos, reducir la toxicidad por complejación con toxinas y la biocompatibilidad. En el proceso de la transformación microbiana de colesterol a androst-4-eno-3,17-diona se encontró que la presencia de β CD, incrementa hasta en un 90 % la constante de solubilidad y bioconversión. En ausencia de CDs la bioconversión sufre una inhibición del producto y degradación de los núcleos de carácter esteroideo y solamente un 40 % del colesterol fue convertido a producto. Singer et al. (9) estudió la transformación microbiana de esteroides en presencia de tres β CD modificadas, por la reducción de androsterona a testosterona por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y notaron que la bioconversión fue incrementada en la presencia de hidroxipropil β CD de 27 % a 78 %, así mismo la solubilidad del esteroide fue mayor en la solución cuando estaba presente el complejo con las CDs modificadas.

En procesos de fermentación las β CDs han mostrado estimular la producción de la linkacidina que pertenece a un grupo de antibióticos. Su producción se incrementa al encontrarse el medio enriquecido con CD y así proliferar el crecimiento de *Streptomyces* sp. Un efecto similar de estimulación por medio de CDs fue observado en la biotransformación de aldehídos aromáticos a alcoholes aromáticos por las células de *S. cerevisiae*. Este también mostró que las CDs no solamente incrementan la solubilidad en solución acuosa de sustratos lipofílicos sino que también se disminuyen significativamente la influencia inhibitoria de factores ambientales para evitar la producción del antibiótico.

Para proteger un producto de la fermentación en caldo, la invariabilidad involucra la separación de éste a partir de solución acuosa diluida y la habilidad de las CDs para formar complejos insolubles con productos que fueron investigados para la separación selectiva de la fermentación del caldo de *Clostridia*. Las CDs son una posibilidad potencial para el proceso de fermentación ya que aparte de incrementar la solubilidad en solución acuosa de los sustratos lipofílicos reducen la toxicidad en el medio de fermentación; las CDs también son utilizadas en la

preparación de medios de cultivo sólidos y líquidos para el crecimiento de *Helicobacter pylori* reemplazando a la sangre y otros derivados del medio.

Ambiental (8)

La CDs juegan un rol importante en las ciencias ambientales en términos de solubilización de contaminantes orgánicos, enriqueciendo y removiendo contaminantes orgánicos y metales pesados de los aceites, del agua y de la atmósfera. Así también las CDs son usadas para eliminar efluentes gaseosos de industrias de químicos orgánicos.

En el tratamiento de aguas

Las CDs son aplicadas para incrementar la estabilidad, la encapsulación y la absorción de contaminantes. Usando CDs, sustancias altamente tóxicas pueden ser removidas de efluentes por la formación de complejos de inclusión. Las aguas de desecho contienen compuestos aromáticos inaceptables provenientes del medio ambiente tales como: fenol, *p* clorofenol, y benceno que después de ser tratados con β CD sus niveles son reducidos considerablemente con respecto a los niveles iniciales.

En contaminación por olor

La (-) geomisina y (+)-2-metil isoborneol son dos de los principales componentes responsables del desagradable olor encontrado en la vecindad o proximidad de plantas procesadoras de aguas. Los intentos por eliminar estos por medio de oxidación, filtración y procesos de degradación biológica fueron parcialmente efectivos considerando a las CDs y sus derivados demostraron tener un mejor desempeño para estos compuestos altamente hidrofóbicos.

Con Insecticidas

En el licor esencia de los insecticidas con triclorfon, la fracción no recristalizable de éste puede ser convertida en un complejo con β CD y con un tratamiento sencillo el 90 % de este material tóxico es

removido. El fenómeno de incremento en la solubilidad por las CDs es usado para la prueba de remediación de aceites. Reid et al. (10) estudiaron esta prueba en aceites para determinar la biodisponibilidad de contaminantes usando CD y sus derivados, mientras que Fava estudió la posibilidad de incrementar la bioremediación intrínseca *ex-situ* de un aceite contaminado crónicamente por medio del uso hidroxil propil β CD y de γ CD. La complejación resultó en un incremento de la solubilidad en agua de tres tipos de Benzimidazoles como fungicidas (Tiabendazole, carbendazim y fuberidazol).

Otro rol importante de las CDs en la protección del ambiente es el uso en la formulación de insecticidas, son usadas en la preparación de un insecticida proveniente del extracto de una semilla por la formación de complejos de inclusión solubles en agua. El extracto de la semilla contiene azadiractina A complejada en una molécula de CD.

Catalítico (8)

Se aplican en reacciones de catálisis por su habilidad para servir como enzimas. Estas son formadas por una modificación natural ocurrida a través de la sustitución de las CDs con varios grupos funcionales sobre la superficie primaria o secundaria de la molécula o por ataque de grupos reactivos. Estas modificaciones en las CDs ocurren usualmente en un proceso parecido al de las enzimas por el fenómeno de reconocimiento molecular que se atribuye a la sustitución de grupos funcionales sobre la CD. Los resultados muestran un incremento en la facilidad de unión de sustratos en la cavidad hidrofóbica con la subsecuente iniciación de la reacción de catálisis de los grupos unidos a la CD. Los efectos estéricos, juegan también un papel significativo en los procesos de biocatálisis por el incremento de la enantioselectividad de las moléculas químicas. Después de la formación de los complejos de inclusión, la vía de ataque preferida por los agentes a reaccionar toma lugar solamente por una de las caras afines, resultando en una mayor unión. Esto fue reportado por Kamal et al. (11) en la hidrólisis de ésteres racémicos arilpropiónicos por BSA, una proteína acarreadora, resultando en menor enantioselectividad (50–81 %) mientras que con la

adición de β CD a esta reacción no solamente se incrementó la enantioselectividad (80-90%) sino que también se aceleró el rango de hidrólisis.

El efecto de las CDs en la actividad catalítica en algunas reacciones es precisamente por la protección para que no se lleve a cabo la catálisis por medio de la inclusión. Puede ser por cualquiera de los dos caminos siguientes: por inhibición completa de la reacción o por causar un incremento marcado en la actividad catalítica. Granados y de Rossi (12) encontraron que las CDs inhiben fuertemente la catálisis intramolecular de la hidrólisis de las amidas así como cambian la geometría del sustrato para la interacción de los grupos carboxílicos y amida con los hidroxilos del cerco de la CD.

Analítica (8)

Las CDs son extensamente usadas en las separaciones porque tienen la capacidad de discriminar entre isómeros de posición, grupos funcionales, homólogos y enantiómeros. Esta propiedad hace de ellas uno de los agentes más usados en un gran número de separaciones. El fundamento es de nuevo la formación de complejos de inclusión con moléculas hidrófobas pequeñas. Factores que influyen en la separación son: la forma, el tamaño y la selectividad de la CD.

Las CDs originales están cubiertas por grupos hidroxilos primarios y secundarios y sus derivados. Estos grupos reaccionan con grupos hidrofóbicos (metil, propil) e hidrofílicos (sulfatos, fosfatos y aminas secundarias): son usadas extensamente en HPLC como fases estacionarias unidas a un soporte sólido o como aditivos en la fase móvil tanto en HPLC como en electroforesis capilar para la separación de compuestos.

Alimenticia (8)

Se han encontrado numerosas aplicaciones en la industria alimenticia ya que forman complejos de inclusión con grasas, sabores y colorantes. Son usadas para remover y enmascarar

componentes indeseables y controlar la liberación de componentes deseables en la comida. La mayoría de los sabores naturales y artificiales son aceites o líquidos volátiles y la complejación con CDs les provee una alternativa para los procesos convencionales de encapsulación diseñados para la protección de sabores.

Así mismo la complejación de CDs con agentes edulcorantes tales como aspartame estabiliza y mejora el sabor. Esto también elimina el sabor amargo que queda después de probar otros edulcorantes como esteviosida, glicirizina y rubusosida; de hecho las CDs por sí mismas se ven como nuevos edulcorantes.

El uso más prevalente es en el proceso de remoción del colesterol de algunos productos de origen animal como huevo, y derivados de la leche. Los productos tratados con CDs muestran un 80 % de colesterol removido.

Cosméticos, artículos de tocador y cuidado personal (8)

La preparación de cosméticos es otra área de gran demanda para CDs principalmente en la supresión de la volatilidad de los perfumes, aromatizantes del hogar y detergentes por medio del control en la liberación de las fragancias a partir de los complejos de inclusión. La interacción del hospedero con la CD produce una barrera de alta energía para vencer la volatilidad produciendo así fragancias más duraderas. El uso de los complejos CD- fragancias en preparaciones de la piel, como talcos; estabiliza la fragancia contra la pérdida por evaporación y oxidación por un largo periodo.

Los mayores beneficios en este sector se muestran en la estabilización, en el control de olores, en los procesos de conversión de un ingrediente líquido a sólido, protección y liberación del sabor en labiales, la solubilidad en agua y la estabilidad térmica de aceites. Algunas otras aplicaciones incluyen su uso en pastas dentales, cremas para la piel, suavizantes líquidos y sólidos, toallas sanitarias, papel de baño, etc.

Los compuestos a base de CDs son también usados en varios productos cosméticos para reducir los olores corporales. El polvo seco de la CD es menor a 12 micras y son usados para el control del olor en toallitas, pañuelos desechables, productos menstruales como toallas sanitarias así también en el cuidado del cabello para la reducción de la volatilidad de los mercaptanos.

Se usan también en base de sílica en pastas dentales para incrementar la biodisponibilidad del Triclosan (un antimicrobiano) encontrándose que después de la formación del complejo de inclusión la biodisponibilidad se incrementa al triple.

En la industria textil y de empaquetamiento (8)

Finalmente la industria textil es otra área en la cual las CDs están incrementando su uso. Por ejemplo Wacker-Chemic (el más grande productor en el mundo de γ -CDs) ha activado por medio de un ataque covalente, derivados de CD con Monoclorotriacilil (MCT) que es un sustituyente de fibras. Esta sustitución con CD provee excelentes acabados textiles en algodón y lana, y favorece el mezclado de los materiales. Las CDs han sido también incorporadas en las fábricas para atrapar y enmascarar malos olores provenientes del sudor y del humo del cigarro. Son utilizadas también en fabricas dedicadas a teñir, para incrementar el aprovechamiento del tinte y reducir la pérdida de éste en el proceso de lavado con agua. Por otra parte utilizando derivados hidrofóbicos de β -CDs la unión de tintes fluorescentes a las fibras de poliéster se incrementa al triple.

Las CDs suelen jugar un papel muy importante en la industria de empaquetamiento. Complejos de inclusión con CDs que contienen un agente antimicrobiano así como agentes volátiles, están cubiertos por una capa que absorbe el agua gracias a la unión con una resina natural, sistema que es utilizado para envolver productos frescos (como alimentos). Se encontró también que en el empaquetamiento de comida, bolsas fabricadas usando CDs con un copolimero de etileno-tetraciclo-3-dodecano e hinokitol muestran buenas propiedades antimicóticas y no presentan olor después de

permanecer una semana almacenadas a temperatura ambiente, lo cual demuestra la utilidad en el empaquetamiento de materiales alimenticios.

2.2 CLORAMBUCILO

2.2.1 Características y Propiedades Físicoquímicas del Clorambucilo (CHL)

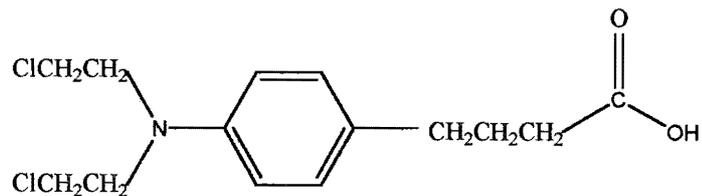
El CHL es un fármaco alquilante antineoplásico, anticancerígeno derivado de las mostazas nitrogenadas, utilizado en el tratamiento del linfoma linfocítico crónico y de los linfomas y en el tratamiento de la leucemia; utilizado en el linfoma de tipo Hodgkin benigno. La reacción secundaria es que se puede desarrollar neoplasia y también se puede presentar mielo supresión, náuseas moderadas, caquexia, alopecia.

Propiedades Físicoquímicas

Nomenclatura IUPAC: Ácido p-bis-(2-cloroetil) aminofenilbutírico.

Fórmula Empírica: $C_{14}H_{19}Cl_2NO_2$

Estructura química:



Peso molecular: 304.22 g / mol

Pureza: Contiene no menos del 98 % y no más del 101 % de $C_{14}H_{19}Cl_2NO_2$, calculado en base anhidra.

Descripción: Polvo cristalino blanco, inodoro, insípido.

Solubilidad: Prácticamente insoluble en agua, fácilmente soluble en alcohol (1 parte por 1.5 de etanol), 1 por 2.5 de cloroformo y 1 en 2 de acetona, soluble en éter. (13-14)

Temperatura de fusión: Entre 64 ° C - 69 ° C.

Constante de Disociación: pKa 5.8

Coefficiente de partición: Log P (octanol / pH 7.4), 1.7

Contenido de agua: No más del 5 %.

Residuo de ignición: No más del 0.1 %. (14)

Determinaciones Instrumentales (13)

Espectro UV: En metanol máximos a 258 nm y 303 nm con un coeficiente de absortividad de 642

Espectro Infrarrojo: Principales picos a longitudes de onda de 1695, 1610, 1520, 1270, 1229, 1175.

Espectro de masas: Principales picos a m/z 45, 63, 118, 254, 255, 256, 303, 305.

Cuantificación por Cromatografía de Gases –Espectrometría de Masas: En plasma la sensibilidad es < 10 ng/ml

Cuantificación por Cromatografía de líquidos de alta resolución: En plasma la sensibilidad es de 100 ng/ml por medio de detección UV.

Cuantificación y/o caracterización por Cromatografía de capa fina: En un sistemas con fase estacionaria, silica gel G de 250 μm : con fase móvil, cloroformo:acetona 4:1 Rf 33; con fase móvil, acetato de etilo:metanol.solución concentrada de amonio 85:10:5 Rf 06 y con fase móvil, acetato de etilo Rf 40.

Conservación: En recipientes herméticamente cerrados y protegidos de la luz. (14)

2.2.2 Propiedades farmacológicas del Clorambucilo

Farmacocinética y farmacodinamia en humanos:

Después de la administración oral de CHL, las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan entre 40 a 70 minutos después de la misma, el medicamento es bien absorbido a través del tracto gastrointestinal, la absorción que posee es muy eficaz, casi del 100 %. La vida media es de 1.5 horas y su excreción urinaria es baja.

El metabolismo del CHL en el hombre parece ser similar al observado en animales de laboratorio incluyendo la S-oxidación de la cadena lateral del ácido butírico. Su metabolismo es a nivel hepático y el metabolito principal del CHL es una Mostaza Ácida Fenilacética (PAAM) (15) así como el ácido acético, la concentración plasmática máxima del PAAM se presenta de 2 a 4 horas posteriores a la administración del fármaco, y tiene una vida media mayor que el CHL (1 a 2 hrs.), lo que contribuye en forma importante a la actividad alquilante del fármaco. (14)

Vía de administración y dosis: (16)

Como principal vía de administración del CHL se encuentra la vía oral seguida en los últimos años por la administración intravenosa por medio de formulaciones inyectables.

Al utilizarse como agente único, una posología adecuada es de 0.2 mg/kg/día durante 4 a 8 semanas. Sin embargo, por lo general, este agente se utiliza en tratamiento combinado con otros fármacos principalmente con prednisolona y se han empleado diversos regímenes en el tratamiento del linfoma de tipo Hodgkin.

Para el linfoma no Hodgkin: Como monofármaco, la posología habitual inicial es de 0.1 a 0.2 mg/kg/día durante 4 a 8 semanas, seguida de una terapia de mantenimiento, que consiste ya sea en una posología diaria reducida o periodos de tratamiento intermitentes. No existe una diferencia significativa entre la respuesta global obtenida con el CHL como agente único y con la quimioterapia combinada en los pacientes con linfoma linfocítico avanzado del tipo no Hodgkin.

En la Leucemia linfocítica crónica, el tratamiento se inicia una vez que el paciente ha desarrollado la sintomatología, o la evidencia de daño de la función de la médula ósea, mediante el conteo celular en sangre periférica. Inicialmente, se administra en dosis de 0.15 mg/kg/día hasta que el recuento total de leucocitos haya disminuido hasta 10,000/ml. Posteriormente, puede iniciarse un segundo ciclo, cuatro semanas después de terminada la primera fase y continuarse con una posología de 0.1 mg/kg/día.

En algunos pacientes, generalmente después de 2 años de tratamiento, el recuento leucocitario en sangre baja a niveles normales. El bazo y los nódulos linfáticos se reducen a un tamaño prácticamente impalpable y la proporción de linfocitos en la médula ósea disminuye a menos del 20%.

Los pacientes con insuficiencia evidente de la médula ósea deben ser tratados en primer término con prednisolona, y es necesario contar con la evidencia de regeneración medular antes de iniciar el tratamiento con CHL.

En la Macroglobulinemia de Waldenstrom se recomiendan dosis iniciales diarias de 6 a 12 mg hasta que se produzca leucopenia, seguidas por dosis diarias de 2 a 8 mg en forma indefinida.

Para el Carcinoma ovárico utilizándolo como agente único, la posología recomendada es de 0.2 mg/kg/día durante 4 a 6 semanas; también se ha utilizado una dosis de 0.3 mg/kg/día hasta

inducir leucopenia. La dosis de mantenimiento es de 0.2 mg/kg/día con el objeto de mantener el recuento total de leucocitos por debajo de los 4,000/mm³. En la práctica, los tratamientos de mantenimiento tienden a durar entre 2 y 4 semanas, con intervalos de entre 2 y 6 semanas entre cada tratamiento.

En el caso de cáncer avanzado de la mama, utilizado como agente único, la posología recomendada es de 0.2 mg/kg/día durante 6 semanas. Se puede administrar en combinación con prednisolona a dosis de 14 a 20 mg diarios, independientemente del peso corporal, durante 4 a 6 semanas, siempre y cuando no exista depresión hematopoyética grave. Puede también administrarse en combinación con metotrexate, 5-fluorouracilo y prednisolona a dosis de 5 a 7.5 mg/m²/día.

Para tratamiento en niños, el CHL puede usarse en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin y de linfomas no Hodgkin ya que los regímenes de posología son semejantes a los empleados en adultos.

2.2.3 Sistemas propuestos y formas comerciales con Clorambucilo

Formas Comerciales Con Clorambucilo

LEUKERAN*(Clorambucilo)

Laboratorio: GLAXO WELLCOME MEXICO, S. A. de C.V.

Oncológico – TABLETAS 2 mg CHL

(16)

Sistemas propuestos

Formulación:

Principio activo y excipientes	Cantidad
Clorambucilo	3 mg
Lactosa	5 g
Cápsulas rojas n°2	1 cápsula

Envasado: Unidosis

Caducidad: Posee una cuarta parte de la caducidad de la especialidad farmacéutica original Leurekan

Conservación: Temperatura ambiente. Proteger de la luz

(17 y 18)

En España existen comercializadas formas de administración orales de CHL, como comprimidos. Estos contienen lactosa por ello se recomienda especial precaución si padece intolerancia a la leche o a la lactosa.

A nivel experimental existen propuestas de una forma farmacéutica inyectable de CHL con base de buffer de fosfatos pH 7.4.

2.3. COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

Los procesos de complejación conocidos también como solo complejación están basados en la habilidad de muchos fármacos conocidos para interactuar y formar nuevos complejos con propiedades alteradas con respecto al fármaco solo. El campo de la industria y tecnología

farmacéutica es altamente reconocido en la búsqueda y el desarrollo del área de la complejación como una prioridad. Los procesos de complejación ofrecen nuevas posibilidades para la mejora de fármacos existentes (en aspectos como efectos colaterales, acción terapéutica, solubilidad, estabilidad, etc.). (19)

La complejación es uno de muchos caminos que favorecen las propiedades fisicoquímicas de los compuestos farmacéuticos, la cual se puede definir como la asociación reversible de un sustrato y un ligando para formar nuevas especies. Aunque la clasificación de los complejos es algo arbitraria, la diferenciación esta usualmente basada en los tipos de interacción y las especies involucradas, por ejemplo: fármaco-fármaco y fármaco-excipientes, las complejos con metales o metálicos, complejos moleculares, complejos de inclusión y los complejos con compuestos de intercambio iónico.

Las ciclodextrinas están clasificadas como ejemplos de compuestos que forman complejos de inclusión. Este tipo de complejos son formados cuando una molécula llamada "guest" es incluida parcial o totalmente por afinidad estérica, eléctrica, de tamaño; dentro de una molécula hospedera como las ciclodextrinas que poseen enlaces no covalentes en su interior y por afinidad polar incluyen diversos fármacos dentro de ellas(20). El proceso se muestra en la Figura 3.

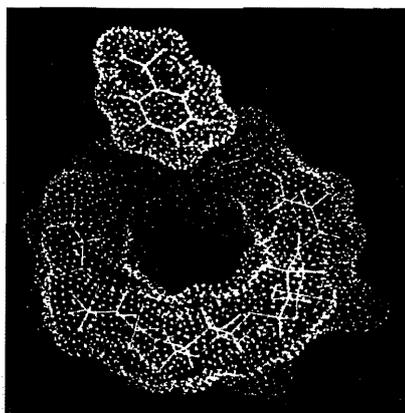


Figura 3. Simulación de proceso de complejación. Obtenido de Frömring and Szejtli. (21)

Cuando los complejos de inclusión son formados, los parámetros fisicoquímicos de la molécula invitada "guest" son disfrazados o alterados mejorando la solubilidad, la estabilidad, el sabor, la biodisponibilidad, etc.

Numerosas CDs tienen la capacidad y la facilidad de complejarse en diferentes formas, lo que requiere una determinación cuantitativa para determinar y evaluar sus propiedades complejantes.

Las CDs forman complejos de inclusión con fármacos hidrofóbicos a través de un proceso de equilibrio que se muestra en la Figura 4 y que se describe cuantitativamente por medio de una constante de asociación o de estabilidad:

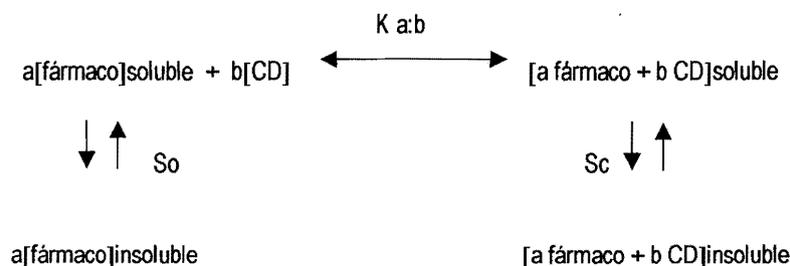


Figura 4. Proceso de equilibrio que describe la interacción entre una CD y una molécula de un fármaco insoluble para formar un complejo soluble o insoluble.(20)

$$K_{a:b} = \frac{[\text{fármaco}^a \text{ CD}^b]}{[\text{fármaco}]^a [\text{CD}]^b} \dots\dots\dots(1)$$

De este proceso se deriva la ecuación 1, en donde a y b representan la fracción molar de la molécula de fármaco secuestrado en la cavidad de la CD y la fracción de CD utilizada. La magnitud de esta constante de asociación puede ser utilizada para comparar la efectividad de las diferentes

CDs para enlazarse. Varios complejos con diferentes relaciones de fármaco y CD pueden formarse, dependiendo del tipo de CD utilizado y las características fisicoquímicas de la molécula del fármaco.

En soluciones diluidas y/o si el fármaco está totalmente dentro de la cavidad de la CD, resultaría un complejo de formación 1:1. Sin embargo si la cavidad es suficientemente grande dos moléculas de fármaco pueden ser albergadas resultando la formación de un complejo 2:1. Recíprocamente si el fármaco es muy grande entonces muchas moléculas de CD pueden adherir al fármaco para la formación de complejos de mayor orden 1:2. (20)

Existen diferentes maneras de comportamiento del fármaco, las CDs y los complejos de acuerdo a sus propiedades, así mismo existen factores que afectan los procesos de complejación como los que se mencionan a continuación:

Efectos Estéricos (20)

Las CDs son capaces de formar complejos de inclusión con compuestos que tengan un tamaño compatible con las dimensiones de su cavidad. La formación de complejos con moléculas relativamente más grandes que la cavidad puede ser posible en casos tales que solo ciertos grupos o cadenas laterales penetran dentro del canal carbohidratado de las CDs. Las tres CDs naturales o nativas α , β y γ tienen diferentes diámetros internos y son capaces de acomodar moléculas de diferente tamaño.

Como consecuencia de la hidrólisis de una o ambas caras de las CD se pueden afectar o impactar los requerimientos estéricos para una molécula huésped "guest" aceptable. La presencia de grupos voluminosos puede bloquear estéricamente la entrada a la cavidad de la CD. Sin embargo algunos grupos dependiendo de su número, flexibilidad y posición de ataque pueden actuar extendiendo la cavidad. La sustitución en las posiciones 3 y 6 puede hacer más estrecha la cavidad, mientras que la sustitución en las posiciones 2 y 6 puede permitir la expansión de la cavidad abierta.

El número de sustituyentes adicionados al anillo puede afectar la unión en ambas maneras positiva y negativamente.

Los sustituyentes hidroxipropilados tienen efecto también sobre el proceso de complejación y los impedimentos estéricos. Se ha estudiado el efecto de la sustitución en las CDs sobre la habilidad de complejarse y se ha observado que menores grados de sustitución de grupos hidroxipropil (de 2 a 5) estimulan más la complejación.

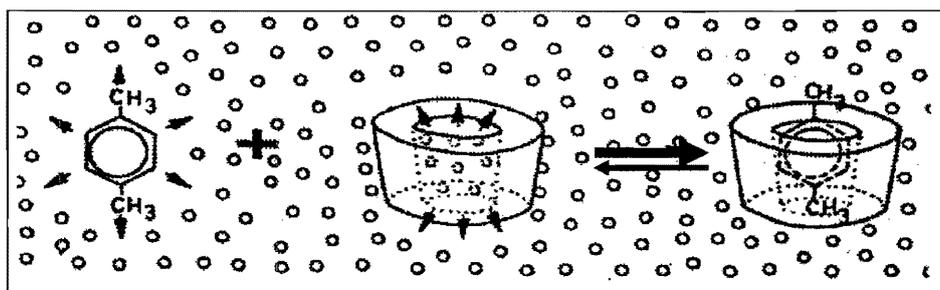


Figura 5. Importancia del acomodo de la molécula "huésped" dentro de la cavidad de la CD.
Obtenido de Frömning and Szejtli. (21)

Existe un gran compromiso entre el impedimento estérico de un sustituyente y la habilidad de éste para incrementar la cavidad hidrofóbica.

Grandes interferencias estéricas pueden ser anticipadas por grandes cargas de grupos éteres sulfoalquilados, sin embargo estas interferencias suelen beneficiar la complejación.

Efectos Electrónicos: (20)

Éstos a su vez se dividen en tres tipos de factores que afectan la complejación.

1. -El efecto de las cargas sobre la cavidad de la CD

Los derivados iónicos que tienen carga muy cercana a la cavidad de la CD son: los carboxilatos, los sulfatos y derivados de sulfonatos.

Los efectos de la proximidad de carga sobre la complejación con CDs fueron evaluados por el estudio de complejación de dos esteroides por medio de derivados de éter como sulfopropil, sulfobutil y un sulfonato. Los efectos electrónicos mostraron ser mayores que los efectos estéricos ya que cuando solamente se había adicionado un sustituyente sulfonato en la posición 6 el derivado había perdido su capacidad para complejarse.

El movimiento de carga fuera de la cavidad re-estabiliza las características de complejación pero esto depende de la densidad electrónica en la estructura.

2. -El efecto de la densidad electrónica.

Como la densidad de carga incrementa en la familia sulfopropil del mono al tetra y hepta aniónico, la unión de moléculas hidrofóbicas decrece. Sin embargo cuando el anión sulfonato se espacia cuatro unidades de metileno más lejos, la densidad de carga no es un efecto adverso para la unión de fármacos con moléculas hidrofóbicas. Los derivados de éter mono, tetra y hepta sulfopropil sustituidos todos muestran habilidades comparables en la unión de este tipo de fármacos y la fuerza de unión es similar a la observada para las β CD nativas.

3. - El efecto de la carga que presenta el fármaco y la CD

Los iones de las CDs son capaces de complejar fármacos hidrofóbicos neutros, si la carga iónica no ataca directamente al carbohidrato en la parte trasera de la CD.

Cuando ambos tanto el fármaco como la CD están cargados, los efectos electrostáticos pueden ser observados.

Experiencias con derivados carboximetilados sugieren que la posición de la carga en la estructura del fármaco puede afectar la interacción con una CD aniónica. Por otro lado una interacción electrostática cooperativa entre fármacos catiónicos y las CDs aniónicas ha sido observada en algunos estudios.

Una diferencia en la complejación de CDs iónicas en comparación con las neutras es en la incapacidad de participar en procesos de complejación de estequiometría 1:2 o 1:3. La carga iónica de las CDs no es efectiva para formar complejos de mayor orden probablemente debido a las repulsiones electrostáticas entre la primera fracción de fármaco secuestrada y la fracción dentro de la CD iónica. Así como incrementa la densidad de carga este efecto repulsivo es aumentado también.

Efectos por temperatura, aditivos y cosolventes (20)

La complejación por inclusión es un proceso de equilibrio y la fuerza de su asociación se ve afectada por la temperatura del sistema. En la mayoría de los casos a medida que la temperatura incrementa, la constante de unión disminuirá. La solubilidad del fármaco en la solución de la CD puede aumentar con un aumento en la temperatura incluso aunque la constante de unión disminuya su valor, porque el incremento en la temperatura proporciona una solubilidad intrínseca al fármaco libre.

Los solventes orgánicos tradicionalmente reducen el proceso de complejación del fármaco con la CD por competencia para ocupar la cavidad hidrofóbica. Estos también reducen la solubilidad de la mayoría de las CDs y sus complejos. Recientemente Loftsson et al. y Redenti et al. han reportado el uso de polímeros solubles en agua e hidroxí ácidos, respectivamente, con la finalidad de incrementar la complejación fármaco-CD y proporcionar así mejores efectos de solubilidad por medio de la formación de complejos.

2.3.1. Preparación de Complejos de Inclusión

Métodos para la formación de los complejos

Proceso de liofilización

Se prepara una solución acuosa en cantidades equimolares del fármaco y la CD. La mezcla se coloca en el aparato de ultrasonido para eliminar todo el aire, promover la formación del complejo y aclarar la solución. Esta mezcla se mantendrá dentro del aparato el tiempo necesario a temperatura ambiente o bien a una temperatura que de acuerdo a las propiedades del fármaco y de la CD utilizada favorezca el proceso de complejación.

Posteriormente se filtra la solución directamente en un contenedor especial para liofilización, estableciendo la temperatura de enfriamiento de -20°C y procediendo a liofilizar durante 16 horas. Una vez formada la pastilla, ésta se retira del vaso y se guarda el complejo etiquetado y sellado.

Amasado

Se coloca una cantidad conocida de CD en un mortero, se moja con agua o ya sea con etanol y en el mejor de los casos con una mezcla hidro-alcohólica, se comienza a amasar hasta obtener una pasta, posteriormente es agregada una cantidad equimolar del fármaco y se continúa amasando hasta que se perciba una masa homogénea señal de que se ha formado el complejo.

Por adición de alcoholes:

Adicionar alcohol, promueve la formación del complejo en estado sólido o semisólido. Los fármacos ionizados usualmente forman complejos con CD más estables. Para mejores resultados se hacen mezclas alcohol agua para adicionar en ellas el fármaco y la CD; en el caso del etanol la mezcla es en una proporción de 50:50 y cuando se utiliza metanol - agua la mezcla es 60:40.

Coprecipitación

Este método de formación de complejos comprende la mezcla en cantidades equimolares de la CD disuelta en etanol con el fármaco en solución acuosa colocando un exceso de éste. Al ponerse en contacto ambas sustancias se tiene que mantener agitación constante y si es necesario un ligero incremento de la temperatura como estímulo para formar el complejo.

Posteriormente la mezcla se retira de la parrilla, se deja enfriar a temperatura ambiente, después de ello se cierra herméticamente el frasco donde se va a contener y se deja enfriar durante tres días en un rango de temperatura de 4-8 ° C.

Coevaporación:

Cantidades equimolares de fármaco y CD son colocadas en viales, en soluciones alcohólicas: metanol o etanol. Se adiciona primero la CD, que por no ser tan soluble en estos solventes necesita un poco de agitación hasta su incorporación, posterior a ello se agrega el fármaco y se sigue agitando hasta percibir de manera visual que ambos compuestos se han solubilizado.

Estos viales sin tapón, son colocados en un desecador con sílica para lograr la evaporación y/ o deshidratación del medio, a una temperatura óptima para la formación del complejo, en función del fármaco y la CD.

Agitación continua

El fármaco a trabajar y la CD son mezclados en proporciones de 1:1, 1: 2, 1: 3, 1: 4 relación peso/peso. Cada una de las mezclas será colocada en un tubo para centrífuga y se centrifugan a una velocidad de 50 rpm en rangos de 6 horas y si es posible de 12. Será introducida en la centrífuga una mezcla del fármaco sola, que estará sujeta a comparación. (22)

2.3.2. Caracterización de los Complejos

2.3.2.1. Diagramas de solubilidad de Higuchi y Connors para complejos de inclusión

Diagramas de Solubilidad: (20 y 23)

Uno de los métodos comunes para determinar las constantes de asociación y la estequiometría de los complejos, es mediante los diagramas de solubilidad. Para realizar los diagramas se realiza la siguiente técnica: Se adicionan cantidades iguales en peso (colocando un exceso considerable sobre su solubilidad) del compuesto que va a ser complejado en varios viales, entonces un volumen constante de solvente se adiciona a cada contenedor, sucesivamente cantidades crecientes del agente complejante son adicionadas a los viales. Estos son cerrados para alcanzar el equilibrio de la solubilidad, mediante agitación y temperatura constante. Entonces las soluciones son analizadas para determinar el contenido total de soluto soluble.

Un diagrama de fases de solubilidad es construido al graficar concentraciones molares de soluto disuelto en el eje vertical (ordenadas) contra la concentración del agente complejante en el eje horizontal (abscisas).

De acuerdo a la clasificación de diagramas de solubilidad de Higuchi y Connors se obtienen diferentes tipos de diagramas para la solubilidad de un compuesto. Pero solo dos tipos de perfiles son generados, en general, los diagramas del tipo A y el tipo B. (Figura 6)

Diagramas del tipo A:

En los cuales la solubilidad del sustrato aumenta con el incremento de la cantidad del ligante o agente complejante indicando la formación de un complejo soluble entre el sustrato S y el ligando L. Un diagrama del tipo A_L está representado por un incremento lineal, mientras que diagramas del tipo A_N y A_P están representados por curvaturas negativas y positivas respectivamente en la línea correspondiente al comportamiento de los diagramas del tipo A_L .

Los diagramas del tipo lineal son formados cuando cada complejo contiene solamente una molécula de agente complejante. Cuando más de una molécula de agente complejante se encuentra en el complejo se obtiene un diagrama del tipo A_p . Diagramas del tipo A_N son poco comunes pero pueden resultar si se presenta una auto-asociación o si altas concentraciones del agente complejante causan alteraciones en la naturaleza del solvente.

Diagramas del tipo B:

Son observados cuando se forman complejos insolubles. El segmento xy en la curva de B_S muestra la formación de un complejo que incrementa la solubilidad total del compuesto así que el diagrama B_S es idéntico en la primera parte de su curva a los diagramas de tipo A; la solubilidad del sustrato incrementa con la formación de un complejo soluble entre el sustrato y el ligando. Entonces el límite de solubilidad es alcanzado ya que este complejo precipita y la solución se ve supersaturada, sin embargo en el punto y la solubilidad del complejo se alcanza, en y el compuesto adicional comienza a estar en solución, provocando que algo de complejo sólido precipite. Para el punto z todo el exceso de compuesto sólido adicionado a los viales ha sido consumido por el proceso. El diagrama tipo B_I es interpretado en la misma manera, con la diferencia de que el complejo formado es algo insoluble y el comportamiento inicial de la solubilidad que se muestra en el diagrama B_S no es detectable.

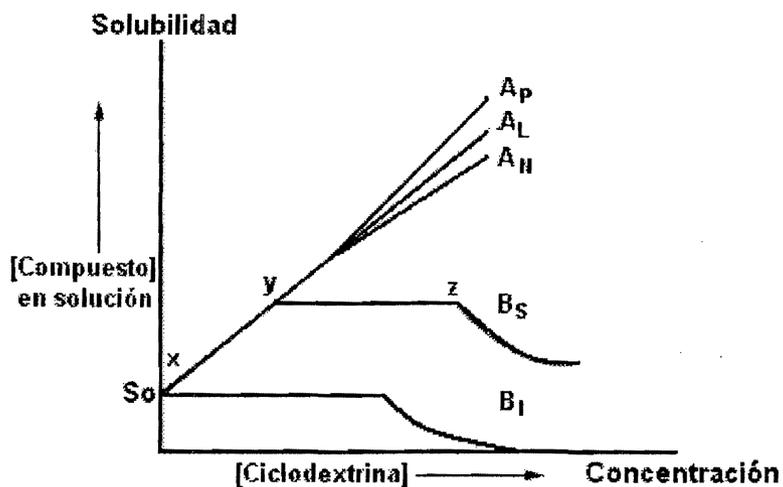


Figura 6. Diagramas de solubilidad de fases. (20)

La estequiometría de los complejos puede ser determinada frecuentemente por las porciones ascendentes y descendentes de estos diagramas y se pueden hacer algunas suposiciones.

Si un complejo de estequiometría 1:1 es formado, la constante de asociación k_a : b puede ser determinada a partir de la pendiente en la porción lineal inicial de la curva de fases de solubilidad así como la solubilidad intrínseca del compuesto S_0 usando la ecuación 2.

$$K_{1:1} = \frac{\text{Pendiente}}{S_0(1-\text{Pendiente})} \dots\dots\dots(2)$$

2.3.2.2. Espectrofotometría, Calorimetría Diferencial de Barrido, Microscopía Electrónica de Barrido, Espectroscopía infrarrojo y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

Espectrofotometría UV/VIS

Si la complejación causa un cambio en el espectro de absorción de la molécula "huésped" la espectrofotometría UV/VIS es un método muy utilizado para determinar complejos de inclusión.

Generalmente los cambios en el espectro observados son similares a los efectos causados por cambios en la polaridad del solvente, sugiriendo que el cromóforo de la molécula a incluir es transferido de un medio acuoso a la cavidad no polar de la CDs. Estos cambios pueden ser debidos a la perturbación de los niveles de energía electrónica del "huésped" causadas por interacción directa con la CD, por la exclusión de las moléculas de agua solvatada o por una combinación de los dos efectos. Aunque frecuentemente solo pequeños efectos son observados sobre el espectro UV de las moléculas incluidas, el método es comúnmente usado para la determinación de complejos de inclusión. (2)

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) (24)

Los complejos de inclusión formados por fármacos y CDs son generalmente preparados en un medio acuoso, por lo que podrían entonces ser considerados como sistemas ternarios agua / CD / fármaco.

A pesar del hecho de que las técnicas termo-analíticas son consideradas métodos confiables y relativamente rápidos hay solamente algunos reportes sobre las propiedades térmicas de las CDs. El comportamiento térmico general de las CDs naturales (α , β y γ) son semejantes. Las diferencias que pueden encontrarse son en el contenido de agua, las temperaturas de fusión y de degradación, y los valores de pérdida de masa.

El perfil termo-analítico puede dividirse generalmente en tres partes:

- (1) Pérdida de agua absorbida del ambiente a temperaturas de 120 ° C dependiendo de las condiciones de análisis y de las características higroscópicas del material.
- (2) La degradación térmica acompañada de oxidación causada por aire que comienza arriba de los 250 ° C en la fase sólida en primer término y luego continúa en el estado líquido después de la fusión la cual ocurre aproximadamente a los 300 ° C.
- (3) La ignición que toma lugar en contacto con aire arriba de los 300 ° C.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) (2)

Un microscopio electrónico de barrido crea una imagen ampliada de la superficie de un objeto. No es necesario cortar el objeto en capas para observarlo con un microscopio de este tipo, sino que puede colocarse en el microscopio con muy pocos preparativos. El microscopio electrónico de barrido explora la superficie de la imagen punto por punto. El microscopio electrónico de barrido produce imágenes similares a las ópticas, pero con una gran profundidad de foco que les confiere una apariencia tridimensional característica y brindando otra clase de información.

La microscopía electrónica de barrido es utilizada para estudiar los aspectos microscópicos de los materiales solos, los estándares (CDs y las moléculas de la sustancia "huésped") así como de los productos obtenidos al formar los complejos de inclusión por los diferentes métodos. Incluso si hay una diferencia clara en el estado de cristalización del material estándar y el producto obtenido de la complejación, este método es inadecuado para afirmar la formación de un complejo de inclusión, pero no obstante ayuda a evaluar la existencia de un componente simple en las preparaciones obtenidas.

Espectroscopía Infrarrojo (IR)

La espectroscopía IR es utilizada para determinar la interacción entre las CDs y la molécula "huésped" en estado sólido. La técnica generalmente no es muy conveniente para detectar complejos de inclusión y es menos clara que otros métodos. Las bandas de las CDs frecuentemente

cambian ligeramente en la formación del complejo y si la fracción de moléculas encapsuladas en el complejo es menor que el 25%, las bandas, las cuales podrían estar destinadas a la fracción incluida de la molécula "huésped", son fácilmente enmascaradas por las bandas del espectro de las CDs. La aplicación de la espectroscopía IR está limitada para moléculas "huésped" que tienen algunas bandas características como las de los grupos carbonilo y sulfonilo. (2)

Todos los análisis instrumentales anteriores permiten la determinación de masa y cambios en el flujo de calor, en la longitud de onda, en los picos o señales emitidas, lo que permite la identificación funcional y estructural de la muestra o de sus productos de descomposición.

En general las constantes de unión pueden ser utilizadas como un indicador de diferencias en la unión únicamente si los métodos o condiciones para determinar las constantes son equivalentes o no se ven afectados por las condiciones de análisis. (24)

Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

HPLC es un método de análisis popular porque es fácil de aprender y utilizar y no es limitado por la volatilidad o la estabilidad del compuesto de la muestra.

Las separaciones químicas se pueden lograr usando HPLC utilizando el hecho de que ciertos compuestos tienen diferentes tiempos de migración en una columna particular y una fase móvil; el grado de la separación es determinado sobre todo por la selección de la fase estacionaria y móvil. Cada compuesto debe tener un pico característico bajo ciertas condiciones cromatográficas (flujo, longitud de onda, fase móvil, tipo de columna). La migración de los compuestos y de los contaminantes a través de la columna necesita diferenciar bastante para poder ser recogido o extraer el compuesto deseado puro sin incurrir en ningún otro compuesto indeseado.

La identificación de compuestos por HPLC es una parte crucial de cualquier análisis. Para identificar el compuesto por HPLC, un detector debe primero ser seleccionado. Una vez que el detector se seleccione y se fije a los ajustes óptimos de la detección, un análisis de la separación debe ser desarrollado. Los parámetros de este análisis deben ser tales que un pico de un estándar sea observado adecuadamente en el cromatograma. El pico debe tener un tiempo de retención razonable y se debe separar bien de picos extraños en los niveles de detección en que el análisis será realizado.

Por lo anterior el método de HPLC no sirve para identificar de manera directa los complejos de inclusión, ya que separa cada uno de los analitos presentes en la mezcla, el fármaco, la CD y también los posibles productos de degradación. Más bien la función que cumple es la de determinar la cantidad de fármaco incluido dentro de la cavidad de la CD, ya que el fármaco (la molécula "huésped") al encontrarse dentro de la CD está protegido del medio evitando su degradación (si es el caso). Por consiguiente si el complejo obtenido por cualquier método de elaboración, se pone en solución y se analiza por medio de HPLC se cuantifica la cantidad de fármaco no degradado; es decir el fármaco complejado.

2.4. ESTABILIDAD (25)

La Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-1993, para la estabilidad de medicamentos se emite con el objeto de establecer los requisitos de los estudios de estabilidad que deben de efectuarse a los medicamentos nacionales o importados que se comercialicen en México, de tal forma que se garantice la conservación de sus propiedades físicas, químicas, microbiológicas y biológicas por un tiempo determinado y que tenían al momento de ser fabricados.

Esta norma tiene por objeto establecer los requisitos para llevar a cabo y reportar los estudios de estabilidad de medicamentos.

El objetivo de los estudios de estabilidad, es proveer evidencia documentada de cómo las características físicas, químicas, fisicoquímicas, microbiológicas y biológicas del medicamento,

varian con el tiempo bajo la influencia de factores ambientales tales como: temperatura, humedad y luz; y establecer las condiciones de almacenamiento adecuadas y el periodo de caducidad. El titular del registro es el responsable de la estabilidad del medicamento en el mercado bajo las condiciones de almacenamiento establecidas por él.

Todos los medicamentos que se encuentran en el mercado deben de tener fecha de caducidad y ésta no debe exceder a los 5 años de la fecha de fabricación.

Condiciones de almacenamiento particulares son aquellas específicas y diferentes a las condiciones normales de almacenamiento, las cuales se indican en el marbete del medicamento. Se conoce como condiciones de almacenamiento normales a la conservación de los medicamentos en locales secos (no más de 65% de humedad relativa), bien ventilados a temperatura ambiente (entre 15 ° C y 30 ° C), al abrigo de la luz intensa y de olores extraños u otras formas de contaminación.

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

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

Dentro de este contexto existen tres tipos de estudio: Estabilidad acelerada, Estabilidad a largo plazo y Estudios de anaquel.

Estabilidad acelerada: Estudios diseñados para incrementar la velocidad de degradación química y/o biológica o el cambio físico de un medicamento, por medio del empleo de condiciones exageradas de almacenamiento.

Estudios de estabilidad a largo plazo (tiempo real): Son aquellos en los que se evalúan las características físicas, químicas, fisicoquímicas, biológicas o microbiológicas del medicamento durante el periodo de caducidad bajo condiciones de almacenamiento normales o particulares.

Estudios de anaquel: Estudios diseñados para verificar la estabilidad del medicamento a partir de lotes de producción almacenados, en las condiciones normales o particulares establecidas.

La Fecha y el periodo de caducidad son datos importantes que deben ser reportados para un medicamento o fármaco en particular.

La Fecha de caducidad es la que se indica en el material de envase primario y/o secundario y que determina el periodo de vida útil del medicamento. Se calcula a partir de la fecha de fabricación, y se toma en cuenta el periodo de caducidad.

El Periodo de caducidad es el tiempo estimado durante el cual el lote de producto permanece dentro de las especificaciones si se conserva bajo condiciones de almacenamiento normales o particulares. Este periodo no debe exceder de 5 años.

Así mismo existe el periodo de caducidad tentativo que es el periodo de caducidad provisional que la secretaría de salud autoriza en base a los resultados de los estudios de estabilidad acelerada presentados en el paquete de registro del producto. (25)

2.4.1. Condiciones propuestas para una prueba de estabilidad acelerada para complejos en estado sólido y solución acuosa

Estudios de Estabilidad Acelerada (25)

Los estudios de estabilidad acelerada en la búsqueda del registro de algún medicamento o modificaciones a las condiciones de registro, se deben de llevar a cabo en tres lotes piloto o de producción con la formulación y al material de envase sometidos a registro de acuerdo a lo siguiente:

A.- Para medicamentos con fármacos nuevos

Tiempo: 180 días

Forma Farmacéutica	Condiciones de Almacenamiento	Análisis
Sólidas	40° C + 2° C con 75 % de humedad relativa	30, 60, 90 y 180 días
Líquidas y Semisólidas	40° C + 2° C con humedad ambiente	30, 60, 90 y 180 días
Todas	30° C + 2° C con humedad ambiente	inicial, 90 y 180 días

B.- Para medicamentos con fármacos conocidos

Tiempo: 90 días

Forma Farmacéutica	Condiciones de Almacenamiento	Análisis
Sólidas	40° C + 2° C con 75 % de humedad relativa	30, 60 y 90 días
Líquidas y Semisólidas	40° C + 2° C con humedad ambiente	30, 60 y 90 días
Todas	30° C + 2° C con humedad ambiente	Inicial y 90 días

2.5 LA MUCOSA BUCAL COMO VÍA DE ADMINISTRACIÓN

Ventajas y desventajas de la administración vía mucosa bucal (26)

La administración de un fármaco vía mucosa bucal encaminada a la circulación sistémica es definida como liberación bucal. Aunque la mucosa bucal es significativamente menos permeable que la mucosa sublingual y usualmente no provee una absorción rápida del fármaco ni ofrece una buena biodisponibilidad, es más permeable que la piel y tiene otras ventajas sobre rutas alternas de liberación.

El hecho de que la mucosa bucal es menos permeable que la sublingual hace a esta un sitio deseable para la liberación controlada o sostenida. La mucosa bucal está provista de una cobertura de protección para los tejidos inferiores, actuando como una barrera física contra toxinas y microorganismos.

Sin embargo lo más importante de la administración de fármacos por vía bucal, es que éste entra directamente a la circulación sistémica, por consiguiente se evita la degradación enzimática del fármaco en el tracto gastrointestinal así como el efecto del primer paso por el metabolismo hepático.

Los péptidos y las proteínas no son susceptibles solamente al ambiente ácido del estómago, poseen un tamaño y peso molecular altos y tienen una naturaleza hidrofílica, por consiguiente no pueden permear la mucosa intestinal tan fácilmente como lo hacen en tejidos bucales.

Por estas razones la liberación bucal ésta siendo estudiada con intensidad creciente como vía de administración para fármacos peptídicos o poliméricos, es decir de gran tamaño, que cada vez son más frecuentes en el mercado.

2.5.1. Características de la mucosa bucal

Estructura de la mucosa bucal (26)

En términos generales la mucosa oral está constituida por una capa gruesa de epitelio escamoso estratificado el cual está cubierto con moco y consiste en: un estrato distendido, un estrato filamentososo, un estrato suprabasal y un estrato basal. Bajo estos estratos se encuentra una lámina basal, la lámina propia y la submucosa. Tal y como se muestra en la Figura 7.

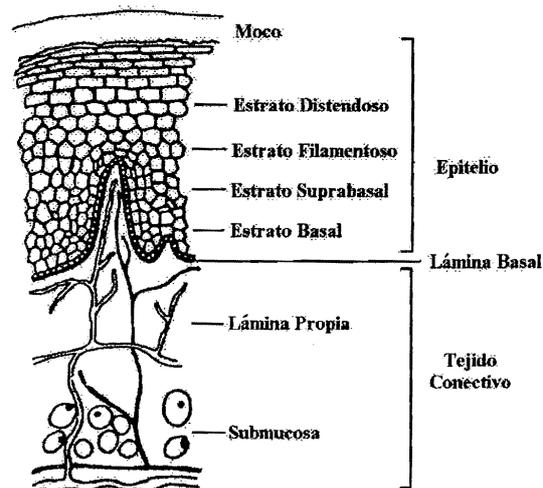


Figura 7. Esquema de un corte transversal de la mucosa oral que muestra el epitelio, la lámina basal y el tejido conectivo. (27)

El epitelio sirve como una barrera mecánica que protege los tejidos que se encuentran debajo, considerando que la lámina propia actúa como un soporte mecánico y también acarrea la sangre a los vasos y a los nervios. Algunas regiones de la mucosa bucal son queratinizadas y otras no (Figura 8). Las regiones no queratinizadas como la mucosa bucal, son más permeables que las regiones queratinizadas.

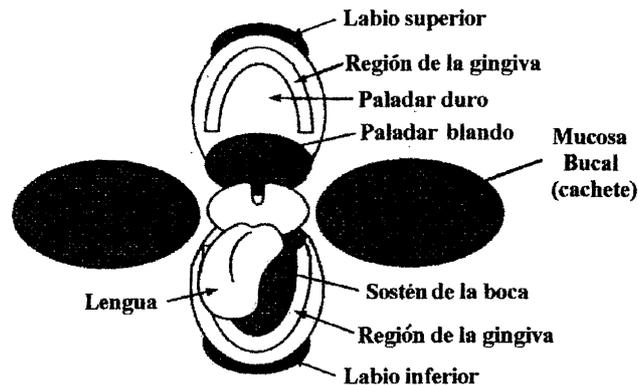


Figura 8. Representación esquemática de la cavidad oral abierta, mostrando las regiones queratinizadas (blanco) y las no queratinizadas (negro) de la boca. (27)

Hasta cierto punto, la composición de los lípidos intercelulares influye en las características de permeabilidad de la región en particular donde se encuentren. Considerando que las regiones queratinizadas contienen predominantemente lípidos neutros como ceramidas, esto confiere a este tejido una menor permeabilidad, debido a que las cadenas alquílicas de las ceramidas permiten que se acomoden de manera muy compacta, dejando poco espacio entre ellas; por otro lado, las regiones no queratinizadas contienen un alto porcentaje de glicosilceramidas, cuyo anillo voluminoso impide tener un arreglo compacto y esto imparte a este tejido una mayor permeabilidad.

Al parecer los patrones de diferenciación epitelial observados en la mucosa bucal producen una capa superficial que reúne las demandas suficientes para estar ubicado en este tejido en particular.

2.5.2. Transporte de fármacos a través de la mucosa (29)

Hablando de la liberación de los fármacos, la cantidad de algún o de cierto fármaco que se absorba a través de la mucosa bucal está determinada por muchos factores, incluyendo el pKa de la base, el coeficiente de partición de la forma no ionizada del fármaco, el coeficiente de partición lípido / agua del fármaco y del pH de la solución y de la mucosa bucal. Uno de los beneficios que se han obtenido por la administración de un fármaco a través de mucosa bucal es la posibilidad de que éste pueda liberarse de manera prolongada.

La absorción vía mucosa bucal involucra el paso de la molécula del fármaco de la superficie de la mucosa bucal al moco (la capa más externa de la mucosa), esto bajo la influencia de un gradiente de concentración, seguido por una difusión hacia el moco, el epitelio, la lámina basal y por último el tejido conectivo. En adición a estas técnicas de promoción de fármacos que involucran propiedades fisicoquímicas de la mucosa bucal y del fármaco en sí, otras estrategias de transporte pasivo tal como una supersaturación y el aumento en las concentraciones del solvente han sido utilizadas.

Varios criterios que deben de cumplirse para una penetración ideal son (28):

- Que el fármaco no sea tóxico ni irritante
- Eficacia farmacológica
- Acción controlada y reversible en el paso del fármaco
- Compatibilidad fisicoquímica del fármaco y otros excipientes que se vayan a usar
- De acción rápida
- No presentar alergia.

Las membranas biológicas poseen carácter lipofílico así que solamente algunas moléculas relativamente lipofílicas pueden penetrar a través de ellas. Sin embargo, la difusión pasiva antes mencionada está dirigida por altas concentraciones del fármaco (con alta actividad también) en la membrana acuosa exterior o en el vehículo acuoso del fármaco. En otras palabras para una

adecuada formulación, un fármaco debe presentar un equilibrio lipofílico / hidrofílico adecuado, favoreciéndose la penetración de fármacos que presentan una hidrofilia y una lipofilia moderadas.

2.5.2.1. Aplicaciones de la liberación de fármacos vía mucosa bucal (27)

Debido a que la mucosa bucal es más permeable que la piel, se ha demostrado por medio de pruebas de absorción biexponencial, que la mucosa bucal puede actuar como un área de almacenamiento para ciertos fármacos antes de pasar a torrente sanguíneo. Recientemente se han estudiado distintos tipos de principios activos como candidatos a ser administrados por vía bucal en combinación con CDs.

A pesar de que la mucosa bucal se perfila como una vía prometedora para la administración de péptidos, estudios iniciales sobre la absorción de péptidos y su permeabilidad a través de la mucosa bucal mostraron que aunque altas dosis de fármaco fueron administradas vía bucal, en comparación con las administradas por vía intravenosa, los niveles plasmáticos correspondientes resultaron mucho menores en la liberación bucal que por la ruta intravenosa. Esto confirma la importancia de incluir en la formulación bucal promotores de penetración que faciliten la permeación de los péptidos (o de algunos otros fármacos), a fin de que se logre el efecto terapéutico buscado.

Diferentes sistemas se han propuesto para liberar fármacos a través de la mucosa bucal con el fin de obtener un efecto sistémico, entre ellos pueden citarse parches y comprimidos bioadhesivos. En la Tabla 2 se encuentran algunos ejemplos particulares resumidos.

Tabla 2.- Ejemplos de fármacos tratados con CDs para su permeación a través de piel o mucosa bucal.

Fármaco	Promotor Utilizado	Sistema de liberación	Modelo Animal	Resultados
Tripéptido de protirelina	Hidroxietilcelulosa	Controlada	Mucosa bucal ratas	Fue liberada mayor cantidad de fármaco cuando una menor viscosidad del polímetro fue utilizada. (27)
Prostaglandina E ₁	β CDs	Controlada Efecto Sostenido	Vía intravenosa/vía mucosa nasal/bucal a ratas Wistar	Se demostró que la prostaglandina es satisfactoriamente liberada a partir del complejo y es absorbida con efectividad por la mucosa nasal de ratas Wistar (30)
Hidrocortisona	PVP / RMβCD CMβCD MLβCD HPβCD HPMC / HPβCD	Complejos de inclusión en presencia de polímeros Controlada	Piel de ratón	Las CDs funcionaron como un acarreador transportando el fármaco de la fase donadora a través de la piel y vieron aumentada su acción por la adición de polímeros solubles en agua. (29)
Butilparabeno	β CD	Vehículos tópicos Controlada	Transporte percutáneo	Por su superficie exterior hidratable las CDs en condiciones normales son capaces de atravesar la barrera de la piel, transportando en su cavidad interna a los fármacos y haciendo más fácil su penetración. (33)

2.5.3. Mecanismo de acción de las ciclodextrinas como sistemas de liberación

En los últimos años se ha pensado en la formulación de sistemas o matrices poliméricas como parches para la administración vía bucal, transmucosal o sublingual con CDs para el control en la liberación de infinidad de fármacos. David C. Bibby, Nigel M. Davies e Ian G. Tucker en el año (2000) (31) establecieron la teoría de un posible mecanismo por el cual un fármaco se liberaría a partir de una matriz polimérica hidratada conteniendo CDs y un fármaco en exceso con respecto a su solubilidad. El modelo asume que ambos tanto el fármaco libre como el complejado son capaces de difundir a partir de la matriz existiendo un equilibrio entre el fármaco en estado sólido, el fármaco libre solubilizado y el complejo. En la Figura 9 se explica este mecanismo simulando el sistema polimérico. (31)

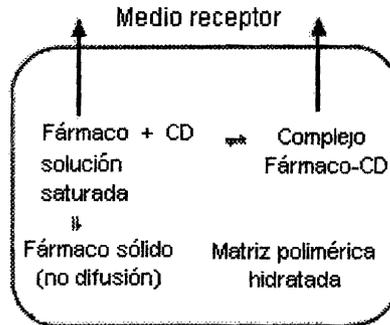


Figura 9. Representación esquemática del posible mecanismo de la liberación de fármacos a partir de una matriz polimérica hidratada. (31)

La incorporación de CDs dentro de matrices poliméricas puede modificar la liberación del fármaco por varios mecanismos como los que se mencionan:

Las CDs pueden incrementar la liberación del fármaco por: (31)

1. Incrementar la solubilidad en solución acuosa de las moléculas del fármaco.
2. Actuar como agentes de paso o canales y así promover la erosión de la matriz.

3. Servir como agente acarreador, o
4. Incrementar la concentración de las especies difusibles (tanto del fármaco libre como del complejoado).

Además las CDs como matrices poliméricas pueden reducir la liberación del fármaco por: (31)

1. La complejación del fármaco incrementando su peso molecular y por tanto reduciendo su difusividad.
2. Reduciendo la concentración de las especies fácilmente difundibles por la formación de complejos pobremente solubles.
3. Reduciendo la concentración de las especies fácilmente difundibles por la formación de complejos fármaco-CD en los cuales la molécula huésped está covalentemente unida al sostén del polímero, o
4. Actuando como agentes enlazantes y reduciendo el tamaño de poro del polímero.

2.6 CONDICIONES SINK EN DISOLUCIÓN

Ecuación de la Condición "sink"

Las condiciones "sink" existen cuando el volumen del medio de disolución es de 5 a 10 veces mayor que el volumen requerido para hacer una solución saturada de un fármaco ($C_s \leq 0.15 (S)$ o $C_s \ll S$).

Por lo tanto, para determinar la velocidad de disolución para condiciones sink, tenemos las siguientes expresiones en función del tiempo:

$$\frac{dM}{dt} = -kA(S - C_s) \qquad \frac{dM}{dt} = -kAS$$

en donde dM es el cambio en la cantidad de soluto, dt el cambio en el tiempo, k la constante asociada al proceso de disolución, a el área superficial, S la solubilidad intrínseca del soluto y C_s la solubilidad en condiciones

Al establecer condiciones sink la principal condición es no rebasar el 15% de la solubilidad del fármaco

3.- Objetivos

GENERAL

- Obtener complejos de inclusión Clorambucilo / Hidroxi Etil- β -Ciclodextrina, mediante los métodos de liofilización, coevaporación y amasado; caracterizarlos y evaluar su estabilidad, con el fin de proponerlos como sistemas terapéuticos de liberación transbucal.

PARTICULARES

- Realizar diagramas de solubilidad para el CHL (23° C y 37° C) en función de distintas concentraciones de HE β CD para estimar la estequiometría del complejo, así como la constante de unión.
- Llevar a cabo un estudio de cinética de degradación para el CHL (23° C y 37° C) en función de distintas concentraciones de HE β CD para determinar las constantes aparentes de estabilidad.
- Formar complejos de HE β CD con CHL mediante procesos como: liofilización, coevaporación y amasado, a fin de determinar el método que genere mayor rendimiento.
- Caracterizar y comprobar la formación de los complejos mediante distintos análisis instrumentales como Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Espectrofotometría UV/VIS, Espectroscopía de Infrarrojo por Transformadas de Fourier (FTIR), Microscopía Electrónica de Barrido y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).

- Evaluar la estabilidad de los complejos en estado sólido y en solución acuosa.
- Realizar pruebas de permeación *in vitro* con el CHL libre y complejo.
- Comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los reportados en estudios previos empleando otras ciclodextrinas, con el fin de definir las condiciones óptimas para proponer un sistema de liberación bucal.

4.- Materiales y Reactivos

Reactivos

- 2-HE- β -CD (2 Hidroxi Etil Beta Ciclodextrina) Nutrer[®] S.A. de C.V.
- Clorambucilo, proveedor Fluka Chemika[®]
- Etanol, proveedor Fermont[®] Productos químicos de Monterrey S.A. de C.V.
- Metanol, proveedor Fermont[®] Productos químicos de Monterrey S.A. de C.V.
- Etanol grado HPLC, proveedor Fermont[®] Productos químicos de Monterrey S.A. de C.V.
- Metanol, proveedor grado HPLC, Fermont[®] Productos químicos de Monterrey S.A. de C.V.
- Agua destilada obtenida de un equipo RiOs Elix 5 Millipore[®]
- Agua grado HPLC obtenida de un equipo MilliQ A10 Millipore[®]

Equipos y materiales:

- DSC Refrigerador Cooling System TA Instruments NRTL LISTED MET[®], Canada
- MAGNA-IR 560 Spectrometer Nicolet[®], Estados Unidos de América
- Cromatógrafo Varian[®] mod. Prostar 210 LR92489, Estados Unidos de América
- Freeze Dry System. FREEZONE 6 Labconco[®], Estados Unidos de América
- Branson 5210 Ultrasonic Cleaner Branson[®], Estados Unidos de América
- Balanza analítica; modelo BBC 32, Boeco[®], Alemania
- Agitador de velocidad variable RZR-1; Caframo[®], Alemania
- Rotavapor Laborota[®] 4000; Heidolph, Alemania.
- Hettich Zentrifugen[®] EBA 12, D-78532, Alemania
- Espectrofotómetro UV-Vis.; Varian[®], mod. Cary IE 95031003, Australia
- Microscopio electrónico de barrido JSM-25SII; JEOL[®], Japón

Materiales y Reactivos

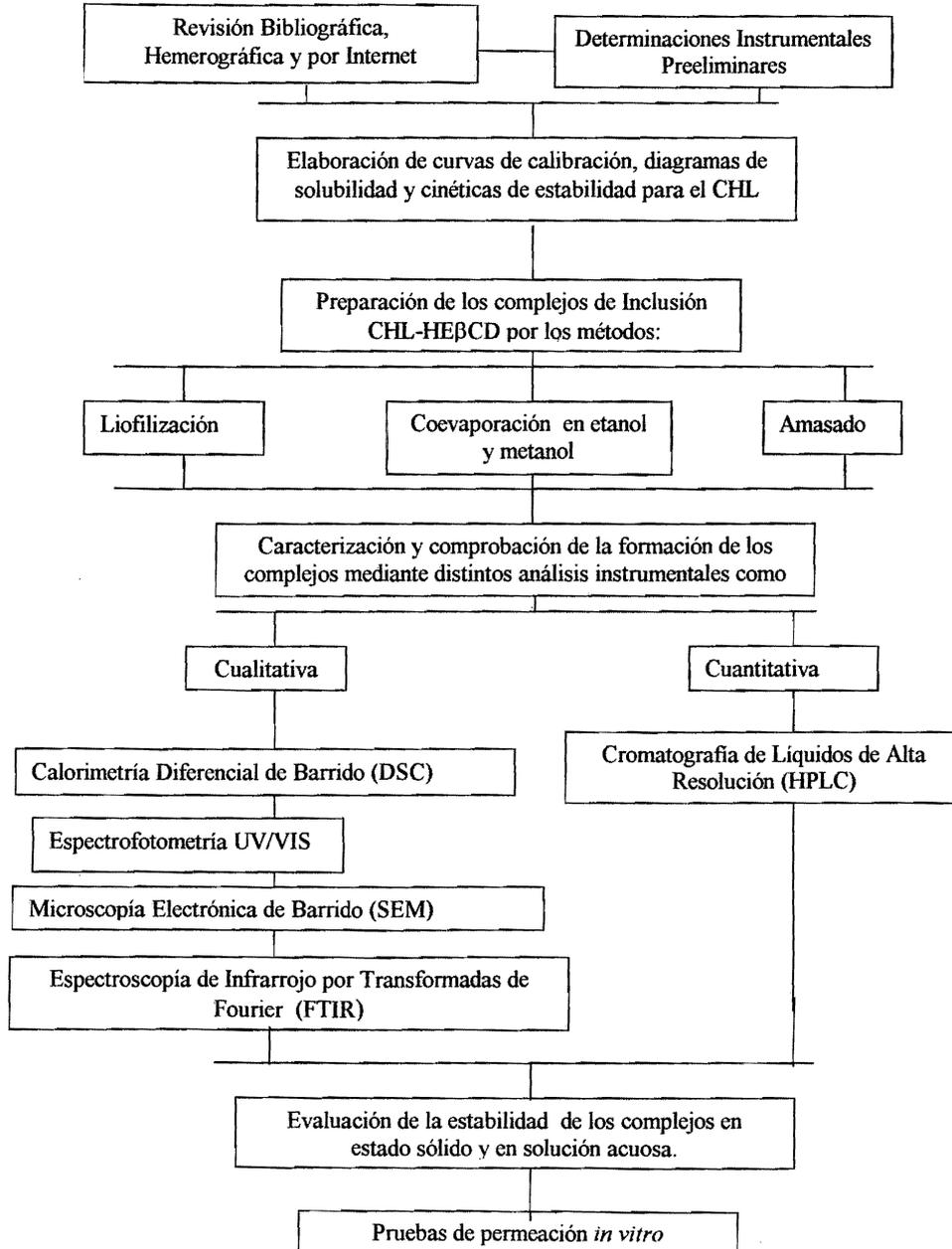
- Estufa Thelco[®] mod. 16 GCA/Precision Scientific, Estados Unidos de América
- Refrigerador Torrey[®] mod. R148, Mexico
- Potenciómetro Phmeter mod. 430 Corning[®], Estados Unidos de América
- Material de cristalería (celdas de difusión tipo Franz, pipetas graduadas y volumétricas, probetas, vasos de precipitado, vidrio de reloj)

Material Biológico

- Mucosa bucal de cerdo obtenida directamente del rastro.

5.- Metodología

5.1 DIAGRAMA GENERAL



5.2. Curvas de calibración

La curva de calibración para estudios de solubilidad, estabilidad y eficiencia de atrapamiento se llevó a cabo utilizando como medio una mezcla Buffer de fosfatos pH 7.4 – metanol en proporción 80:20.

Una curva más para la cuantificación de CHL y los complejos formados en las permeaciones a través de mucosa bucal, se realizó utilizando como medio una solución de HE β CD al 5 % en mezcla Buffer de fosfatos pH 7.4 – metanol en proporción 80:20 la cual estuvo en contacto con mucosa bucal durante un periodo de 8 horas con agitación constante.

Una tercera curva se realizó para cuantificar el CHL retenido en la mucosa bucal, después de terminadas las permeaciones, se dejó la mucosa bucal utilizada en la permeación en contacto, con mezcla Buffer de fosfatos pH 7.4 – metanol en proporción 80:20, así que la curva se realizó utilizando la mezcla previo contacto con mucosa bucal durante 24 horas.

La cuantificación se hizo por medio de HPLC, empleando una columna C18 de 25 cm de longitud, diámetro interno 4.6 mm., tamaño de partícula 5 μ m, marca Varian, empleando como fase móvil acetonitrilo:agua:ácido acético 59:40:1.

5.3. Diagramas de solubilidad

Sistemas con 1 ml de una mezcla Buffer de fosfatos pH 7.4 – metanol (80:20) que contenían concentraciones crecientes de HE β CD (expresadas en molaridad: 0, 7.93×10^{-4} , 1.06×10^{-3} , 1.32×10^{-3} , 2.08×10^{-3} , 6.29×10^{-3} y 1.04×10^{-2}), se colocaron en un baño de agua con agitación constante durante 24 horas, a dos temperaturas diferentes $23 \pm 2^\circ \text{C}$ y $37 \pm 2^\circ \text{C}$. Una cantidad suficiente de CHL se adicionó a cada sistema hasta saturarlos. Posteriormente los sistemas se centrifugaron en una centrifuga Hettich Zentrifugen D-78532 Tuttlingen EBA 12, a 6000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se analizó por HPLC para determinar el contenido de CHL.

5.4. Estudios de cinética de degradación

Los estudios de cinética se llevaron a cabo de igual manera a dos temperaturas diferentes $23 \pm 2^\circ \text{C}$ y $37 \pm 2^\circ \text{C}$ en sistemas conteniendo la mezcla Buffer de fosfatos pH 7.4 - metanol (80:20) cada uno de ellos con concentraciones crecientes de HE β CD (expresadas en molaridad): 0, 7.93×10^{-4} , 1.06×10^{-3} , 1.32×10^{-3} , 2.08×10^{-3} , 6.29×10^{-3} y 1.04×10^{-2} a los cuales fue adicionada una cantidad constante de CHL (0.396 mg), provenientes de una solución estándar 1.302×10^{-3} molar.

Muestras de cada sistema se analizaron por medio de HPLC para determinar la cantidad de CHL no degradado, en rangos de tiempo de 10 minutos durante la primera hora para la cinética de degradación del CHL (0 M de HE β CD) y posteriormente tomando muestras cada treinta minutos hasta alcanzar las seis horas de muestreo. Para las otras concentraciones de HE β CD el muestreo durante las seis horas fue cada 30 minutos.

5.5. Formación del complejo de inclusión

Método de amasado

Una cantidad exactamente conocida de HE β CD (150 mg) se colocó en un mortero y se humectó con la mínima cantidad de agua:metanol (50:50), así mismo se añadió una cantidad equimolar de CHL con respecto a la HE β CD (40 mg) y homogenizó por un periodo de 60 min. El polvo obtenido se secó en la estufa durante 24 horas para permitir la evaporación del solvente.

Influencia del tiempo de amasado

Como estudio alterno se determinó el tiempo óptimo de amasado para la formación del complejo, así como la influencia del tiempo de amasado en la degradación del CHL.

De una misma mezcla de HE β CD y CHL tratadas del modo descrito anteriormente para la formación del complejo por el método de amasado, se tomaron pequeñas muestras a diferentes

tiempos de amasado. Los tiempos fueron: 30, 60, 90, 120 y 150 minutos, éstos se sometieron a una temperatura de 30 ° C durante 24 horas para evaporar el solvente. Posteriormente fueron analizados por HPLC, espectrofotometría UV/VIS, SEM y DSC.

Método de liofilizado

Se preparó una solución acuosa de HE β CD, a la cual se le agregó CHL en suspensión y/o en solución (en la mínima cantidad de metanol) en cantidades equimolares para ambos casos. La mezcla se colocó en un baño de ultrasonido (Branson[®] 5210) durante 2 horas teniendo cuidado de mantener la temperatura por debajo de los 30 ° C para evitar la degradación del CHL.

Posteriormente se filtró la solución a través de una membrana de 0.22 μ m (Millipore[®]) directo en un contenedor especial para liofilización. Se congeló a una temperatura de -20 ° C y se procedió a liofilizar durante 16 horas.

Método de coevaporación

La formación del complejo por este método se realizó de dos formas, empleando metanol o etanol como disolventes para el CHL y la HE β CD considerando que por sus constantes dieléctricas que son $\epsilon=32.6$ y $\epsilon=24$ (a 25 ° C) respectivamente, favorecen la formación del complejo. (32)

Se disolvió una cantidad conocida de HE β CD y se añadió una cantidad equimolar de CHL, agitando hasta completa disolución. Esta solución se colocó en un desecador con sílica gel a una temperatura de entre -15 ° C y -20 ° C con el fin de eliminar el disolvente y obtener el coprecipitado, el cual se secó en la estufa a 30° C durante 24 horas.

5.6. Caracterización de los complejos

Para caracterizar e identificar los complejos formados por los diferentes métodos se llevaron a cabo los siguientes análisis instrumentales: Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Espectrofotometría UV-Visible, Microscopia Electrónica de Barrido, Espectroscopia de Infrarrojo.

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Mediante el aparato DSC Refrigerador Cooling System (TA Instruments NRTL LISTED MET[®] Canada) previa calibración con Indio y corrimiento de la línea base; se corrieron rampas de calentamiento de 0 – 300 ° C a una velocidad de 10 ° C / min, con un flujo de nitrógeno de 50 ml/min. Las muestras analizadas fueron: CHL, HE β CD, mezclas físicas de CHL-HE β CD, así como los complejos obtenidos por los métodos descritos anteriormente empleando charolas de aluminio no herméticas (Perkin Elmer).

Espectrofotometría UV/VIS

Se realizaron barridos en el rango del ultravioleta de 200–400 nm por medio un Espectrofotómetro UV/VIS (Varian[®], mod. Cary IE 95031003, Australia). Los barridos se llevaron a cabo en la mezcla Buffer de fosfatos pH 7.4 - Metanol (80:20) para determinar los máximos de absorción de los estándares y de los complejos.

Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Las muestras de estándares y complejos se fijaron sobre una película de carbono, colocando pintura de plata para una mejor conductividad, para después ser sometidas al baño de oro durante 10 minutos. Se tomaron micrografías con el Microscopio electrónico de barrido JSM-25SII (JEOL[®], Japón) a diferentes aumentos desde 45X hasta 3000X.

Espectroscopía de Infrarrojo

El aparato que se utilizó para la obtención de los espectros infrarrojos fue el MAGNA-IR 560 Spectrometer Nicolet®. Las muestras se mezclaron con bromuro de potasio en un mortero de ágata hasta alcanzar homogeneidad. Esta mezcla se vertió en una pequeña cámara de compresión, se colocó el punzón y se ejerció presión para obtener un comprimido de aproximadamente 0.5 cm de espesor el cual fue colocado en una placa de metal que permitía la lectura y obtención de los espectros al colocarla en el aparato. Como tratamiento posterior a los espectros se les realizó la corrección de la línea base y un suavizado de bandas. Los espectros obtenidos con CHL, HE β CD, mezcla física y los complejos fueron comparados.

Tasa de complejación

Para determinar la cantidad de Clorambucilo complejado se realizó un estudio por HPLC mediante un Cromatógrafo Varian® mod. Prostar 210 LR92489 , USA. Teniendo como condiciones un flujo de 2 ml/min, columna C18 MICROSORB-MV 250x4.6, volumen de inyección de 20 μ L y con una fase móvil acetonitrilo:agua:ácido acético en proporción 59:40:1 y como medio de disolución para el análisis de los complejos, la mezcla Buffer de fosfatos pH 7.4 - Metanol (80:20).

Las soluciones de los complejos fueron centrifugadas en una centrífuga (Hettich Zentrifugen EBA 12, D-78532, Tuttlingen), durante 15 minutos a 6000 rpm para posteriormente ser analizadas por HPLC bajo las condiciones especificadas.

5.7 Estudios de Estabilidad

Condiciones propuestas para una prueba de estabilidad acelerada para complejos en estado sólido y solución acuosa.

Se analizaron los complejos obtenidos por los distintos métodos, realizando dos estudios: uno bajo las condiciones establecidas en la NOM-073-SSA1-1993 "Estabilidad de Medicamentos" para estabilidad acelerada de medicamentos conocidos y uno adicional con diferentes condiciones de tiempo, temperatura y humedad para detectar la hidrólisis en lapsos cortos de tiempo. La Tabla 3 sintetiza ambos estudios.

Tabla 3.- Estudios de estabilidad realizados a los complejos de inclusión

Estudio 1: Estabilidad acelerada de medicamentos conocidos (modificada de NOM-073-SSA1-1993)			
<u>Complejos Analizados</u>	Estado del complejo	Condiciones de Almacenamiento	Análisis
Amasado Liofilizado	Sólido	40° C + 2° C con 75 % de humedad relativa	0, 30, 60 y 90 días
CoevMet CoevEt	Solución acuosa (Buffer de fosfatos pH 7.4)	40° C + 2° C con humedad ambiente	0, 30, 60 y 90 días
Estudio 2: Propuesto			
<u>Complejos Analizados</u>	Estado del complejo	Condiciones de Almacenamiento	Análisis
Amasado Liofilizado	Sólido	4° C + 2° C con humedad ambiente	0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días
CoevMet CoevEt		23° C + 2° C con humedad ambiente	0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días

Para fijar las condiciones mencionadas se recurrió a una estufa Thelco ® modelo 16 GCA/Precision Scientific y un refrigerador Torrey ® modelo R148 para establecer las temperaturas; así como un desecador con una solución de hidróxido de sodio 18.6 % p/p para establecer la humedad. Las muestras sólidas y líquidas se colocaron en viales herméticamente cerrados color ámbar (como indica el marbete del CHL para su conservación) y así protegerlos de la luz.

5.8. Estudios de permeación *in vitro*

Estudios de solubilidad para determinar condiciones sink

Se colocaron tres sistemas con solución de HE β CD al 5 % en buffer de fosfatos pH 7.4 previo contacto con mucosa bucal durante 8 horas, a estos sistemas se agregó un exceso de CHL, hasta saturarlos y se mantuvieron en agitación constante durante 24 horas a 37 °C, transcurrido este tiempo fueron analizados por HPLC para determinar la solubilidad del CHL bajo estas condiciones.

Permeación a través de mucosa bucal porcina

Los estudios de permeación se llevaron a cabo a través de mucosa bucal empleando celdas tipo Franz (Figura 10), colocando la membrana (mucosa bucal porcina) entre el medio donador y el medio receptor. El medio receptor (solución de HE β CD al 5 % en buffer de fosfatos pH 7.4) se mantuvo a 37°C, con agitación constante durante toda la experiencia.

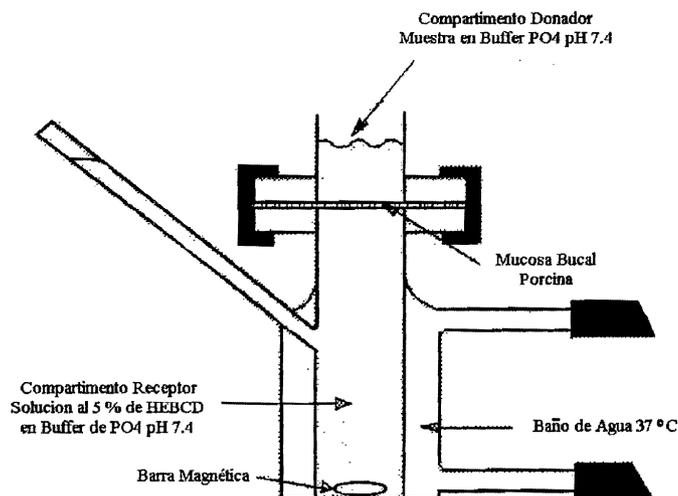


Figura 10 .- Celda tipo Franz y condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la permeación *in vitro*.

Se realizaron permeaciones del CHL, de la mezcla física HE β CD-CHL y de los complejos obtenidos por los distintos métodos todos ellos en buffer de fosfatos pH 7.4. Se trabajó bajo condiciones de muestreo con reemplazo durante un periodo de 8 horas con toma de muestra cada 15 minutos durante la primera hora y posteriormente cada hora.

Las muestras obtenidas se filtraron en tubos Eppendorf con membrana Millipore de 0.45 μ m, por medio de centrifugación y luego fueron analizadas por HPLC.

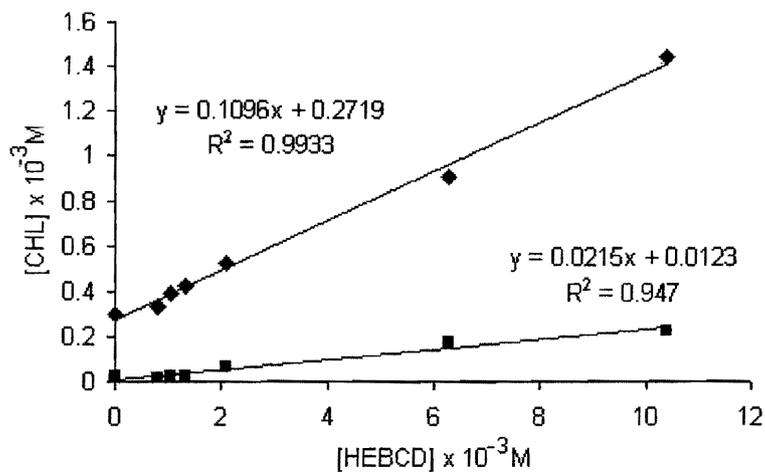
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 SOLUBILIDAD

La solubilidad del CHL en solución acuosa (mezcla Buffer de fosfatos pH 7.4-metanol 80:20) en presencia de diferentes concentraciones porcentuales de HE β CD: 0%, 0.1086%, 0.15%, 0.18 %, 0.284%, 0.859% y 1.42% (equivalente en concentraciones molares: 0, 7.93×10^{-4} , 1.06×10^{-3} , 1.32×10^{-3} , 2.08×10^{-3} , 6.29×10^{-3} y 1.04×10^{-2}), tanto a 23° C como a 37° C mostró una tendencia lineal obteniéndose en ambos casos una pendiente menor a 1 (0.1096 y 0.0216, respectivamente). De este modo las curvas de solubilidad pueden ser clasificadas como A_L lo cual indica que el complejo formado tiene una relación estequiométrica 1:1, de acuerdo a la clasificación de Higuchi y Connors (20-23).

El diagrama de solubilidad de tipo A_L , como ya se mencionó, está representado por un incremento lineal entre la concentración del agente complejante, en este caso la HE β CD y la cantidad de fármaco huésped (CHL). Los diagramas del tipo lineal se obtienen cuando cada complejo contiene solamente una molécula de agente complejante y una de huésped. Es por ello que se asevera que el complejo entre CHL y HE β CD sigue una estequiometría 1:1 (20- 23).

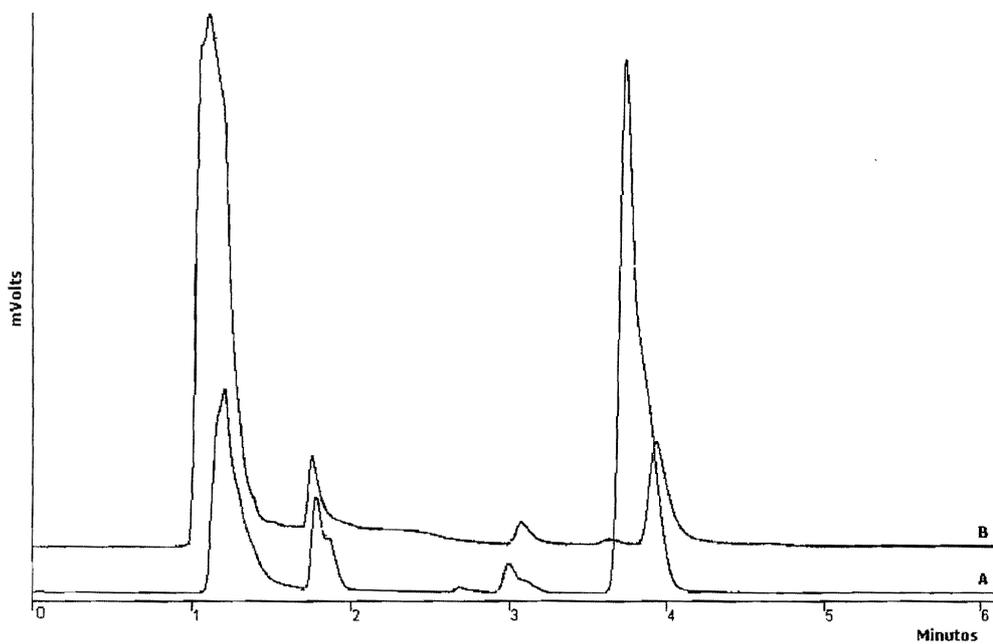
La Gráfica 1 muestra los diagramas de solubilidad a 23 ° C y a 37 ° C.



Gráfica 1.- Diagramas de solubilidad para el CHL a 23 °C \blacklozenge y 37 °C \blacksquare

Los valores de $k_{1:1}$ obtenidos fueron los siguientes 411.47 M^{-1} a 23 °C y 781.43 a 37 °C. Como puede observarse, la solubilidad del CHL en presencia de HEβCD aumenta conforme se incrementa la concentración de la ciclodextrina para ambas temperaturas. Sin embargo es notorio que el CHL encontrado es mucho menor a 37 °C, siendo 6.5 veces menor la cantidad a esta temperatura.

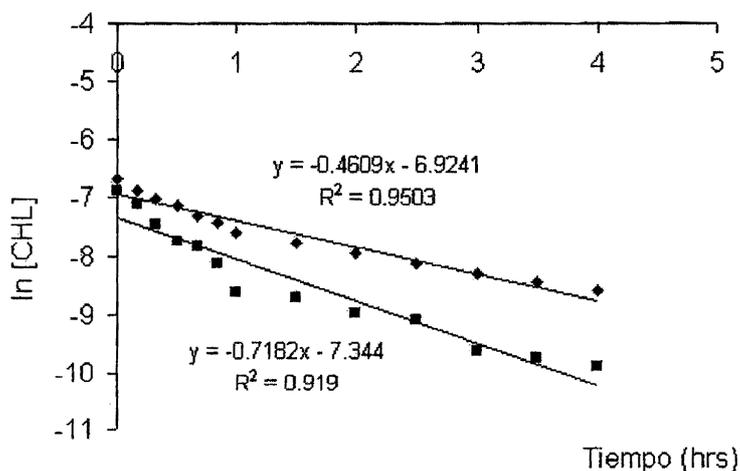
Este comportamiento se atribuye a la degradación del agente antineoplásico por efecto de la temperatura, pues los cromatogramas obtenidos mediante HPLC dejan notar que comienza a haber una degradación significativa cuando el fármaco es sometido a temperaturas por arriba de los 30° C. Los siguientes cromatogramas en la Gráfica 2 muestran mayor incidencia de los productos de degradación a los 37° C así como una señal menor para el CHL; caso contrario a 23° C.



Gráfica 2.- Cromatogramas de la cinética de degradación del CHL en presencia de HE β CD (1.322 x 10⁻³ M), Productos de degradación fármaco tr=1.2, 1.8 y 3.05, CHL tr=3.5-4 A) 23 °C B) 37 °C.

6.2 CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN

La degradación del CHL en solución acuosa (mezcla Buffer de fosfatos pH 7.4-metanol 80:20) se llevó a cabo de igual manera a 23 ° C y a 37 ° C (Gráfica 3), mostrando una cinética de primer orden en ausencia de HE β CD, obteniéndose constantes de degradación k_0 (Constante de degradación de CHL libre o sin complejar) (34) de 0.4609 hrs⁻¹ y 0.7182 hrs⁻¹ respectivamente. Notándose que a una temperatura de 37 ° C la constante de degradación posee mayor magnitud haciendo así evidente que a mayores temperaturas el CHL se degrada con mayor rapidez.



Gráfica 3.- Hidrólisis del CHL a 23 ° C \blacklozenge y 37 ° C \blacksquare

Este perfil de degradación cambia al encontrarse presente en el medio diferentes concentraciones de HE β CD a ambas temperaturas (Gráficas 4 y 5). En este caso se obtuvo k_c (Constante de degradación de CHL complejado) (34). Es claro que la HE β CD tiene un efecto estabilizante pronunciado sobre la degradación del CHL pues la constante para la reacción de hidrólisis disminuye a 0.0621 hrs⁻¹ y 0.3197 hrs⁻¹ respectivamente; ambas constantes corresponden a la concentración más alta de CD colocada de 1.04×10^{-2} M. Los resultados generales se resumen en las Tablas 4 y 5.

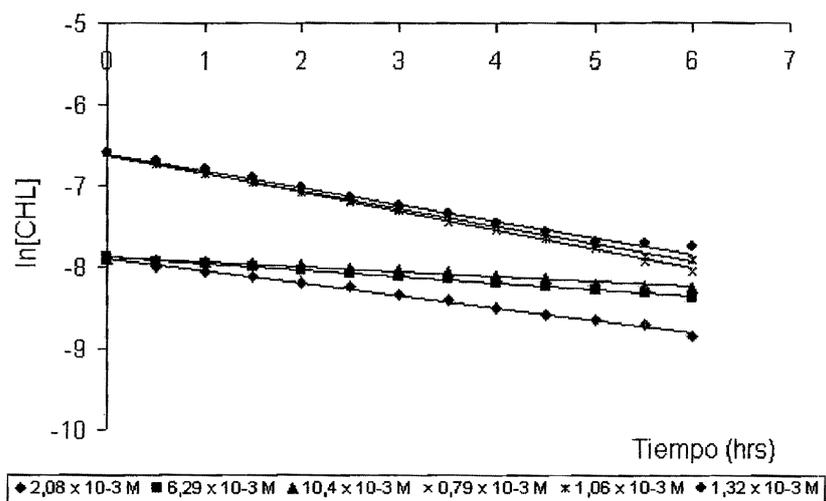
Tabla 4.- Constantes de complejación para CHL a diferentes concentraciones de HE β CD a 23 ° C.

[HEβCD] Molaridad	K_c (hrs⁻¹)
0	0.4609
0.793 x 10 ⁻³	0.2365
1.057 x 10 ⁻³	0.2206
1.322 x 10 ⁻³	0.2067
2.079 x 10 ⁻³	0.1512
6.291 x 10 ⁻³	0.0829
10.397 x 10 ⁻³	0.0621

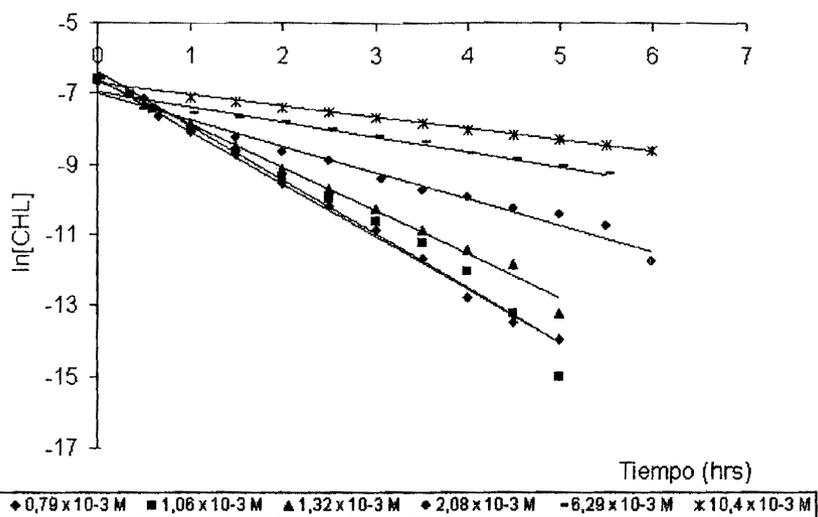
Tabla 5.- Constantes de complejación para CHL a diferentes concentraciones de HE β CD a 37 ° C.

[HEβCD] Molaridad	K_c (hrs⁻¹)
0	1.7182
0.793 x 10 ⁻³	1.4927
1.057 x 10 ⁻³	1.4051
1.322 x 10 ⁻³	1.2376
2.079 x 10 ⁻³	0.7496
6.291 x 10 ⁻³	0.4244
10.397 x 10 ⁻³	0.3197

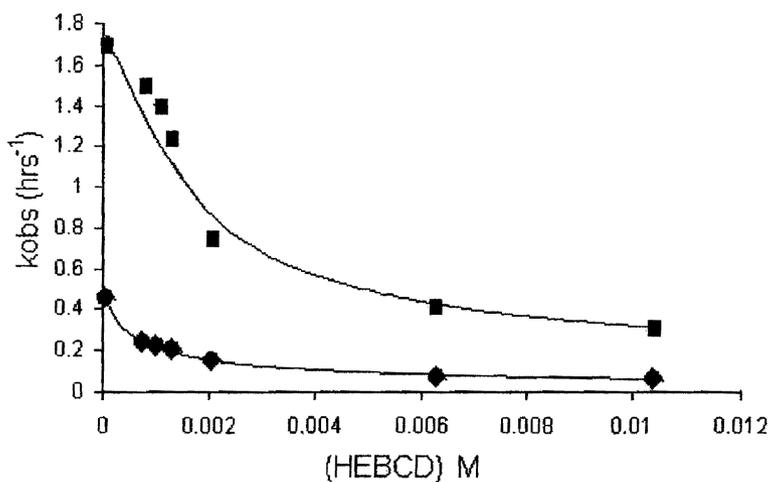
En apariencia, a partir de las gráficas, no se nota gran incremento en la estabilidad. Sin embargo, existe diferencia significativa de acuerdo con la prueba de ANADEVa realizada para los diferentes valores de las constantes de degradación (K_c) del fármaco complejado (Anexo iv y v); lo cual demuestra que aumenta la estabilidad del CHL. Se muestran a continuación las Gráficas 4 y 5 correspondientes a ambas temperaturas.



Gráfica 4.- Cinéticas de degradación de CHL a 23 °C en presencia de diferentes concentraciones de He β CD.



Gráfica 5.- Cinéticas de degradación de CHL a 37 °C en presencia de diferentes concentraciones de HeβCD.



Gráfica 6.- Efecto de la HEβCD sobre el valor de la constante de pseudo primer orden de degradación del CHL. 23 °C ◆ y 37 °C. ■

La Gráfica 6 muestra el efecto de la concentración de HE β CD sobre el valor de la constante de pseudo primer orden observada para la degradación del CHL. Es evidente que K_{obs} no es una función lineal de la concentración de CD agregada, más bien se muestra un avance asintótico a un valor mínimo con respecto a la concentración creciente de HE β CD. Este comportamiento de saturación está caracterizado por las reacciones involucradas en la formación del complejo. Esto posiblemente se puede explicar por el mecanismo de reacción ilustrado en la Figura 11, donde k_o es el valor de la constante de degradación para el CHL libre o sin complejar, K_c representa la constante del CHL completamente complejado y K_{st} es la constante aparente de estabilidad para la formación del complejo.

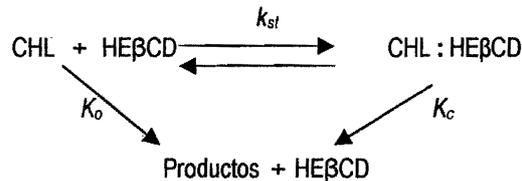
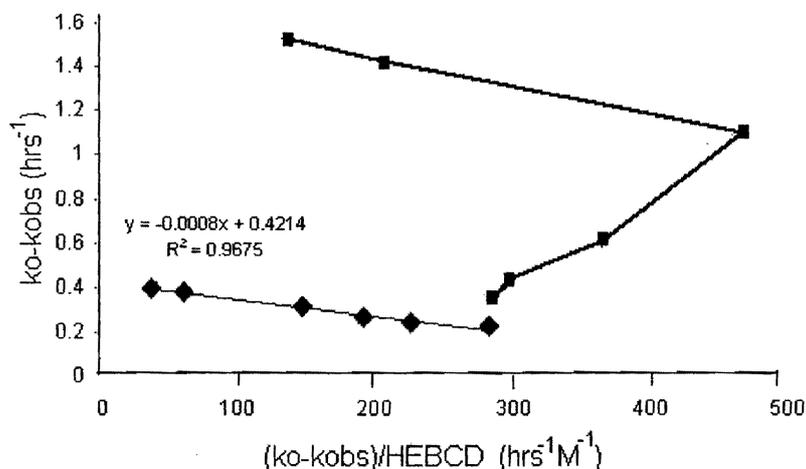


Figura 11.- Mecanismo de reacción ocurrido durante la cinética de degradación de CHL libre y en presencia de distintas concentraciones de He β CD. (34)

De donde podemos obtener la ecuación número 3 que se muestra a continuación

$$k_o - k_{obs} = \frac{[1/k_{st}](k_o - k_{obs}) + (k_o - k_c)}{[CD]} \dots\dots\dots (3)$$

La relación entre $(k_o - k_{obs})$ en función de $(k_o - k_{obs})/(\text{HE}\beta\text{CD})$ nos proporciona $-1/k_{st}$ como pendiente y $(k_o - k_c)$ como intercepto (34), esto se esquematiza en la Gráfica 7, en donde a partir de la pendiente y el intercepto se obtuvieron los valores de k_{st} y k_c , los cuales se muestran en la Tabla 6.



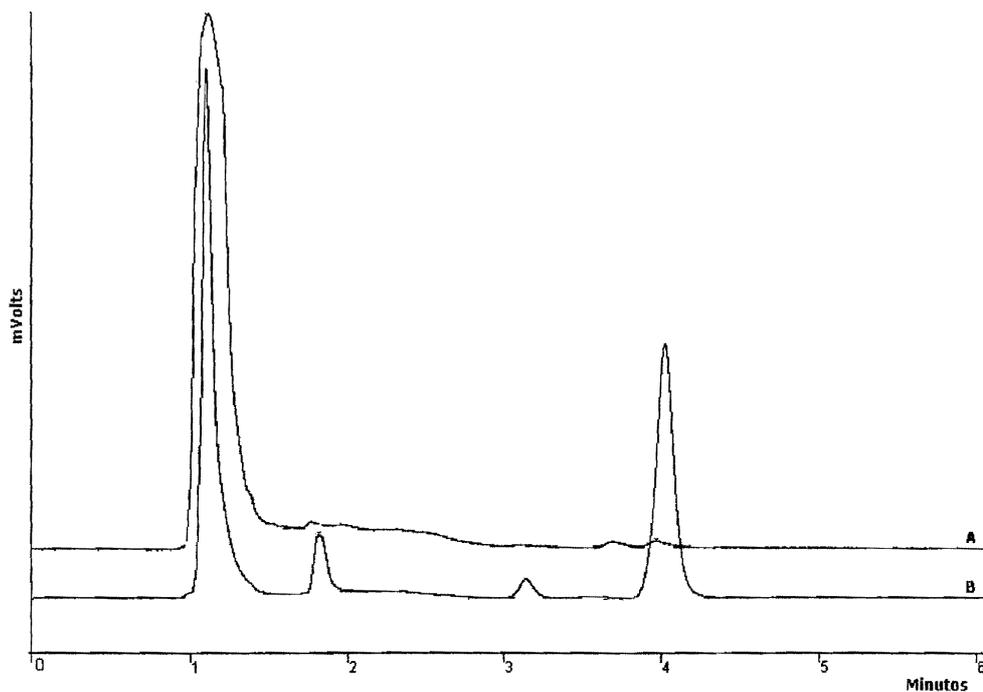
Gráfica 7.- Comportamiento de las constantes y datos obtenidos de acuerdo a la correlación $(k_o - k_{obs})$ en función de $(k_o - k_{obs})$ (HE β CD). 23 °C (◆) y 37 °C. (■)

De manera notoria se vislumbra que el comportamiento del CHL en presencia de concentraciones crecientes de HE β CD a 37 °C no sigue un comportamiento lineal con tendencia negativa como en el caso de los 23 °C, sino por el contrario deja ver una posible tendencia lineal pero con una pendiente positiva y solo en las 4 concentraciones de CD más bajas, a concentraciones más altas esta tendencia se manifiesta pero en sentido contrario, por lo cual no se reportaron los parámetros cinéticos en la Tabla 6. Esto se puede explicar por la saturación de la cavidad de la CD en cuestión, ya que aunque la temperatura puede acelerar el proceso de complejación, también destruye el fármaco y propicia que a bajas concentraciones de HE β CD parte del CHL presente este degradado y la pequeña porción soluble del fármaco se haya complejado por un exceso de la CD, por lo cual no se puede tener una constante de estabilidad y mucho menos aparente. En ese caso, se tendría que considerar la hidrólisis del fármaco a esa temperatura y por consecuencia como se ve afectado el equilibrio de la formación del complejo por el exceso de HE β CD.

Tabla 6.- Parámetros cinéticos para la hidrólisis del CHL a diferentes temperaturas.

Temperatura	$k_{st} M^{-1}$	$k_c h^{-1}$	k_o / k_c
23 °C	0.0008	0.0395	11.67
37 °C	-----	-----	-----

Del esquema representado en la Figura 11 podemos ver que del contacto entre CHL y HE β CD se pueden seguir dos caminos: hacia la formación del complejo o hacia la formación de productos de degradación del fármaco más la HE β CD, bien pues como hemos visto los resultados analizados hasta el momento dejan ver que hay un efecto de la temperatura sobre la hidrólisis del CHL, de modo que al ser ésta de 37 ° C el equilibrio es desplazado hacia la obtención de los productos de degradación y por tanto a un exceso de HE β CD y no hacia la formación del complejo cuando están presentes bajas concentraciones de CD, hecho que se corrobora con la Gráfica 8 en donde se aprecia claramente que a la concentración más baja de ciclodextrina no existe una clara presencia de CHL como tal, pero sí alta incidencia de los productos de su hidrólisis, caso contrario para la concentración más alta en la cual ya aparece el pico correspondiente al fármaco (por el efecto de protección de la CD) y aparecen con la misma intensidad los productos de degradación (a consecuencia de la temperatura).



Gráfica 8.- Cromatogramas de la cinética de degradación de CHL a 37 ° C en presencia de la
A) concentración más baja (0.793×10^{-3}) y B) más alta (10.397×10^{-3}) de HE β CD
Productos de degradación fármaco tr=1.2, 1.8 y 3.15, CHL tr= 4.1.

6.3 OBTENCIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

6.3.1 Descripción de los complejos

Se ha descrito ya la metodología seguida para obtener cada uno de los complejos, con base a estos métodos se describe de manera cualitativa cada una de las especies obtenidas.

Liofilización Suspensión: Pastilla porosa en trazas, color blanco, inodora, de higroscopicidad moderada.

Liofilización Solución: Pastilla porosa en trazas más compacta y un tanto dura, color blanco, inodora, de higroscopicidad mediana.

Amasado: Polvo blanco grisáceo, inodoro, pequeños gránulos.

Coevaporación Met y Et: Cristales en forma de agujas, incoloros, transparentes, con ligero olor a alcohol.

6.3.2 Rendimiento aparente

También es importante reportar el rendimiento y nos referimos a rendimiento haciendo alusión a la cantidad recuperada del total colocado tanto de CHL como de HE β CD al inicio en la formación del complejo, es decir, al porcentaje de materia recuperada después del proceso, visualizando a ambos principio activo y excipiente como un todo. Los datos de rendimiento (aparente) se reportan en la Tabla 7 que a continuación aparece.

Tabla 7.- Porcentaje de rendimiento total del complejo.

Complejo	Peso Inicial colocado (mg) CHL + HE β CD	Peso final complejo (mg)	% Rendimiento
<i>Ama 1 (30 min)</i>	190.2	118.5	62.3
<i>Ama 2 (60 min)</i>	190.7	123.9	65.0
<i>Ama 3 (90 min)</i>	191.3	126.9	66.3
<i>Ama 4 (60 min)</i>	190.5	121.0	63.5
<i>Lio 0 (1:1)</i>	162.4	132.6	81.7
<i>Lio 1 (1:1)</i>	160.6	107.9	67.2
<i>Lio 2 (1:1)</i>	163.2	105.8	64.8
<i>Lio 3 (1:4)</i>	132.6	90.6	68.3
<i>CoevMet</i>	110.1	85.1	77.3
<i>CoevEt</i>	110.7	96.9	87.5

(1:1) y (1:4) relación estequiométrica CHL-HE β CD

La cantidad de complejo recuperado u obtenido es mayor en el método por CoevEt y CoevMet seguidos del liofilizado y por último el amasado. Son lógicos estos resultados ya que en los métodos por coevaporación no puede haber mayor pérdida de materia puesto que solamente se colocan tanto CHL como HE β CD en solución y se dejan reposar hasta que el solvente desaparezca completamente, por liofilización es casi el mismo caso ya que se colocan ambas especies en solución acuosa, eliminando completamente el agua, y como resultado de la liofilización no se pierde gran cantidad de materia. Por amasado se obtienen menores rendimientos totales por las partículas tan finas que se generan, difíciles de recuperar del mortero, como resultado de la fuerza mecánica aplicada.

6.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

Una vez obtenidos los complejos, éstos se caracterizaron por las técnicas ya descritas. Comenzando por un análisis instrumental de carácter cualitativo que incluye Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Espectrofotometría UV/VIS, Espectroscopía IR y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

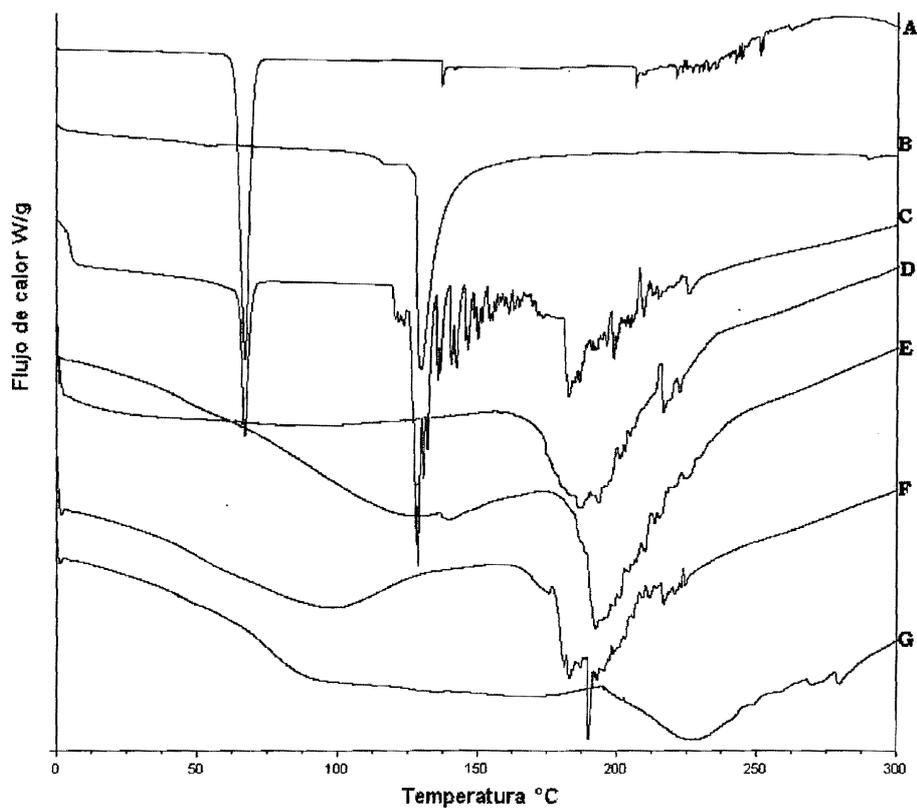
6.4.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) para el CHL, HE β CD y sus complejos de inclusión

Las CDs se encuentran generalmente como hidratos con diferentes contenidos de agua dependiendo de los procesos de preparación y las condiciones de almacenamiento. Las técnicas de TGA y DSC representan entonces una de las primeras elecciones analíticas para la caracterización fisicoquímica del estado sólido de las CDs en términos de liberación de energía por el contenido de agua.

Como ya se había mencionado, los complejos de inclusión formados con fármacos y CDs son generalmente preparados en medio acuoso, así que pueden considerarse como sistemas ternarios agua /fármaco /CD (24).

Para nuestro caso en específico al preparar los complejos por tres métodos: liofilización, coevaporación y amasado, se colocaron tanto la HE β CD como el CHL en los siguientes medios: agua, metanol y etanol, y una mezcla metanol-agua 50:50 respectivamente, entonces se obtuvieron los complejos correspondientes bajo la premisa de que éstos representaban un sistema ternario: solvente / CHL / HE β CD.

El sistema solvente / CHL / HE β CD está presente en todos los complejos obtenidos y como era de esperarse, por las características de las CDs y su capacidad de encapsular, enmascarar y mejorar la estabilidad de los compuestos, en este caso la formación de los complejos se hizo evidente por la desaparición del punto de fusión correspondiente al CHL. De este modo, podemos decir que la HE β CD logró su cometido al incluir al fármaco en su cavidad y así protegerlo de la degradación por calor. La Gráfica 9 muestra los termogramas obtenidos para los estándares (CHL, HE β CD), una mezcla física y los complejos de inclusión obtenidos.



Gráfica 9 .- Termogramas obtenidos mediante un DSC Refrigerador Cooling System TA Instruments NRTL LISTED MET[®], con un flujo de nitrógeno de 50 ml/min y una rampa de calentamiento 0-300 ° C, a una velocidad de calentamiento de 10 ° C/min
A-CHL-, B-HE β CD-, C-Mezcla Física-, D-Amasado-, E-CoevMet-, F-CoevEt-, G-Liofilizado-.

Cabe mencionar que el análisis térmico es utilizado como un método de rutina en determinaciones cualitativas rápidas. En todos los casos, el camino a seguir es el mismo, la comparación del comportamiento térmico entre los componentes solos, su mezcla física y los complejos de inclusión preparados.

Se puede ver que en el termograma correspondiente al estándar de CHL (A) aparece el punto de fusión de éste, a los 68.4 ° C, temperatura muy cercana a la reportada en la literatura de 64-69 ° C (14). También se nota con claridad el punto de fusión de la HE β CD (B) a los 132.8° C, temperatura acorde con el comportamiento de los derivados del almidón como lo es el caso de las CDs. En el análisis de la mezcla física (C) se aprecian ambos puntos de fusión notándose una disminución en la intensidad de la señal emitida por el CHL así como otras señales endotérmicas cercanas al punto de fusión de la HE β CD atribuidas a una interacción entre el excipiente y el fármaco.

El termograma (D) muestra el complejo de inclusión obtenido por el método de amasado en el cual se nota ha desaparecido completamente el punto de fusión del CHL así como el de la HE β CD, para mostrar un comportamiento totalmente diferente, con un pico posiblemente emitido por el complejo, muy cercano a los 200 ° C. Los comportamientos de E y F corresponden a los complejos obtenidos por coevaporación en etanol y metanol respectivamente, ambos presentan un comportamiento atribuido a la pérdida de agua e incluso al punto de evaporación de los dos alcoholes, de igual manera aparece la posible fusión del complejo próxima a los 200 ° C.

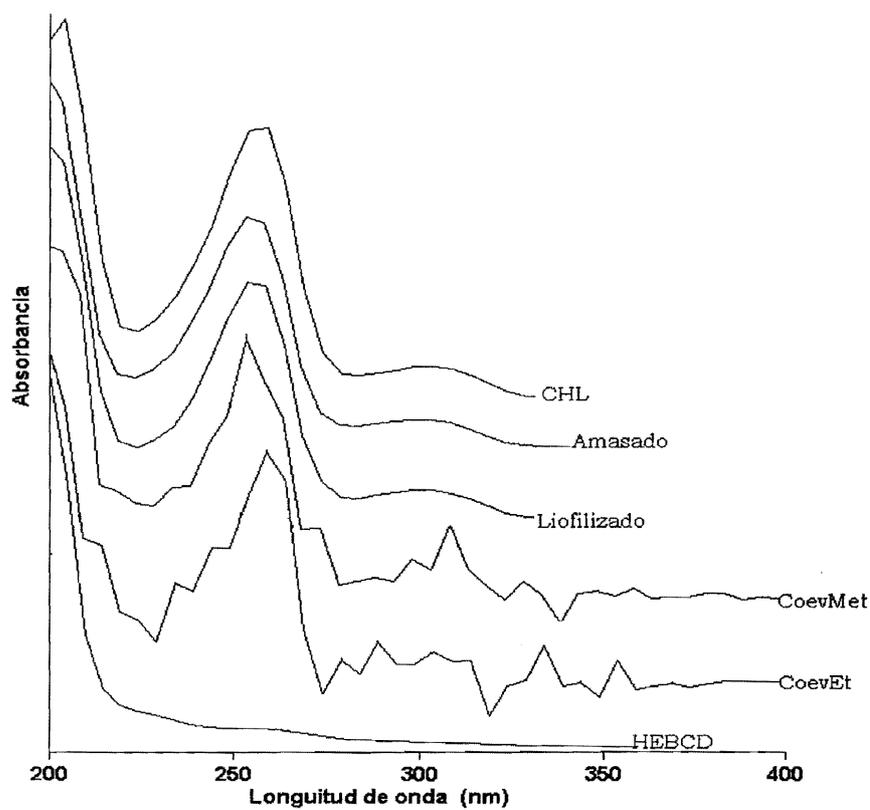
Y finalmente el termograma G en donde el perfil vuelve a mostrar que han desaparecido los puntos de fusión del CHL y de la HE β CD, para dar lugar al del complejo formado por el método de liofilizado con un pico endotérmico cercano a los 230 ° C.

6.4.2 Espectrofotometría UV/VIS

Se realizó un análisis espectrofotométrico en el rango del ultravioleta para caracterizar los complejos obtenidos por los tres métodos y establecer un efecto o cambio en el espectro de absorción del CHL per se, ya que las CDs, en particular la HE β CD, no absorbe en el rango del ultravioleta de 200-400 (nm).

La Gráfica 10 tiene representados los diferentes espectros obtenidos de los estándares y de los complejos de inclusión solubilizados en la mezcla Buffer de fosfatos pH 7.4 – metanol (80:20). Está identificado el espectro del CHL donde concuerdan los máximos obtenidos con los reportados en la literatura (254 y 303 nm), así como el espectro de la HE β CD que deja claro que no absorbe en el rango ultravioleta.

Los espectros dejan ver que hubo un desplazamiento del máximo de absorción hacia longitudes de onda mayores, es decir se presentó un efecto batocrómico con la presencia de HE β CD, tanto en mezcla física como en los complejos de inclusión. Esto se debe probablemente a la alta densidad electrónica dentro de la cavidad hidrofóbica de la CD, lo cual crea un campo parcial que moviliza a los electrones π excitables del anillo cromofórico del CHL cuando éste es incluido dentro de la cavidad de la HE β CD. (35)



Gráfica 10.- Espectros de absorción UV para los estándares (CHL y HE β CD) así como de los complejos de inclusión. Obtenidos mediante un Espectrofotómetro UV/VIS., Varian, mod. Cary IE 95031003.

6.4.3 Espectroscopia Infrarrojo (IR)

Al igual que la DSC ésta es una determinación cualitativa en la cual únicamente se pretende caracterizar los complejos obtenidos. En principio la espectroscopia infrarrojo (IR) puede ser uno de los más apropiados.

Por medio de espectroscopia se nota que la región del grupo carbonilo correspondiente al ácido carboxílico del CHL muestra una fuerte absorción a los 1731 cm^{-1} , la cual no aparece en el espectro correspondiente a la HE β CD y se ve manifestado con menor intensidad en la mezcla física pero con un desplazamiento hacia menores longitudes de onda (1779 cm^{-1}).

Analizando la anchura de la banda correspondiente al grupo carboxílico del CHL ubicada en los 1731 cm^{-1} con respecto a las bandas de la mezcla física y los complejos obtenidos tenemos que hay un efecto de traslapamiento en esta región debido a la presencia de una banda muy intensa a los 1750 cm^{-1} en promedio correspondiente a los enlaces δ -HOH de las moléculas de agua de la HE β CD. Se puede ver que el máximo de la banda del grupo carbonilo muestra un corrimiento en los complejos hacia menores frecuencias dentro del espectro correspondiente para el CHL. Este hecho que ha sido reportado para otros sistemas se atribuye a la ruptura de fuertes enlaces de hidrógeno en el cristal y a su reemplazamiento por una asociación menos intensa (36).

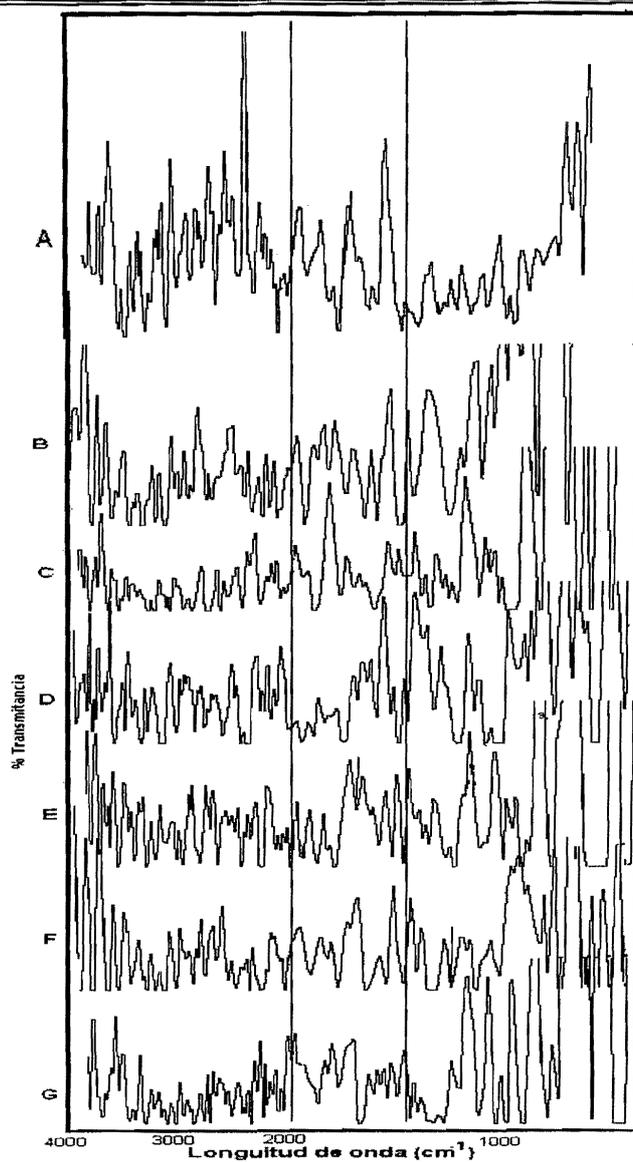
De manera general en los complejos obtenidos por los tres diferentes métodos, se muestra un efecto similar en el cual la señal emitida por el grupo carbonilo se ve desplaza a longitudes de onda menores como se muestra en la Gráfica 11.

En principio la espectroscopia Infrarrojo (IR) es uno de los métodos más adecuados para adentrarnos en las interacciones que ocurren a nivel molecular, a través de la detección de cambios en las bandas que pueden estar relacionados con el proceso de complejación.

En la mayoría de los casos el cociente entre la relación molécula hospedero/ molécula huésped es muy alto y en consecuencia las bandas IR características de las CDs (especialmente las

correspondientes a los hidroxilos) no cambian mucho por efecto de la interacción con la molécula huésped puesto que sólo una pequeña fracción de ellos es perturbada como es nuestro caso y se vislumbra en la Tabla 8, en donde las bandas correspondientes a los grupos hidroxilos de la HE β CD no muestran una tendencia clara en su corrimiento, no hay modificaciones significativas detectadas. Sin embargo es importante mencionar que los posibles cambios por la contribución de grupos OH correspondientes al ácido carboxílico del CHL pueden estar enmascarados por la enorme cantidad de hidroxilos de la HE β CD (21 por molécula) y la mayoría de ellos no son perturbados por la presencia del CHL.

Por otro lado algunas de las bandas de la molécula huésped es decir de la molécula a incluir pueden verse afectadas por la interacción con la CD a nivel molecular y estar enmascaradas por la relativa magnitud alta de las bandas de las CDs. Estudios por IR han reportado que para los complejos formados con CDs en la mayoría de los casos en los cuales la molécula a incluir posee un grupo carbonilo, este grupo presentará una banda estrecha pero de alta intensidad, el cual es muy sensible a las interacciones por enlaces puentes de hidrógeno (36).



Gráfica 11.- Espectros Infrarrojo A -CHL-, B - HEβCD-, C -Mezcla Física-, D -Amasado-, E - CoevMet-, F -CoevEt-, G -Liofilizado-.

En la Tabla 8 se muestra el desplazamiento ocurrido en la banda de absorción de los grupos funcionales más representativos de las entidades químicas (el CHL y la HE β CD), en cada uno de los complejos y en la mezcla física con respecto a los estándares.

Tabla 8.- Efecto de la complejación de CHL con HE β CD en la banda de absorción infrarrojo.

Muestra Analizada	CHL (cm ⁻¹)			HE β CD (cm ⁻¹)	
	<i>Ácido Carboxílico</i>	<i>Amina 3ría</i>	<i>Halogenuro</i>	<i>Alcohol</i>	<i>Éter</i>
CHL	1731	1257		---	---
HEβCD	----	----	----	1089	835
M. F.	1779	1281	1142	1094	855
Amasado	1741	1209		1085	859
CoevMet	1736 / 1635	1233		1065	850
CoevEt	1640	1243		1123	835
Liofilizado	1741	1262		1051	864

6.4.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Con respecto a Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) como análisis de carácter cualitativo a continuación se muestran las micrografías correspondientes a cada una de las muestras analizadas.

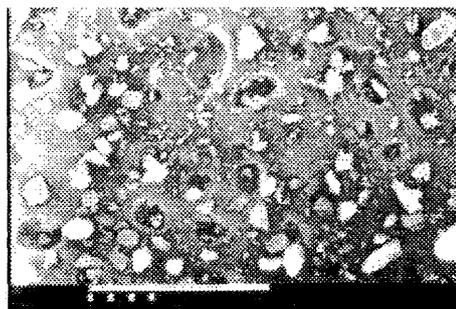


Figura A.- Cristales CHL 45X



Figura B.- Cristal CHL 450X

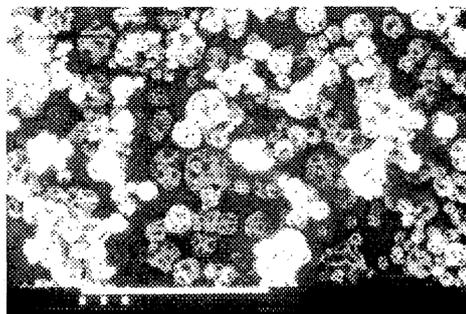


Figura C.- Unidades de HE β CD 450X

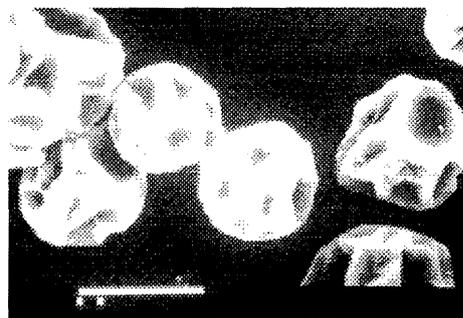


Figura D.- Unidades de HE β CD 3000X

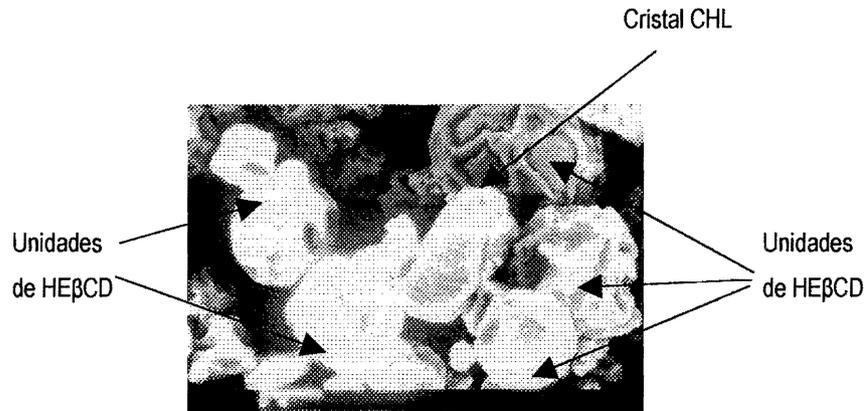


Figura E.- Mezcla física CHL/ HEβCD 1500X

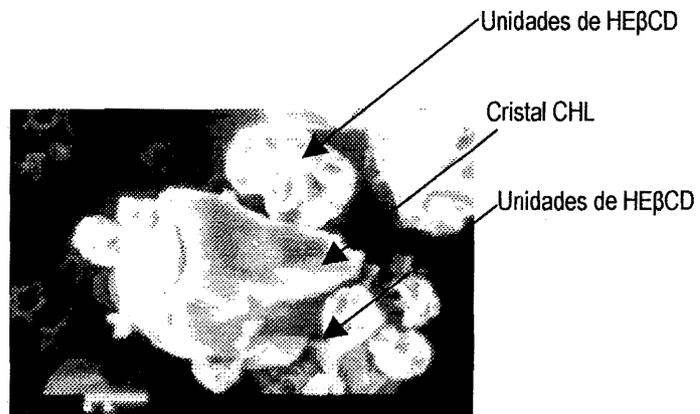


Figura F.- Mezcla física CHL/ HEβCD 1500X

En el caso del CHL (Figura A) se logran ver los pequeños cristales de morfologías diversas correspondientes al fármaco antineoplásico y en la Figura B se muestra la morfología más cercana con un aumento de 450 X de uno de los cristales de CHL de aproximadamente 200 μm , sin embargo podemos encontrar cristales de mayor o menor tamaño, para la HE β CD (Figura C) a 450 X se logró visualizar la morfología de ésta como pequeñas esferas pero con apariencia rugosa o con pliegues que de manera segura da su composición por las unidades de glucopiranosas en este caso son 7, el tamaño y su morfología se determinan mejor en la micrografía, en la Figura D, en la que la dimensión aproximada de una unidad de HE β CD es de 10 μm . De tal manera que ya con una idea de las dimensiones de ambos estándares al analizar la mezcla física es congruente encontrar a ambas especies. En ambas micrografías, Figura E y Figura F, se ven cristales de distintos tamaños de CHL rodeados por varias unidades de CD.

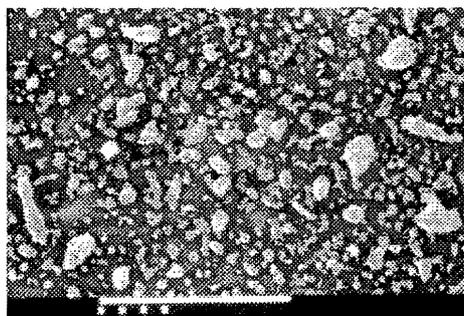


Figura G.- Complejo obtenido por amasado 45X

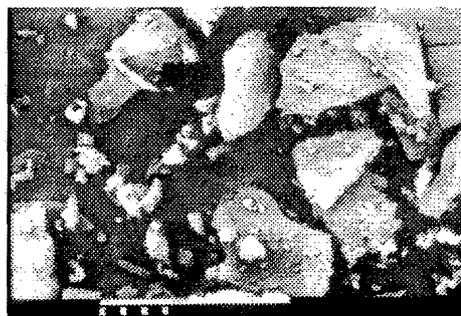


Figura H.- Complejo obtenido por amasado 450X

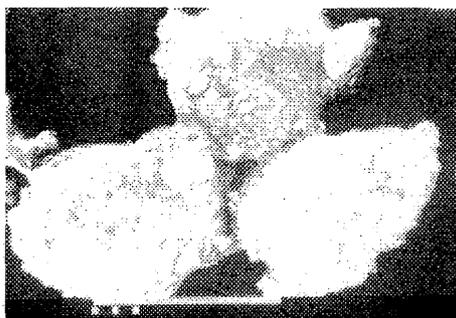


Figura I.- Complejo obtenido por amasado 1000X

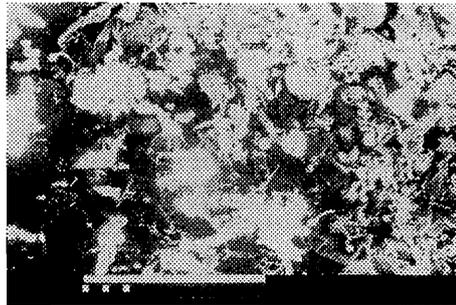


Figura J.- Complejo obtenido por liofilizado (suspensión) 1000X



Figura K.- Complejo obtenido por liofilizado (solución) 1000X

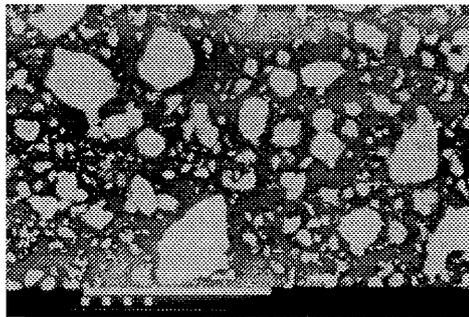


Figura L.- Complejo obtenido por CoevEt 45X

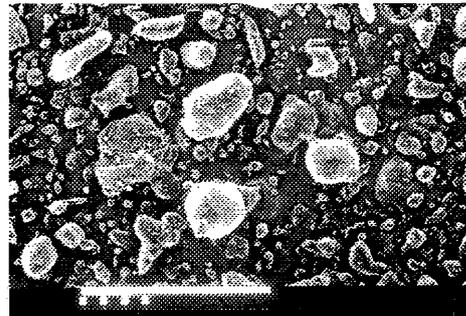


Figura M.- Complejo obtenido por CoevMet 45X

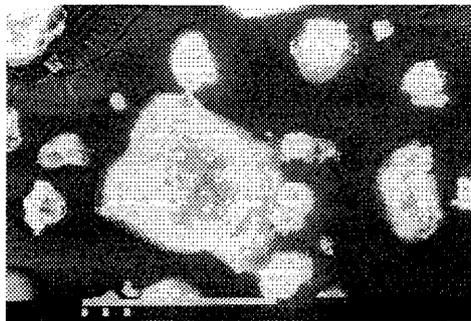


Figura N.- Complejo obtenido por CoevEt 1500X

Analizando los complejos de inclusión obtenidos por los distintos métodos tenemos que en general se dejan de observar dos especies químicas diferentes como en el caso de la mezcla física (M.F.) para dar paso a una nueva morfología, lo que se atribuye a la formación del complejo.

En el caso del complejo obtenido por amasado como se describió antes, se obtuvieron pequeños gránulos que se dejan ver en la micrografía, Figura G, de los cuales se realizó un acercamiento a un aumento de 450 y 1000 X (Figuras H e I) en donde se visualiza mejor su morfología y un tamaño aproximado de entre 100 y 150 μm .

Los complejos obtenidos por liofilización muestran estructuras totalmente amorfas con ninguna tendencia, cuando el CHL fue agregado en suspensión en la formación del complejo se obtuvo una morfología en trazas irregulares (Figura J) y cuando fue agregado en solución se obtuvieron una especie de redes (Figura K) en ambos casos por los análisis previos como DSC, UV, IR y HPLC sabemos que el complejo se ha formado pero con menor efectividad que en los otros métodos.

Por el método de coevaporación en Etanol y Metanol (Figuras L y M respectivamente) se ven en ambos casos cristales de diversos tamaños, de morfología muy similar entre los dos alcoholes utilizados. Haciendo un acercamiento a 1500 X para el caso del CoevEt (Figura N) la morfología o estructura encontrada es muy similar a los gránulos obtenidos por amasado con una superficie rugosa y con un tamaño de 100 μm aproximadamente.

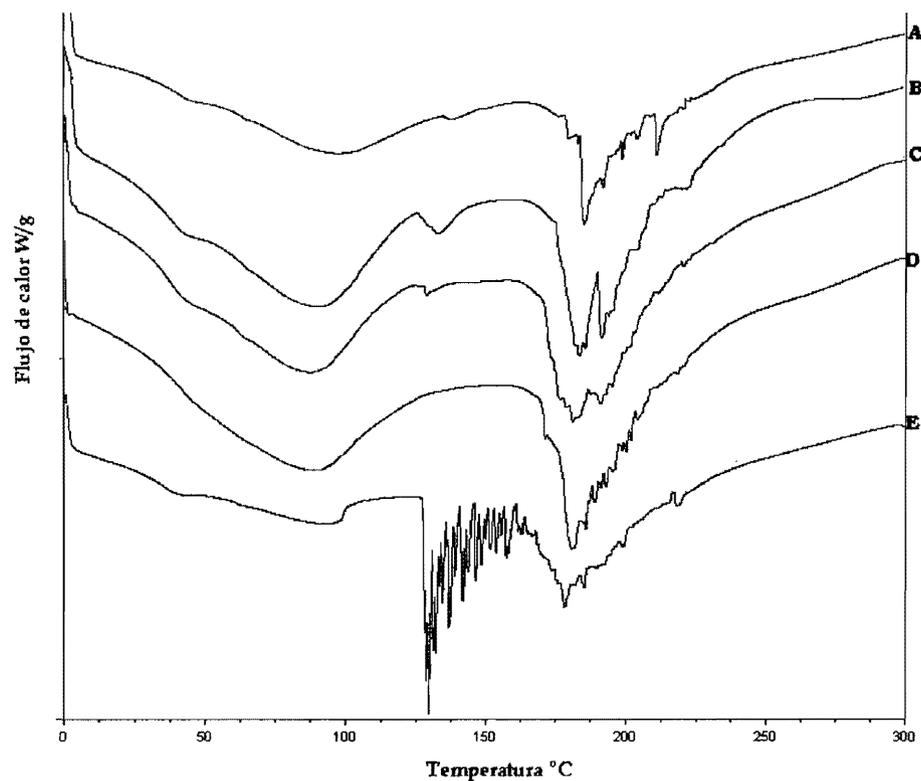
La Microscopía Electrónica de Barrido, como tal, no se considera una técnica primaria y/o confiable para la determinación o caracterización de una sustancia o de una nueva especie, sin embargo la consideramos necesaria y de utilidad, pues como ha dejado ver, se pueden esbozar de manera visual cambios en la morfología o características particulares de la especie que dan evidencia de su comportamiento a lo largo de la experimentación (formación de los complejos).

6.4.5 Estudio del tiempo de amasado

En la formación del complejo por este método, los análisis por DSC, HPLC, Espectrofotometría UV/VIS y Microscopía Electrónica de Barrido mostraron que existe un tiempo óptimo de amasado, que si se sobrepasa, se incrementa la degradación del CHL y por tanto disminuye la cantidad presente de éste en el complejo formado.

6.4.5.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

En los termogramas de la Gráfica 12 se muestra una disminución en el pico endotérmico correspondiente al complejo de HEBCD-CHL a medida que aumenta el tiempo de amasado. La siguiente figura hace referencia a lo descrito. Se puede decir que un tiempo de 60 min es mejor.

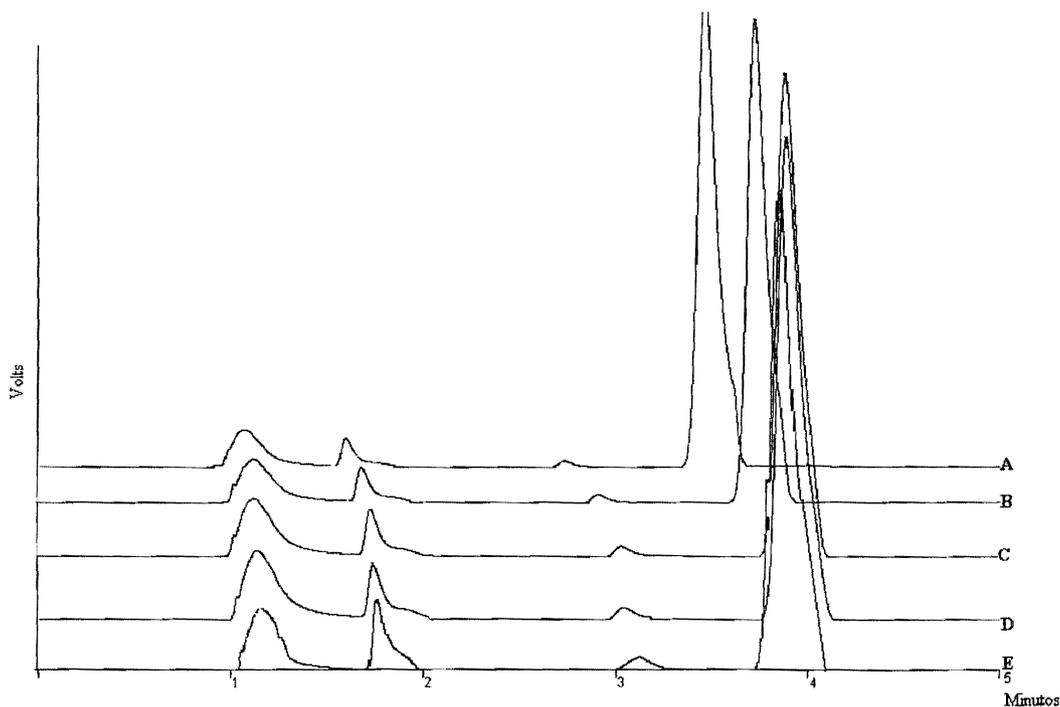


Gráfica 12.- Termogramas obtenidos mediante un DSC Refrigerador Cooling System TA Instruments NRTL LISTED MET[®], con un flujo de nitrógeno de 50 ml/min y una rampa de calentamiento 0-300 °C, A-30 min.-, B- 60 min.-, C-90 min.-, D-120 min.-,E-150 min.-.

6.4.5.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

Por medio de HPLC se cuantificó la cantidad de CHL complejo a los diferentes tiempos de amasado y por medio de los cromatogramas de manera cualitativa se determinó una relación directamente proporcional entre el tiempo transcurrido en el proceso de amasado y el aumento de los productos de degradación del CHL, es decir que a mayores tiempos de amasado es mayor la degradación del antineoplásico y por tanto menor su complejación, hecho que se determinó por la

tasa de complejación de manera cuantitativa a los distintos tiempos por medio de un análisis cromatográfico por HPLC. La Gráfica 13 muestra cómo aumentan las señales emitidas por los productos de degradación del CHL conforme lo hace el tiempo de amasado. Los cromatogramas obtenidos de las muestras a diferentes tiempos de amasado muestran que la cantidad de CHL complejado es menor a mayor tiempo de amasado pues los picos de los productos de degradación aumentan con el tiempo de amasado tal y como se muestra a continuación.



Gráfica 13 .- Cromatogramas obtenidos mediante un HPLC ProStar 210, Varian, por medio de una columna C18 fase reversa de 25 cm de longitud, diámetro interno 4.6 mm., tamaño de partícula 5 μ m, empleando como fase móvil acetonitrilo:agua:ácido acético 59:40:1.
A -30 min.-, B - 60 min.-, C -90 min.-, D -120 min.-, E -150 min.-.

Para corroborar este hecho se incluye la Tabla 9, en la cual se reportan las áreas bajo la curva de los productos de degradación (puesto que no se realizó curva para cuantificarlos) a los diferentes tiempos, con el fin de evidenciar el efecto del periodo de aplicación de fuerza mecánica sobre el sistema, en la creciente aparición o incidencia de productos de degradación.

Tabla 9.- Áreas bajo la curva de los posibles productos de degradación del CHL

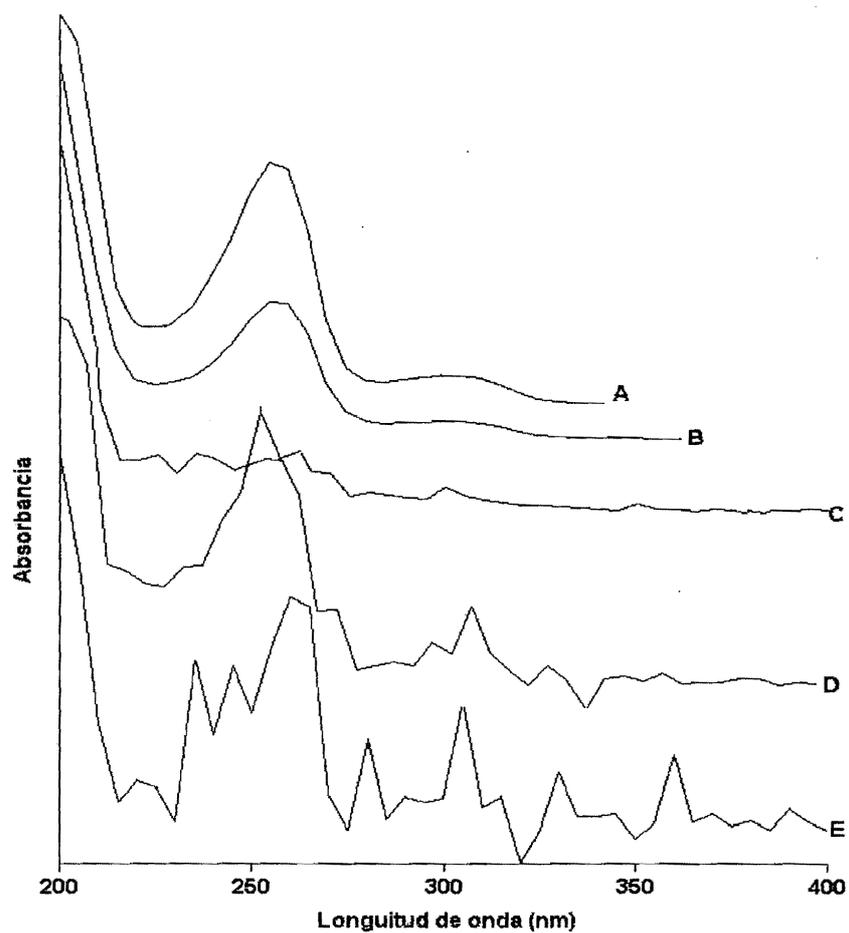
Tiempo de amasado (min)	Tiempo de retención (min)				
	1.069	1.597	2.065	2.735	3.5-4.0 CHL
	Área bajo la curva				
30	1037046	424409	2280	106338	9715366
60	1307092	503502	4006	133026	9723123
90.	1386051	528069	4736	147563	8815405
120	1530088	595028	6650	161521	8348264
150.	1465474	615915	10007	164329	8258701

Como se muestra en los datos tabulados, a medida que transcurre el tiempo de amasado aumentan las áreas bajo la curva de todos los compuestos identificados por medio del cromatograma a diferentes tiempos de retención, con excepción del CHL, el cual tiene una variación a los diferentes tiempos, que podemos explicar por el proceso de complejación y el equilibrio dinámico que existe en la formación del complejo así como a la degradación que sufre el CHL por efecto del amasado.

6.4.5.3 Espectrofotometría UV/VIS

En el análisis por espectrofotometría, los espectros obtenidos a los diferentes tiempos (Gráfica 14) dejan ver que hasta la 1ra hora de amasado el espectro del complejo corresponde al espectro esperado en donde sólo se ven los dos máximos de absorción del CHL a 255 nm y 305 nm ya que la HE β CD no absorbe en el rango del ultravioleta (UV). Pasados 60 minutos y hasta las dos horas y media en el amasado del complejo comienzan a aparecer otros máximos de absorción a diferentes longitudes de onda que corresponden a los productos de degradación.

Lo que significa que existe un tiempo óptimo para amasar el complejo y que pasado éste no se garantiza la existencia del CHL como tal, al 100 % de colocado en un inicio. Se puede aseverar que se forma el complejo existiendo clorambucilo (CHL) como tal y productos de degradación.



Gráfica 14.- Espectros de absorción UV para los diferentes tiempos de amasado obtenidos mediante un Espectrofotómetro UV-Vis.; Varian®, mod. Cary IE 95031003. A -30 min.-, B -60 min.-, C -90 min.-, D -120 min.-, E -150 min.-.

6.4.5.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Por medio de Microscopía Electrónica de Barrido se tomaron micrografías a los 5 tiempos de amasado. Las siguientes son los resultados obtenidos por medio de este análisis, se puede observar la textura del complejo de inclusión al ir incrementando el tiempo y con ello al aumentar la temperatura en el sistema (el mortero), por efecto del trabajo o fuerza mecánica ejercida. La superficie cambia de manera considerable notándose que a medida que el complejo se forma, la estructura de la nueva especie va engrosando y tomando dimensiones más grandes y diferentes.

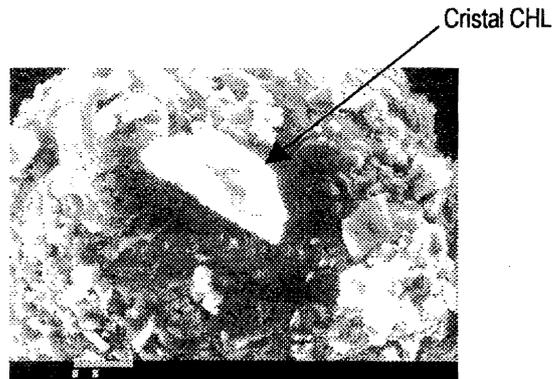


Figura O.- Tiempo Amasado 30 min 1500X

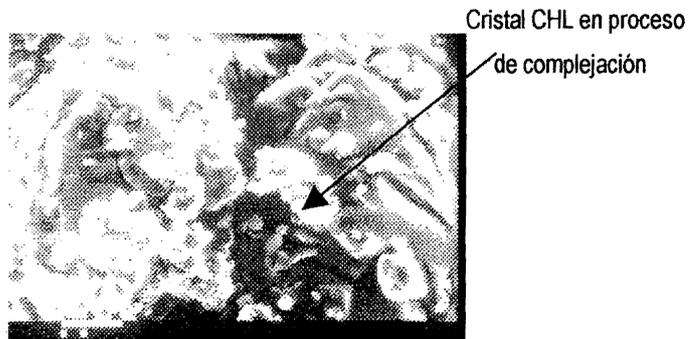


Figura P.- Tiempo Amasado 60 min 1500X

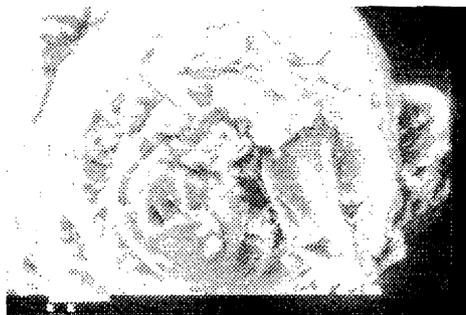


Figura Q.- Tiempo Amasado 90 min 1500X

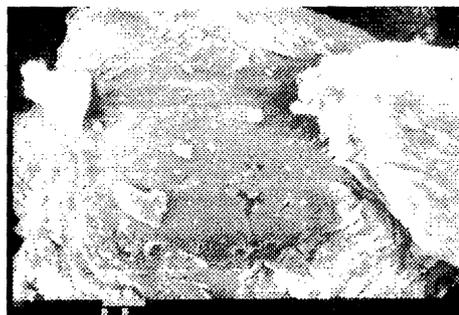


Figura R.- Tiempo Amasado 120 min 1500X

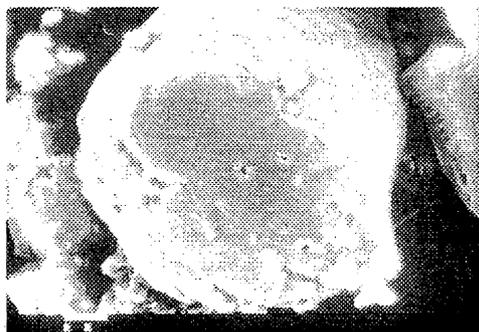


Figura S.- Tiempo Amasado 150 min 1500X

Las micrografías muestran cómo se da un cambio en la estructura de los cristales de CHL y la HE β CD a medida que avanza el tiempo de amasado.

En la Figura O se puede ver claramente un cristal del fármaco al centro de una estructura amorfa que se atribuye a conglomeración de unidades de CD, aunque no hay la presencia de una entidad química totalmente diferente. Para cuando han transcurrido 60 min de amasado (Figura P) aún se visualiza la misma conglomeración de unidades de CD pero ahora ya más compactas y la presencia del cristal de CHL comienza a ser menos nítida por efecto del proceso de complejación. En la Figura Q donde se muestran 90 min vemos ya la presencia de una estructura diferente con superficie rugosa en la que se muestran imperfecciones, como pequeños trozos de cristal incrustados en todo el conglomerado de CD, en general y tomando un campo mayor de análisis, la

nueva especie química muestra irregularidades en su morfología pero con clara tendencia a la esfericidad y presentan un tamaño aproximado de 200 μm . En la micrografía de la Figura R a las 2 hrs la superficie de la estructura es más lisa que en el tiempo anterior pero sigue presentando imperfecciones. El que haya mayor superficie lisa se atribuye al efecto de la fricción al estar amasando. Y finalmente en la micrografía de 2 horas y media (Figura S) tenemos una estructura muy similar a las de D y E pero mucho más lisa. En el caso del método de amasado, se pasa de una simple mezcla física a la formación del complejo como tal.

Por lo descrito podemos aseverar que el tiempo de amasado influye en la formación del complejo, tanto en morfología como en cantidad de fármaco complejoado de manera exitosa (no degradado), ya que las distintas determinaciones instrumentales arrojaron diferentes resultados a diferentes tiempos de amasado.

El segundo paso en la caracterización de los complejos es un análisis de carácter cuantitativo, el cual se llevó a cabo por determinaciones en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés), para así calcular la eficiencia de encapsulamiento.

6.4.6 Tasa de complejación (HPLC)

Se determinó la cantidad de CHL encapsulado o complejoado en cada uno de los complejos obtenidos, mediante un tratamiento con mezcla buffer de PO_4 pH 7.4 - metanol (80:20) y posterior centrifugación, la Tabla 10 muestra los resultados obtenidos en donde está reportado el porcentaje de CHL complejoado (no degradado) con respecto a la cantidad total que se había colocado en un inicio.

Tabla 10.- Eficiencia de Encapsulamiento para CHL en los complejos.

Complejo	Peso inicial CHL (mg)	CHL total determinado en el complejo (mg)	% encapsulado
Ama 1 (30 min)	20.8073	18.5580	89.1902
Ama 2 (60 mi.)	21.7807	19.2613	88.4328
Ama 3 (90 min)	22.6933	16.8759	74.3650
Ama 4 (60 min)	20.1380	16.7593	83.2221
Lio 0 (1:1)	27.6518	5.7136	20.6627
Lio 1 (1:1)	18.0391	3.2209	17.8551
Lio 2 (1:1)	21.9937	3.8796	17.6396
Lio 3 (1:4)	15.4229	2.5536	16.5572
CoevMet	17.5828	14.2675	81.1450
CoevEt	22.6234	16.2620	71.8816

(1:1) y (1:4) relación estequiométrica CHL-HEBCD

Considerando estos porcentajes podemos decir que: se encontró mayor porcentaje de CHL en el complejo formado por el método de amasado (en promedio 80%); en la Tabla 10 se muestran 4 determinaciones, éstas corresponden como se ve, a diferentes tiempos de amasado en los que en general, a medida que éste aumenta, el porcentaje del fármaco disminuye. Por lo descrito en la caracterización cualitativa por DSC, UV y SEM corroboramos mediante HPLC que a mayores tiempos de amasado el CHL se ve disminuido y sus productos de degradación aumentados, con lo cual precisamos que en los cuatro diferentes tiempos el complejo está formado, solo que con presencia de mayores cantidades de productos de degradación a mayores tiempos.

Seguido de este complejo encontramos a los obtenidos por CoevMet y CoevEt donde el obtenido a partir de metanol resultó con mayor porcentaje con respecto al otro alcohol, debido a su

constante dieléctrica ($\epsilon=32.6$ metanol y $\epsilon=24$ etanol a 25°C) (32) de magnitud más grande, lo que favoreció la formación del complejo. En ambos casos se asevera la formación de la nueva especie puesto que si ésta no estuviese presente, el CHL simplemente estaría degradado casi en un 100%.

Aunque la diferencia es pequeña en los porcentajes de CHL encapsulado para cada uno de los alcoholes, si se ve favorecido el obtenido a partir de metanol.

Con respecto a los liofilizados, estos complejos mostraron los valores menores de eficiencia al encapsular entre 16-20 %, ya que como se ha mencionado mediante este método se obtienen complejos no reales.

Para este caso en particular, también se evaluó el efecto que se tiene al agregar el CHL en suspensión o en solución a la solución de HE β CD, se visualiza que cuando el fármaco se agrega en suspensión (Lio 0 y Lio 1) a una solución previamente preparada de HE β CD, se tienen relativamente mayores porcentajes de encapsulación, que cuando es agregado el CHL disuelto (Lio 2 y Lio 3) a la solución de ciclodextrina. Cabe mencionar que cuando se agregó el fármaco en suspensión, este se incorporó a la solución de CD de manera lenta hasta que sólo se visualizaban pequeños polvos de CHL suspendidos a diferencia de cuando se agregó en solución, ya que al poner en contacto ambas soluciones (CHL y HE β CD) se formaba una pasta blanca muy viscosa que permanecía suspendida y la solución se enturbiaba; lo que nos da la pauta para establecer cuál de las dos vías nos daría mejores rendimientos por liofilización, ya que en el último caso no se estaba promoviendo la total interacción entre ambas especies químicas para formar el complejo; no así si comparamos con los otros métodos pues éstos claramente lograron atrapar una cantidad mayor del fármaco antineoplásico.

Dentro de este mismo estudio en la formación del complejo por medio de liofilización se agregó CHL en diferentes proporciones, del Lio 0 al Lio 2 se agregaron cantidades equimolares 1:1 de CHL y HE β CD, en el Lio 3 la proporción es 1:4 de CHL y HE β CD. Analizando los porcentajes no se nota una diferencia de gran magnitud lo que nos explica que realmente la estequiometría del complejo es 1:1 ya que aunque nosotros agregáramos más cantidad de HE β CD el porcentaje encapsulado es relativamente el mismo.

6.5 ESTABILIDAD

Se reportan a continuación los estudios de estabilidad realizados a los complejos en estado sólido. Inicialmente se pretendía realizar estos estudios para los tres complejos obtenidos por diferentes métodos de preparación pero de acuerdo a la eficiencia de encapsulamiento (ya reportada en el apartado 6.4.6) se decidió realizarlo con los complejos obtenidos por Amasado y CoevMet para el estudio basado en la NOM-073 y posteriormente a los complejos por Amasado y CoevEt para el estudio propuesto por nosotros. Los resultados de los dos estudios se muestran en las tablas 11 y 12 donde se concentran los resultados obtenidos.

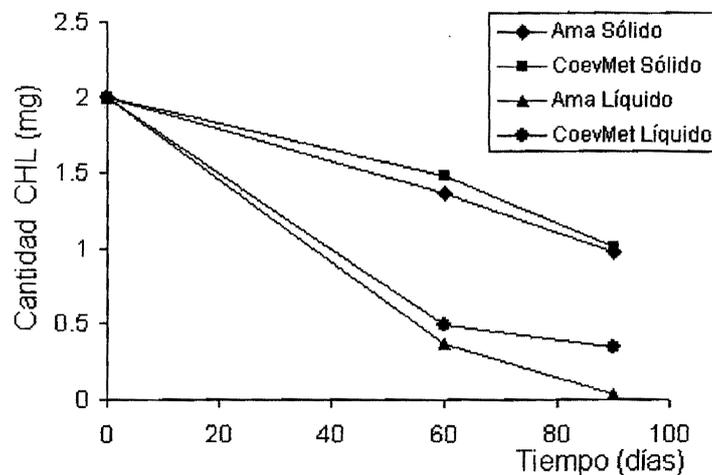
Tabla 11.- Degradación de los complejos en estado sólido y en solución acuosa de acuerdo a las condiciones de estabilidad acelerada de la NOM-073.

<i>Tiempo de análisis (días)</i>	<i>Cantidad de CHL (mg)</i>			
	<i>Estado Sólido</i>		<i>Estado Liquido</i>	
	<i>Amasado</i>	<i>CoevMet</i>	<i>Amasado</i>	<i>CoevMet</i>
0	2.00	2.00	2.00	2.00
30	0.00	0.00	0.00	0.00
60	1.3613	1.4842	0.3682	0.4905
90	0.9731	1.0140	0.0315	0.3476

Tabla 12.- Degradación de los complejos en estado sólido de acuerdo a las condiciones de estabilidad establecidas en el trabajo.

Tiempo de análisis (días)	Cantidad de CHL (mg)			
	T ambiente		4 ° C	
	Amasado	CoevEt	Amasado	CoevEt
0	1.74	1.34	1.74	1.34
7	1.6318	1.2336	1.6803	1.2878
14	1.3668	1.0227	1.6713	1.2016
21	1.3253	0.9972	1.4838	1.1330
28	0.8273	0.8680	1.4826	0.9829
35	0.6053	0.6342	0.8398	0.5798
42	0.2053	0.0196	0.2763	0.0117

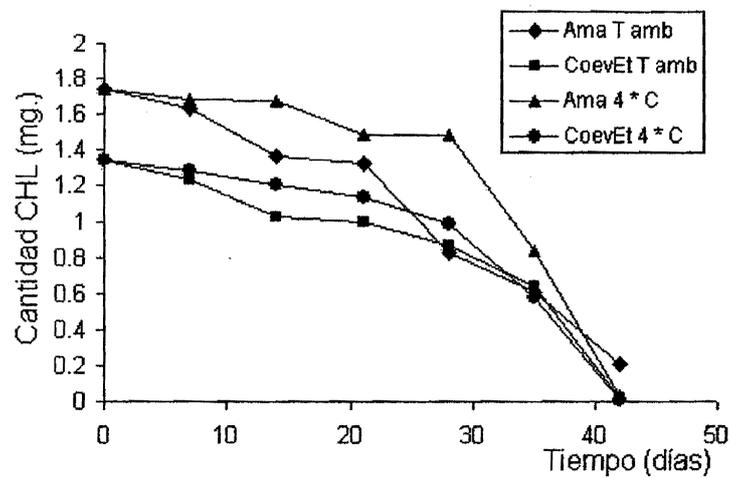
Para el primer estudio, al leer por HPLC las muestras a los 30 días no se obtuvo un pico cromatográfico para el CHL por ello no se reportan, no hemos encontrado explicación para ello. Sin embargo con los datos obtenidos a los 60 y 90 días así como el inicial, se construyó un perfil de degradación para las diferentes condiciones y muestras; el cual se muestra en la Gráfica 15, claramente se visualiza que posiblemente se hubiera seguido una tendencia lineal en la degradación, pero esto considerando la falta de un dato.



Gráfica 15.- Perfil de estabilidad o degradación para los complejos por Amasado y CoevMet de acuerdo a la estabilidad acelerada de la NOM-073.

Se observa que en los complejos que se sometieron al estudio en su forma sólida se encontraron mayores cantidades de CHL, lo que nos da evidencia de una mayor estabilidad de éstos con respecto a los estudiados en solución acuosa.

De la misma manera se construyeron los perfiles para el estudio propuesto, este seguimiento se realizó finalmente sólo en estado sólido para ambos complejos, sólo que a dos temperaturas diferentes y a humedad ambiente. Estos perfiles se dan a conocer en la Gráfica 16, que aparentemente muestra una tendencia lineal hasta antes de transcurrido un mes, pasado este tiempo la pendiente cambia dramáticamente, observándose una aceleración en la degradación del principio activo. El comportamiento es muy similar para los cuatro sistemas. Siendo menor el intervalo de degradación a 4 ° C.



Gráfica 16.- Perfil de estabilidad o degradación para los complejos por Amasado y CoevEt de acuerdo a las condiciones de estabilidad establecidas en el trabajo.

6.6 PERMEACIONES

6.6.1 Solubilidad del CHL en solución de HE β CD

Tabla 13.- Valores de solubilidad para CHL en solución de HE β CD 5 %.

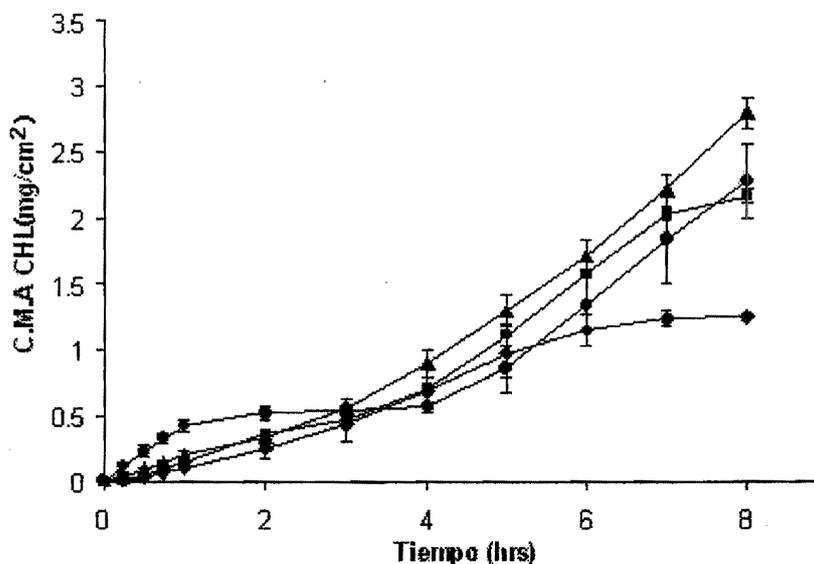
Solubilidad CHL (mg/ml)		
0.1421	Promedio	0.1239
0.1191	SD	0.0164
0.1104		

El objetivo de esta determinación fue asegurar que durante la permeación se mantienen condiciones sink. Al establecer condiciones sink la principal condición es no rebasar el 15% de la solubilidad del fármaco, en la Tabla 13 se muestran los resultados y el promedio de la solubilidad de CHL; para en este caso (15%) $C_s = 0.01859$ mg/ml y en las permeaciones realizadas la máxima concentración que se llegó a determinar fue de 0.01813 mg/ml, por lo tanto se mantuvieron las condiciones sink y así aseguramos que no se saturó el medio receptor para evitar posibles repercusiones en las determinaciones.

6.6.2 Estudios de Permeación *in vitro*

Para realizar las permeaciones se eligieron los complejos obtenidos por el método de Amasado y CoevMet por ser los que presentan las tasas más altas de encapsulación (88 y 81 % respectivamente). Los resultados se muestran a continuación.

La Gráfica 17 muestra los perfiles de permeación de las 4 muestras analizadas: CHL, Mezcla Física, y los complejos obtenidos por Amasado y CoevMet.



Gráfica 17.- Perfiles de permeación en mucosa bucal porcina a 37 °C: ◆ CHL, ● Mezcla Física CHL-HEβCD, ■ Complejo CHL-HEβCD obtenido por el método de amasado, ▲ Complejo CHL-HEβCD obtenido por CoevMet. Cantidad máxima acumulada (C.M.A.) con respecto al tiempo para cada caso n= 6 (veces que se realizó cada permeación).

De acuerdo a lo mostrado en la Gráfica 16, la permeación del CHL se ve favorecida cuando éste se combina con la HEβCD (mezcla física). De hecho, al observar los valores de la cantidad total acumulada en el receptor después de 8h de permeación (Tabla 15) y los valores de flujo mostrados en la Tabla 16, es evidente que la presencia de la ciclodextrina incrementa el transporte del CHL a través de la mucosa bucal. La velocidad de permeación se ve incrementada aproximadamente 1.6 veces (Tabla 17). Este hecho puede explicarse por el aumento en la estabilidad del CHL en la solución donadora, que al ser acuosa promueve la degradación del antineoplásico como ya se ha explicado a lo largo de este trabajo. Por otro lado, se incrementa la solubilidad del CHL en esta misma solución donadora, permitiendo que se tenga una mayor cantidad de activo soluble. Finalmente no hay que olvidar que a las ciclodextrinas en general se les han atribuido propiedades promotoras. La capacidad de las ciclodextrinas como promotores de absorción reside básicamente en su capacidad para interactuar con los componentes membranales, fundamentalmente los lípidos intercelulares. Se ha reportado que las ciclodextrinas son capaces de extraer estos lípidos,

debilitando de este modo la barrera de permeabilidad natural de la mucosa y por tanto favoreciendo el paso de sustancias a través de ella.

Cuando el CHL se aplica sólo en solución acuosa, si bien la actividad termodinámica es alta, pues se tiene un sistema saturado debido su baja solubilidad, también es cierto que la cantidad disuelta es muy baja y que además como ya se mencionó éste será fácilmente degradado por el medio. Por eso no es sorprendente que el flujo del CHL sólo, sea menor.

El estudio realizado con el complejo obtenido por CoevMet fue el que mostró una tendencia lineal más uniforme, además de que fue el que favoreció en mayor medida el transporte del CHL a través de la mucosa, esto puede atribuirse a que este complejo mostró una de las tasas de encapsulamiento más altas. Así, el hecho de tener un complejo ya formado, puede favorecer el transporte del fármaco no degradado. La cantidad acumulada en el receptor, el flujo y por tanto el factor de promoción (Tablas 15-17) se incrementan. La cantidad acumulada y el flujo son ligeramente mayores que con la mezcla física. Lo que podría suponer que el hecho de formar un complejo como tal presenta ventajas, no sólo en lo que se refiere a la estabilidad del activo, sino en cuanto a la cantidad permeada.

Además, podría pensarse en la posibilidad de que el hecho de utilizar metanol en la obtención del complejo por el método de CoevMet (aunque eliminado del complejo casi en su totalidad), pudiera influir en el transporte del CHL a través de la membrana. Los alcoholes como el metanol y el etanol son promotores de absorción, en este caso el metanol presente en el complejo podría actuar incrementando la fluidez de las bicapas lipídicas de la mucosa bucal, lo cual significa un desordenamiento de los lípidos intercelulares.

Como el transporte intercelular es la ruta más probable para el pasaje de las sustancias a través de la piel, la disrupción del paquete lipídico intercelular, ya sea por interacción del promotor con los lípidos o con los componentes protéicos, puede incrementar la permeabilidad cutánea.

Mediante diversas técnicas biofísicas (e.g. calorimetría diferencial de barrido y espectroscopía infrarroja) se ha logrado demostrar que existe una correlación entre la fluidez lipídica

y la permeabilidad; este incremento de la fluidez puede atribuirse a que los lípidos sufren una transición de una fase gel (rígida) a una fase líquido-cristalina, con una reducción de la temperatura de transición vítrea. Un incremento reversible de la fluidez de los lípidos intercelulares, puede ser considerado como un efecto no tóxico. (37)

Para la permeación con el complejo obtenido por amasado encontramos que al igual que el complejo anterior incrementa el paso del fármaco a través de la mucosa bucal, pero con un efecto menos pronunciado (Tablas 15-17), a pesar de tener la mayor cantidad de CHL encapsulado. Este comportamiento puede atribuirse a la influencia del metanol presente en el complejo obtenido por CoevMet, sobre la permeabilidad al interactuar con componentes de la membrana.

Con el esquema mostrado en la Figura 12 pretendemos dar una mejor explicación del proceso ocurrido durante la permeación de los complejos, las especies presentes (CHL, HE β CD y el complejo) así como los equilibrios existentes.

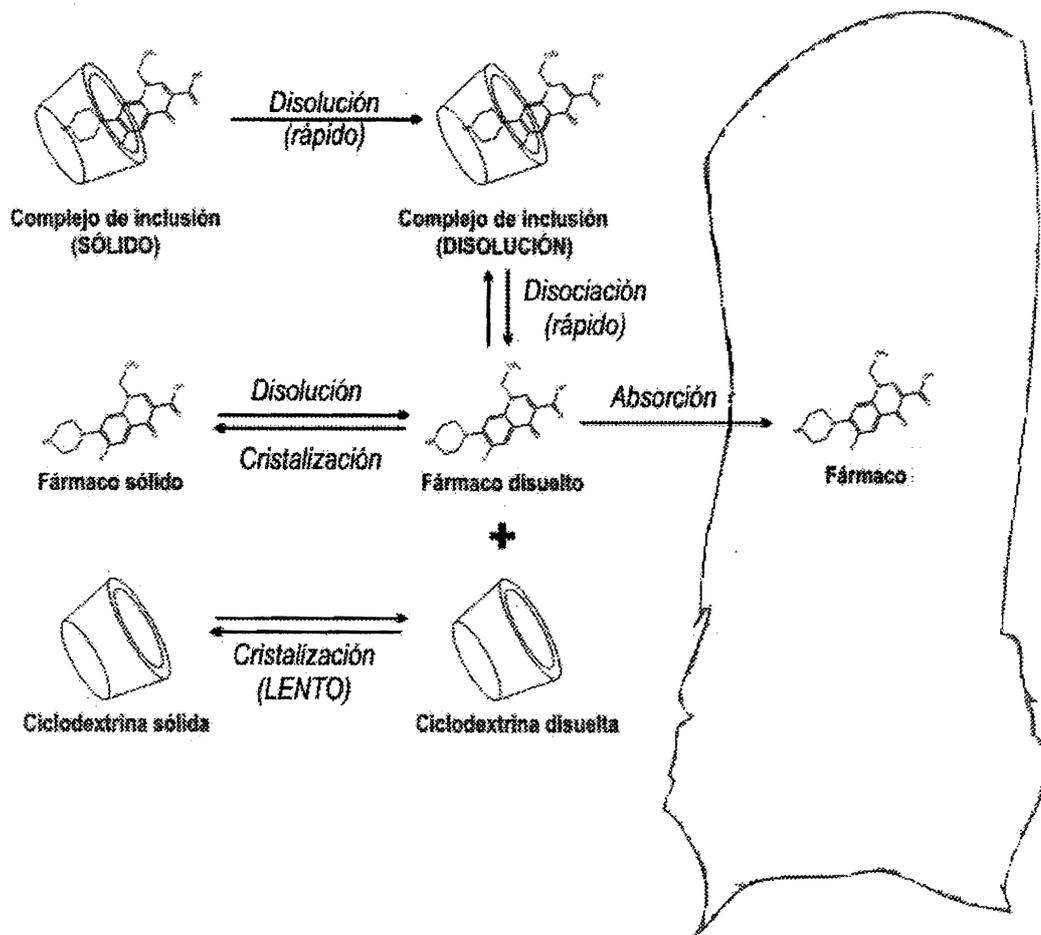


Figura 12.- Esquema de la liberación y absorción del fármaco a partir del complejo de inclusión. (Modificada de: http://club.telepolis.com/jjtorres/doc/USC/ciclodextrinas_imagenes.htm).

En la Figura 12 se describen gráficamente los eventos que ocurren antes de la absorción del fármaco incluido en la cavidad de la CD, ya que los complejos no penetran la piel y/o las mucosas con facilidad, se tiene que dar el proceso de liberación del fármaco a partir del complejo.

El proceso de disolución del complejo es muy rápido. La complejación del fármaco por parte de la CD no interfiere con su actividad ya que el proceso es rápidamente reversible. En solución acuosa el complejo fármaco-CD se está formando y disociando continuamente con tiempos de vida media del rango de milisegundos, una vez estando libre el fármaco, éste es absorbido (38), lo anterior ocurre cuando el complejo es diluido, sin embargo cuando el fármaco se administra por la vía transmucosal, transdérmica u ocular la dilución es mínima, bajo estas condiciones el fármaco puede ser desplazado de la cavidad de la CD por moléculas lipofílicas endógenas, tales como, colesterol, triglicéridos, fosfolípidos etc. (39), o si el complejo se encuentra localizado muy cercano a la membrana biológica lipofílica (tal como la superficie de la piel) el fármaco puede ser transferido a la matriz por la cual éste tiene mayor afinidad.

Si se hubiese realizado una permeación con el complejo obtenido a partir de liofilización la permeación hubiese sido mayor para el complejo formado por coevaporación y amasado (como se mostró), que por liofilización, ya que se ha reportado que existe una clara tendencia de que el complejo de inclusión genuino muestra una mejor biodisponibilidad que los productos obtenidos por liofilización (40).

El complejo genuino muestra un fenómeno de super-saturación mientras que el producto liofilizado no. La razón por la cual el complejo real causa super-saturación es debido a que se disuelve más lentamente, por lo que sólo una pequeña concentración del fármaco en la solución es necesaria para causar super-saturación de acuerdo al diagrama de solubilidad, por el contrario el grado de disolución del producto liofilizado es alto, por lo que se necesita una elevada concentración de fármaco para causar super-saturación en el medio de disolución, esto significa que el elevado grado de disolución de la CD evita que se presente el fenómeno de super-saturación del fármaco. El mecanismo mencionado anteriormente podría operar porque en el complejo genuino, la CD podría ser parte de un cristal fármaco-CD con una baja solubilidad en agua, mientras que en el producto

liofilizado las moléculas de CDs a menudo se encuentran en un estado amorfo. Mientras se espera un grado de disolución bajo para la CD en el complejo real, un alto grado de disolución es esperado para el producto liofilizado, simplemente debido a las diferencias en estado sólido de la CD en los distintos tipos de complejos de inclusión (41).

Las membranas biológicas son lipofílicas por lo que sólo moléculas relativamente lipofílicas pueden penetrar a través de ellas, sin embargo, la absorción a través de mucosas se da por un proceso de difusión pasiva, la cual requiere una alta concentración de fármaco (alta actividad termodinámica del fármaco) en la fase acuosa exterior a la membrana (saliva) o vehículo acarreador. En otras palabras, para una exitosa formulación se busca que el fármaco dependiendo en buena medida de sus propiedades fisicoquímicas del fármaco, como su coeficiente de partición. Los fármacos deben tener un balance hidrofílico-lipofílico adecuado para penetrar a través de las membranas como la mucosa bucal y en el caso de fármacos susceptibles de degradarse, como el CHL, su disponibilidad en el sitio de absorción depende de la protección o estabilización, que se brinde. De este modo con las CD, se busca tener una entidad química estable con características hidrosolubles que permita solubilizar en el medio mayor cantidad de activo y que conserve al mismo tiempo sus propiedades liposolubles, de modo que permee fácilmente a través de la mucosa. Esto se puede lograr a través de la complejación del fármaco con la CD (29 y 42).

Al formar el complejo y hacer la permeación, el fármaco tiene que quedar libre para poder permear a través de la membrana. De modo que no se están modificando las propiedades hidrofílicas intrínsecas del fármaco, pues al penetrar en la membrana lo hace no como complejo, sino como una entidad libre.

De la Figura 12, se puede apreciar que al aumentar la cantidad de ciclodextrina, el proceso de disociación es desplazado (ley de acción de masas) hacia la formación del complejo, disminuyendo de esta forma la cantidad de fármaco libre y por lo tanto la permeación, este fenómeno es lo que puede explicar el motivo por el cual los complejos obtenidos por amasado y CoevMet favorecieron la permeación del fármaco ya que al presentar una alta eficiencia de

encapsulamiento, poseen al CHL y a la HE β CD en cantidades equimolares (1:1, como lo demostraron los diagramas de solubilidad) por lo que no se halla HE β CD en exceso y por tanto el equilibrio se desplaza hacia la disociación del complejo, no a la formación y por tanto a la disposición de CHL libre.

El flujo es debido a las moléculas de fármaco libre, con el incremento de la cantidad de CD, el fármaco asociado incrementa y las moléculas disociadas disponibles para la difusión disminuyen, causando, como se observa en algunos casos, la disminución de la permeación del CHL.

Tabla 14.- Tiempo de latencia para las diferentes muestras (estudio de permeación *in vitro*)

<i>T. Latencia</i>	<i>t_{lag} [=] h</i>	<i>SD</i>
CHL*	0.4889 ±	0.05671779
M. F. **	0.2477 ±	1.44590000
Amasado*	0.2072 ±	0.05303334
CoevMet	0.1687 ±	0.07186136

* Valores obtenidos de la regresión de las 6 primeras horas (tendencia lineal del gráfico)

** Valor obtenido de la regresión a partir de las 4 horas hasta las 8 (tendencia lineal del gráfico)

En cuanto a los parámetros determinados tenemos en primer término el tiempo de latencia (Tabla 14) que representa el tiempo que tarda en comenzar a permear (aparecer en el receptor) la muestra a partir de que es colocada en el medio donador, y el cual se calcula a partir de la ordenada al origen de la regresión lineal existente entre la cantidad acumulada de fármaco por unidad de área con respecto al tiempo; con respecto a este hay una notoria diferencia entre el t_{lag} del CHL con respecto al complejo obtenido por CoevMet, amasado y la mezcla física, como se explicó la aparición lenta del fármaco se debe principalmente a su escasa solubilidad en el medio donador por ello ese retasó en la aparición del CHL en la fase receptora. En general estas cifras son tiempos que

muestran la aparición del fármaco antineoplásico de inmediato o casi al inicio del estudio comportamiento que se puede observar en la Gráfica 17.

Tabla 15.- Cantidad Máxima Acumulada (C.M.A.) para las diferentes muestras (estudio de permeación *in vitro*)

<i>Cantidad Máxima Acumulada de CHL (C.M.A.) en 8 h</i>						
	C.M.A. [=] mg/ cm ²		SD	C.M.A. [=] mmol/ cm ²		SD
CHL	1.2515	±	0.5278	0.004114	±	0.001735
M. F.	2.2776	±	1.0304	0.006773	±	0.003356
Amasado	2.0273	±	1.1786	0.006664	±	0.003874
CoevMet	2.7949	±	1.0794	0.009188	±	0.003548

En cuanto a la cantidad acumulada por unidad de área, como ya se mencionó al describir los perfiles de penetración de cada una de las muestras, ésta fue mayor alcanzando casi los mg totales colocados inicialmente del complejo formado por CoevMet seguido de la cantidad acumulada por la Mezcla Física con 2.27 mg/cm², encontrando después al complejo obtenido por el método de amasado que mostró haber penetrado 2.02 mg/cm² del total y finalmente tenemos al fármaco como tal, el CHL que penetró poco menos de la mitad con tales valores se determino que existe una diferencia significativa (mediante pruebas de ANADEVVA y Tukey) entre las cantidades permeadas para cada caso (*Anexo ix y xi*) Estos resultados se muestran en la Tabla 15.

Tabla 16.- Flujo obtenido para las diferentes muestras (estudio de permeación *in vitro*)

<i>Flujo</i>				
	J [=] (mg/h cm ²)		J [=] (mmol/h cm ²)	
		SD		SD
CHL*	0.1987 ±	0.0873	0.000653 ±	0.0002868
M.F.**	0.2860 ±	0.2929	0.000940 ±	0.0009631
Amasado*	0.2452 ±	0.1201	0.000806 ±	0.0003948
CoevMet	0.3282 ±	0.1343	0.001079 ±	0.006441

* Valores obtenidos de la regresión de las 6 primeras horas (tendencia lineal del gráfico)

** Valor obtenido de la regresión a partir de las 4 horas hasta las 8 (tendencia lineal del gráfico)

El flujo que se determinó por medio de la pendiente de cada perfil lineal mostró los resultados enunciados en la Tabla 16 que señala el valor del flujo de cada muestra reportado tanto en molaridad como en cantidad, se nota que el orden decreciente de flujo es el siguiente: CoevMet, M.F., Amasado y CHL; estos resultados son acordes con la cantidad acumulada pues a menor flujo menos cantidad de CHL acumulada en la fase receptora. De igual manera mediante pruebas de ANADEVIA y Tukey se determinó la existencia de una diferencia significativa entre los flujos reportados para cada una de las muestras permeadas. (*Anexo x y xii*)

Tabla 17.- Factor de promoción para las diferentes muestras (estudio de permeación *in vitro*)

Factor de Promoción		
	$K_R [=]$	SD
CHL*		
M.F.**	1.4917	± 0.7882
Amasado*	1.2340	± 0.1428
CoevMet	1.9151	± 0.8267

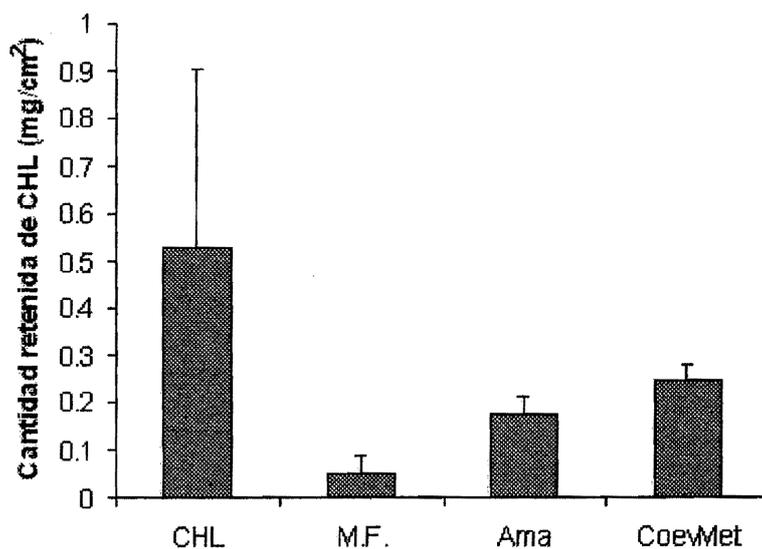
* Valores obtenidos de la regresión de las 6 primeras horas (tendencia lineal del gráfico)

** Valor obtenido de la regresión a partir de las 4 horas hasta las 8 (tendencia lineal del gráfico)

Analizando el factor de promoción que es la relación existente entre el flujo de las muestras con promotor (es decir la HE β CD) y el flujo del fármaco como tal, el CHL; encontramos que se ve incrementado el paso del CHL en casi 2 veces cuando está presente el complejo formado por CoevMet, mientras que con el formado por amasado se muestra la tendencia a aumentar el flujo 1.2 veces y para el caso de la Mezcla Física se mejoró la permeación en 1,5 veces tomando en cuenta que se está considerando la parte más lineal del perfil mostrado en el gráfico. Estas relaciones se reportan en la Tabla 17.

Es importante también rescatar la cantidad de CHL retenido por la mucosa bucal al final de la permeación. La relación de estas cantidades se deja ver en la Gráfica 18 donde se reportan los casos de las cuatro muestras.

6.6.3 Cantidad retenida de CHL en membrana bucal porcina



Gráfica 18.- Cantidad de CHL que se retuvo en la membrana bucal porcina por unidad de área de cada una de las permeaciones realizadas.

Como se puede ver se retuvo mayor cantidad por unidad de área en el CHL como tal, lo que se debe a su baja solubilidad en el medio donador y su alta lipofilia, lo que favorecería su partición hacia la membrana, aunque habría que tomar estos datos con precaución, debido a que como se muestra en la Gráfica 18, en el caso del CHL solo, la dispersión de los datos es muy grande. Después del CHL, el complejo obtenido por CoevMet es el que muestra la mayor retención en la mucosa, para posteriormente encontrara al complejo obtenido por amasado y finalmente la mezcla física. Estos últimos datos coinciden con lo encontrado en cuanto a flujo y cantidad total en el receptor.

6.7 COMPARACIÓN DE NUESTROS RESULTADOS CON LOS OBTENIDOS EN TRABAJOS PREVIOS

Los resultados de este trabajo se compararon con los resultados reportados en el trabajo "Formación, Caracterización y Permeación transbucal de los complejos de inclusión del Clorambucilo con β -Ciclodextrinas" realizado con anterioridad por la M. en C. María Guadalupe Nava Arzaluz (44), en este trabajo se probaron tres β -CDs diferentes y aunque las condiciones no fueron exactamente las mismas, es interesante ver lo obtenido en ambos estudios:

La Tabla 18 muestra el tipo de diagrama de solubilidad de acuerdo a Higuchi y Connors, obtenido, así como la constante de unión para el CHL con relación a cada CD probada. Como puede observarse, en todos los casos se tiene un diagrama de tipo A_L , lo que implica una relación CHL:CD 1:1.

Tabla 18.- Tipo de diagramas de solubilidad y constantes de unión para el CHL en función de 4 β -CDs

Condiciones	Trabajo	Ciclodextrina	Tipo de diagrama	Constante de unión $K_{1:1} (M^{-1})$
Mezcla Buffer de fosfatos pH 7.4-metanol 98:2, 37 ° C, análisis por medio de HPTLC	Nava	DM β CD	A_L	49.97
	Nava	TM β CD	A_L	1067.54
	Nava	HP β CD	A_L	520.76
Mezcla Buffer de fosfatos pH 7.4-metanol 80:20, 37 ° C, análisis por medio de HPLC	Calderón	HE β CD	A_L	781.43

A continuación se reportan los resultados obtenidos a partir de los estudios de cinéticas de degradación para el CHL a 37° C en función de distintas concentraciones de β -CDs para determinar las constantes aparentes de estabilidad.

La Tabla 19 muestra las constantes obtenidas para el estudio de cinética de degradación de CHL con las cuatro β -CDs estudiadas, en donde se aprecia que a medida que aumenta la concentración de β -CD, la degradación del CHL disminuye, hecho que se corrobora por los valores de las constantes aparentes de estabilidad observada, así como con la relación existente entre la constante de degradación del CHL solo (k_o) y las k_{obs} .

Tabla 19.- Valores de las constantes observadas y relación K_o/k_{obs} para el CHL en función de distintas concentraciones de 4 β -CDs diferentes.

Condiciones	Trabajo	Ciclodextrina	%CD	K_{obs} (hr^{-1})	K_o/k_{obs}
Mezcla Buffer de fosfatos pH 7.4- metanol 98:2, 37° C, análisis por medio de HPTLC	Nava	HP β CD	0.6	0.8449	4
			1.0	0.5786	6
			2.5	0.4114	8
			5,00	0.3493	9
			8,70	0.1843	17
	Nava	DM β CD	0,00	3,196	1
			1,0	0.7589	4
			2,50	0.2952	11
			5,00	0.2259	14
			8,70	0.1912	17
	Nava	TM β CD	0,06	1,5 86	2
			1,25	0,554	6
			2,50	0,242	13
			5,00	0.112	29
			8,70	0.092	35
Mezcla Buffer de fosfatos pH 7.4- metanol 80:20, 37° C, análisis por medio de HPLC	Calderón	HE β CD	0.00	1.7182	1
			0.1085	1.4927	1.15
			0.1446	1.4051	1.22
			0.1808	1.2376	1.39
			0.2844	0.7496	2.29
			0.8606	0.4244	4.05
			1.4222	0.3197	5.37

Si consideramos el valor máximo de % β -CDs utilizado en este trabajo que fue de 1.42, al comparar con valores cercanos de % de β -CDs de Nava, encontramos la relación k_o/k_{obs} se encuentra entre 4 y 6 de manera que se disminuye la constante alrededor de 4 a 6 veces para las cuatro CDs estudiadas, lo que implica que las constantes de estabilidad no están muy alejadas entre sí, hecho con el cual podemos sugerir que para el caso de las β -CDs metiladas y etiladas se mejora la estabilidad del CHL en solución acuosa, de manera proporcional para en todos los casos, ya que a una misma concentración porcentual sin influir mucho el grado de sustitución de la CD, se observó el mismo rango de incremento en la estabilidad.

Al caracterizar, los complejos de inclusión obtenidos por los distintos métodos para ambos trabajos se corroboró de manera cualitativa la formación del complejo CHL- β -CDs mediante los análisis por DSC, Espectrofotometría UV, IR y SEM.

Ahora de manera cuantitativa se determinó la eficiencia de encapsulamiento del CHL dentro de la cavidad de la CD. Los resultados se concentran en la Tabla 20. Como puede verse, Nava preparó complejos sólo por los métodos de coprecipitación y liofilización y Calderón por los métodos de liofilización, coevaporación y amasado. En el caso de Nava, el menor porcentaje de encapsulación se obtiene con la HP β CD independientemente del método de preparación empleado. No obstante, es interesante observar que el porcentaje encapsulado es muy próximo en el caso de la HE β CD y de HP β CD cuando se usa el método de liofilización.

Tabla 20.- Eficiencia de Encapsulamiento para CHL en los Complejos de inclusión obtenidos por los distintos métodos y con las diferentes β -CDs.

Condiciones	Trabajo	Método	Ciclodextrina	% encapsulado	
Mezcla Buffer de fosfatos pH 7.4, análisis por medio de HPTLC	Nava	Coprecipitación	DM β CD	99.17%	
			TM β CD	87.99%	
			HP β CD	16.22%	
			HE β CD	-----	
	Calderón	Liofilización	DM β CD	74.01%	
			TM β CD	26.62%	
			HP β CD	14.53%	
			HE β CD	17.85%	
	Nava	Coevaporación	DM β CD	-----	
			TM β CD	-----	
			HP β CD	-----	
			HE β CD	81.15%	
Mezcla Buffer de fosfatos pH 7.4-metanol 80:20, análisis por medio de HPLC	Calderón		Metanol		
	Calderón		Etanol	71.88%	
	Nava	Amasado	DM β CD	-----	
			TM β CD	-----	
			HP β CD	-----	
			HE β CD	83.22%	
	Calderón				

Como último punto se abordara la permeación *in vitro* de los complejos de inclusión obtenidos a través de mucosa bucal porcina. Se reportan a continuación (Tabla 21) los valores del flujo que presentó cada uno de los complejos para su comparación. Como se muestra, en ambos casos (Nava y Calderón) se obtuvo un flujo similar en el caso del CHL solo. No obstante, los resultados parecen mostrar que tanto el tipo de ciclodextrina como el método de preparación del complejo juegan un papel importante en la permeación. Esto puede explicarse en parte por las diferencias en cuanto al porcentaje de encapsulación obtenido y al tipo de relación del activo con la ciclodextrina. De acuerdo a los resultados mostrados por Nava, con algunas ciclodextrinas como la TM β CD y la HP β CD se obtiene incluso un efecto retardador sobre el paso del CHL a través de la mucosa. En el caso del presente trabajo, la HE β CD mostró siempre propiedades promotoras favoreciendo el paso del CHL.

Tabla 21.- Valores de flujo del complejo CHL- β -CD a través de mucosa bucal porcina.

Condiciones	Trabajo	Ciclodextrina	Método de preparación del complejo	Flujo J [=] (mg/h cm ²)
Donador: Buffer fosfatos pH 7.4 Receptor: Metil- β -CD al 5% en Buffer fosfatos pH 7.4 Temperatura: 37° C Análisis: Espéctrofometría	Nava	CHL		0.1367 \pm 0.0151
		DM β CD	Coprecipitación	0.2701 \pm 0.1603
		DM β CD	Liofilización	0.1604 \pm 0.0209
		TM β CD	Coprecipitación	0.0847 \pm 0.0083
		TM β CD	Liofilización	0.0383 \pm 0.0009
		HP β CD	Coprecipitación	0.0292 \pm 0.0068
		HP β CD	Liofilización	0.0418 \pm 0.0058
Donador: Buffer fosfatos pH 7.4 Receptor: HE- β -CD al 5% en Buffer fosfatos pH 7.4 Temperatura: 37° C Análisis: HPLC	Calderón	CHL		0.1987 \pm 0.0873
		HE β CD	Coevaporación Metanol	0.3282 \pm 0.1343
		HE β CD	Amasado	0.2452 \pm 0.1201

7. CONCLUSIONES

- Se logró determinar la estequiometría del complejo CHL-HE β CD por medio de los diagramas de solubilidad de Higuchi y Connors obteniéndose un diagrama de tipo A_L , que propone una estequiometría molar 1:1.
- Se evaluó el efecto que ejerce la HE β CD sobre la hidrólisis del CHL por medio de cinéticas de degradación en solución acuosa a 23 y 37 ° C, y se determinó que a ambas temperaturas se presenta un efecto estabilizante, el cual es mayor a 23 ° C lo cual se corroboró estadísticamente al encontrarse diferencia significativa entre las constantes de degradación.
- Se obtuvieron complejos de inclusión CHL-HE β CD por tres diferentes métodos: Amasado, Liofilizado y Coevaporación en Metanol y Etanol.
- Se caracterizaron de manera cualitativa (DSC, UV, IR, SEM) y cuantitativa (HPLC) los complejos de inclusión obtenidos por los tres métodos distintos comprobándose así su formación.

- Se determinó la cantidad de CHL encapsulado encontrando mayor porcentaje en el complejo obtenido por Amasado (80-90%), seguido de los complejos por coevaporación (CoevMet 81% y CoevEt 71%) y finalmente los complejos por liofilización (16-20%), hecho que se atribuye al método de preparación y a la influencia de factores como: disolventes, fuerza mecánica, etc

- Se evaluó la estabilidad de los complejos por Amasado, CoevMet y CoevEt; en estado sólido y en solución acuosa encontrando que existe una mayor estabilidad bajo las siguientes condiciones: cuando el complejo se encuentra en estado sólido, humedad ambiente y temperatura de refrigeración (4 ° C).

- Se determinó la permeabilidad de CHL así como de su Mezcla Física con HE β CD y sus complejos de inclusión por Amasado y CoevMet a través de mucosa bucal porcina; encontrándose mayor permeabilidad en el complejo por coevaporación en Metanol.

- Al comparar el efecto de distintas β -CDs sobre la solubilidad y estabilidad del CHL se comprobó que la HE β CD, así como las DM β CD, TM β CD, HP β CD mejoran estas propiedades.

- Las cuatro ciclodextrinas mostraron ejercer una influencia en la permeación del CHL a través de la mucosa bucal. En el caso de la DM β CD y la HE β CD (estudiada en este trabajo) se observó un efecto promotor, mientras que con la TM β CD y HP β CD, el efecto es retardador. Esta es una observación interesante que debe de ser objeto de posteriores estudios.

8. PERSPECTIVAS

El trabajo realizado en este proyecto experimental da la pauta a posteriores aplicaciones dentro del campo de la tecnología farmacéutica, utilizando las ciclodextrinas como excipientes innovadores, capaces de mejorar estabilidad, solubilidad y procesos de formulación de diversos fármacos.

El campo farmacéutico presenta en la actualidad diferentes obstáculos en la formulación y disponibilidad de fármacos, debido a sus propiedades fisicoquímicas que en ocasiones no permiten que se lleve a cabo la acción y efecto terapéutico deseado. En este caso en particular el Clorambucilo como fármaco antineoplásico utilizado en el tratamiento de distintas patologías se ve beneficiado por la complejación con CDs, lo cual se puede aplicar a muchos más fármacos con la finalidad de estabilizarlos, hacerlos más solubles y por tanto más biodisponibles.

En definitiva el estudio del mejoramiento tanto en estabilidad como en solubilidad del CHL en solución acuosa, así como los beneficios que muestra su complejación con CDs en la permeación a través de la mucosa bucal, son parte aguas para la proposición de una vía alterna tanto de formulación como de diseño de una nueva vía de administración para la aplicación de este fármaco y así ser un eslabón para futuras investigaciones.

Siendo entonces la mucosa bucal una opción, ya que en los últimos años ha sido estudiada como un sitio potencial para la administración de fármacos, ya que ofrece varias ventajas, entre ellas su accesibilidad, baja actividad enzimática, mejoramiento de biodisponibilidad debido a que evita la degradación del tracto gastrointestinal y el efecto de primer paso hepático.

Es por ello que la evaluación de la permeabilidad del Clorambucilo y sus complejos de inclusión a través de esta membrana dan la pauta para proponer como investigación futura a partir de este trabajo se propone el diseño y formulación de un sistema de administración del fármaco de manera

transbucal proponiendo específicamente un parche transbucal. De manera que se tendrían que hacer los estudios correspondientes de compatibilidad con excipientes tanto sólidos como líquidos, establecer las condiciones óptimas de elaboración, humedad, temperatura, tiempo, etc todos lo que implica el desarrollo de una nueva una de administración.

Sería interesante estudiar la influencia de los sustituyentes de las distintas CDs sobre el transporte de fármacos a través de membranas biológicas, evidenciando la interacción de las mismas con los componentes celulares mediante pruebas biofísicas como espectroscopía de infrarrojo, calorimetría diferencial de barrido y pérdida de agua transepidermal.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Thorsteinn Lofsson and Marcus E. Brewster *Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins*, 1. Drug Solubilization and Stabilization, Journal of Pharmaceutical Sciences, **85:10**, (1996), 1017-1025.
2. Bekers O., Uijtendaal E.V., et al, *Cyclodextrins in the Pharmaceutical Field*, Drug Development and Industrial Pharmacy, **11:17**, (1991), 1503-1549.
3. Thorsteinn Loftsson and Masson Mar, *Cyclodextrins in topical drugformulations: theory and practice*, International Journal of Pharmaceutics, **225**, (2001), 15-30.
4. U.S. Pharmacopeia National Formulary U.S.P. 24 Nf 19 ed. (2000), U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. 12601 Twinbrook Parkway Rockville, MD. 20852.
5. Smith Eric W. and Maibach Howard I. Thorsteinn Loftsson and Nicholas Bodor, *Percutaneous Penetration Enhancers*, Capitulo 13.1, 335 – 342.
6. E. Rudnika, G. Matuschek, N. Milanov, A. Kettrup *Thermal properties of starch succinates*, Thermochemica Acta (2004), 1-4.
7. Muñoz-Botella, S.; del Castillo, B. y Martín, M.A., *Las ciclodextrinas: características y aplicaciones de la formación de complejos de inclusión*, Laboratorio de Técnicas Instrumentales. Sección Departamental de Química Analítica. Facultad de Farmacia. UCM 28040 Madrid, España Ars Pharm., **2:36**, (1995), 187-198.
8. Mamata Singh, Rohit Sharma and U.C. Banerjee, *Biotechnological applications of cyclodextrins*, Biotechnological Advances , **20**, (2002), 341-359.

9. Singer Y. and Shitty H. Bar Microbial transformation in a cyclodextrin medium, part 2 Reduction of androstenedione to testosterone by Saccharomyces cerevisiae, Application Microbiology Biotechnology , 7, (1991), 731-737.
10. Reid B.J., Semple KT, JhonesKC, Soil test for determining bioavailability of pollutants, PCT International Applications ,99, (1999), 727-754.
11. Kamal A., Rabalingum T., Venogopalan N., Enantioselective hydrolysis of aryloxypropionic esters by bovine serum albumine enhancement in selectivity by β CD, Tetrahedron: Asymetry, (1991), 2-39.
12. Granados AM. De Rossi RH., Effect of cyclodextrin on the intramolecular catalysis of amide hydrolysis, Journal Org. Chemistry, 66, 1548-1552.
13. Moffat A.C. Clarke's Isolation and Identificacion of Drugs, 2a edition Editorial Staff, (1986), 442.
14. Comisión Permanente de la Farmacopea de los estados Unidos Mexicanos, Monografía Clorambucilo, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 5ta edición, (1988), 589-590.
15. Thorsteinn Loftsson, Sigridor Bjornsdottir Gudrun Pálsdottir and Nicholas Bodor, The effects of 2- hydroxiopropyl- β -cyclodextrin on the solubility and stability of Chlorambucil and melphalan in aqueous solution, Journal of Pharmaceutics, 57, (1989), 63-72.
16. Vademecum Farmacéutico, Leurekan; Clorambucilo, 9a edición (2000).
17. McEvoy GK., American Hospital Formulary Service. Drug Information, Bethesda: American Society of Hospital Pharmacists, (1988).

18. Reynolds JEF, editor. Martindale. *The Extra Pharmacopoeia*, The Pharmaceutical Press, 29th edition, (1989).
19. Galina N. Kalinkova, *Complexation: non – Cyclodextrinas*, Encyclopedia of pharmaceutical Technology, Medical University, 559 – 568.
20. Mosher Gerold and O. Thompson Diane, *Complexation and Cyclodextrins*, Encyclopedia of pharmaceutical Technology, CyDex, Inc., 531– 554.
21. Frömring and Szejtli: *Cyclodextrins in Pharmacy*, Kluwer Academy.Press, Dordrecht, (1994).
22. Atadache N and P.R. Vavia; *β -Ciclodextrin Inclusión Complexation By Milling*, Pharmaceutical Division, University Departament of Chemical Technology (Autonomus) University of Mumbai, "Pharm. Pharmacol. Común", **6**, (2000), 13-17.
23. Morin Nadia, a Grégorio Crinib Cesare Cosentino, Joëlle Milletd, Joël Vebrel and Jean-Charles Rouland, *Solubilidad Formation of two particular structures between cyclodextrin and bifonazole: cyclodextrin–bifonazole and (-cyclodextrin)i–bifonazole*, Cambridge, UK, (1999) 2647-2651.
24. Giordano Ferdinando, Novak Csaba, Moyano Jose Ramon, *Thermal analisis of cyclodextrins and their inclusion complexes*, *Thermochimica acta*, No 380, (2001), 123-151.
25. Higuera Ramirez Francisco J. , Director General de Control de Insumos para la Salud, *NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de medicamentos*, (1993).
26. M.E. deVries, dev, Drug Dlivery ,(1991).

27. Webber Wendy, *Mucosal Drug Delivery, Bucal*, Brown University Providence , 553-563.
28. Sinha V.R. Bindra S. Kumria R., and Nanda A. *Cyclodextrins as Skin penetration Enhancers*, *Pharmaceutical Technology*, **27:3**, (2003),120-132.
29. Masson Mar, Thorsteinn Loftsson, Masson Gisli and Stefansson Einar, *Cyclodextrins as penetration enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing*, *Journal of control release*, No 59 , (1999), 107-118.
30. Fugen Gua, Fude Cuia, Yong-liang Gaob; *Preparation of prostaglandin E1-hydroxypropyl- - cyclodextrin complex and its nasal delivery in rats*; *International Journal of Pharmaceutics* **290**, (2005), 101–108.
31. David C. Bibby *, Nigel M. Davies, Ian G. Tucker; *Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems* *International Journal of Pharmaceutics*, **197**, (2000), 1–11.
32. Vázquez Contreras Edgar *Bioquímica y Biología Molecular en Línea*, Instituto de Química de la UNAM. Información Avanzada para la enseñanza y el aprendizaje, (2004).
33. Thorsteinn Loftsson and Nicholas Bodor, *Effect of Cyclodextrins on Percutaneous Transport of Drugs* ,**13.1**, 335-342.
34. Alison r. Green and j. Keith Guillory , *Heptakis (2,6-di-O-methyl)-β-cyclodextrin Complexation with the Antitumor Agent Chlorambucil* , *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **78:5**, (1989), 427-431.

35. Yannis L. Loukas, Evaluation of the methods for the determination of the stability constant of cyclodextrin-chlorambucil inclusion complexes, Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis, **16**, (1997), 275-280.
36. Fernández,C., Vieira, T., Veiga F., Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of nicardipine cyclodextrins inclusion compounds, E. Journal of Pharmaceutical Sciences, **15**, (2002), 79-88.
37. Ganem R. A., Piñón, S.E. y Quintanar, G. D. Uso de promotores de absorción percutánea. Ciencia Cosmética, **4:2**, (1998), 19-25.
38. Mosher, G., Thompson, D., Complexation and Cyclodextrins, Encyclopedia of pharmaceutical technology, (2002) 531-552.
39. Stella, V., Rao, V., Zannou, E., Zia, V., Mechanisms of drug release from cyclodextrins complexes, Adv. Drug, Delivery Reviews, **36**, (1999), 3-16.
40. Pedersen, M., The bioavailability difference between genuine cyclodextrin inclusion complexes and freeze-dried or ground drug cyclodextrin simples maybe due to supersaturation differences, Drug. Dev. Ind. Pharm., **23:3**, (1997), 331-335.
41. Sciafani, J., ,P., Hansen, E., Cettina, M., Nightingale, J., A protocol for the assessment of receiver solution additive-induced skin permeability changes. An example with gamma-cyclodextrin, Int. J. Pharm., **124**,(1995), 213-217.
42. Ceschel, G., Mora, P., Borgia, S., Maffei, P., Ronchi, C., Skin permeation study of dehydroepiandrosterone (DHEA) compared with its alfa-cyclodextrin complex form, J. Pharm. Sci., **91:11**, (2002), 2399-2406.

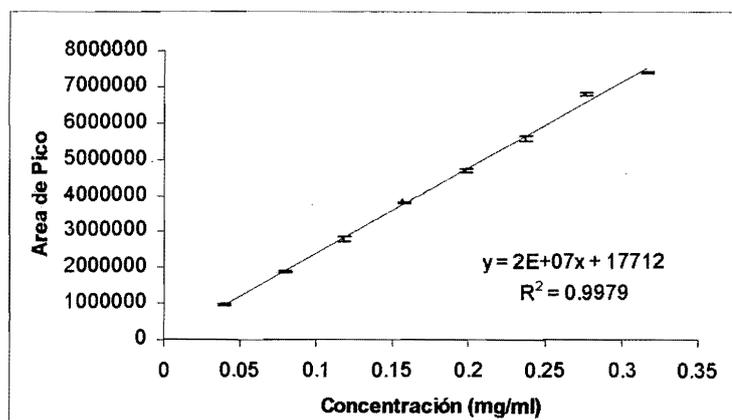
43. Owen W.R. and Stewart P.J. *Kinetics and Mechanism of Chlorambucil Hydrolysis* Journal of Pharmaceutical Sciences, **68:8**,(1979), 992-996.
44. Nava Arzaluz, M. G., *Formación, Caracterización y Permeación transbucal de los complejos de inclusión del Clorambucilo con β -Ciclodextrinas*, Tesis de Maestría. UNAM, FES-Cuautitlán, (2005).

10. ANEXOS

**Anexo i CURVA DE CALIBRACIÓN DE CHL
EN MEZCLA BUFFER DE FOSFATOS pH 7.4- METANOL (80:20)**

Concentración mg/ml	Área de Pico	Area / Conc. ml/mg
0.0394	978459	24833984.8
0.0394	979884	24870152.3
0.0394	962180	24420812.2
0.0788	1901079	24125368
0.0788	1905173	24177322.3
0.0788	1840371	23354961.9
0.1182	2778120	23503553.3
0.1182	2726481	23066675.1
0.1182	2855542	24158561.8
0.1576	3802319	24126389.6
0.1576	3820548	24242055.8
0.1576	3835945	24339752.5
0.1970	4689771	23805944.2
0.1970	4744076	24081604.1
0.1970	4671058	23710954.3
0.2364	5644029	23874911.2
0.2364	5548109	23469158.2
0.2364	5561727	23526764
0.2758	6758395	24504695.4
0.2758	6844250	24815989.8
0.2758	6838711	24795906.5
0.3152	7407281	23500257
0.3152	7425616	23558426.4
0.3152	7363974	23362861.7

r	0.9989
r ²	0.9979
m	23843300.29
b	17711.94137
Prom. relación	24009460.9
D.E.	530689.248
C.V.	2.21033388 %



Análisis de varianza (ANADEVA) para evaluar la linealidad del sistema (regresión lineal simple)

Prueba de hipótesis:

Ho: No existe una relación lineal entre la concentración de CHL y su respectiva área de pico.

Hi: Existe una relación lineal entre la concentración de CHL y su respectiva área de pico.

Criterio de Aceptación:

Si F calculada $>$ F crítica se rechaza Ho, por lo tanto existe una relación lineal entre la concentración de CHL y su respectiva área de pico.

Si F calculada $<$ F crítica se acepta Ho, por lo tanto no existe una relación lineal entre la concentración de CHL y su respectiva área de pico.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	Valor crítico de F ($\alpha=0.05$)
Concentración	1	1.112E+14	1.112E+14	9568.121863	1.55897E-30
Residuos	22	2.5568E+11	1.1622E+10		
Total	23	1.1145E+14			

Se rechaza Ho; si hay relación lineal entre la concentración de CHL y su respectiva área de pico.

Prueba de intercepto

Prueba de hipótesis:

Ho: La ordenada al origen es igual a cero.

Hi: La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de Aceptación:

Si t calculada $<$ t crítica no se rechaza Ho, por lo tanto el intercepto es igual a cero.

Si t calculada $>$ t crítica se rechaza Ho, por lo tanto el intercepto es diferente de cero.

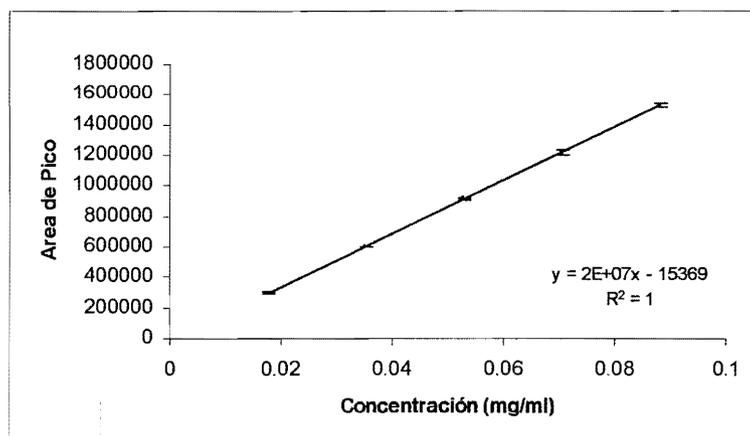
	Coefficientes	Estadístico t calculada	T crítica ($\alpha=0.05$, g.l. n-2)
Intercepción b	17711.9405	97.816777	2.0739
Pendiente m	24009460.9		

Como la t calculada $>$ t crítica se rechaza Ho; por lo tanto el intercepto es diferente de cero.

Anexo ii CURVA DE CALIBRACIÓN DE CHL
SOLUCIÓN DE HEβCD AL 5 % EN MEZCLA BUFFER DE FOSFATOS PH 7.4- METANOL
(80:20) PREVIO CONTACTO CON MUCOSA BUCAL 8 HORAS.

Concentración mg/ml	Área de Pico	Area / Conc. ml/mg
0.0176	329278	16913283.6
0.0176	329996	16954073.9
0.0176	320038	16388349.2
0.0352	629154	16974781.6
0.0352	627433	16925895.6
0.0352	636804	17192083.9
0.0528	941234	17226388.4
0.0528	946233	17321054.6
0.0528	944381	17285983.2
0.0704	1251424	17325348.5
0.0704	1264456	17510439
0.0704	1236007	17106384.4
0.0880	1552561	17281862.5
0.0880	1574759	17534081
0.0880	1554508	17303984.7

r	1
r ²	1
m	17544560.61
b	15368.7337
Prom. relación	16022047.4
D.E.	291172.903
C.V.	1.81732644 %



Análisis de varianza (ANADEVA) para evaluar la linealidad del sistema (regresión lineal simple)

Prueba de hipótesis:

Ho: No existe una relación lineal entre la concentración de CHL y su respectiva área de pico.

Hi: Existe una relación lineal entre la concentración de CHL y su respectiva área de pico.

Criterio de Aceptación:

Si F calculada $>$ F crítica se rechaza Ho, por lo tanto existe una relación lineal entre la concentración de CHL y su respectiva área de pico.

Si F calculada $<$ F crítica se acepta Ho, por lo tanto no existe una relación lineal entre la concentración de CHL y su respectiva área de pico.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	Valor crítico de F ($\alpha=0.05$)
Regresión	1	2.8604E+12	2.8604E+12	42872.8769	2.9327E-24
Residuos	13	867345855	66718911.9		
Total	14	2.8613E+12			

Se rechaza Ho; si hay relación lineal entre la concentración de CHL y su respectiva área de pico.

Prueba de intercepto

Prueba de hipótesis:

Ho: La ordenada al origen es igual a cero.

Hi: La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de Aceptación:

Si t calculada $<$ t crítica no se rechaza Ho, por lo tanto el intercepto es igual a cero.

Si t calculada $>$ t crítica se rechaza Ho, por lo tanto el intercepto es diferente de cero.

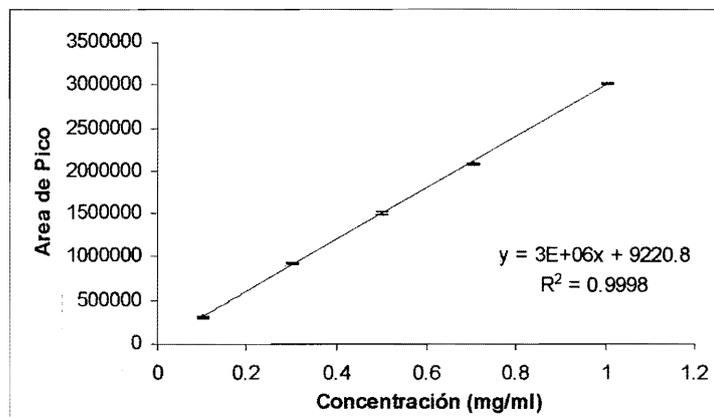
	Coefficientes	Estadístico t calculada	T crítica ($\alpha=0.05$, g.l. n-2)
Intercepción <i>b</i>	16198.2667	207.057666	2.1604
Pendiente m	17544560.61		

Como la t calculada $>$ t crítica se rechaza Ho; por lo tanto el intercepto es diferente de cero.

**Anexo iii CURVA DE CALIBRACIÓN DE CHL
EN MEZCLA BUFFER DE FOSFATOS PH 7.4- METANOL (80:20)
PREVIO CONTACTO CON MUCOSA BUCAL 24 HORAS.**

Concentración mg/ml	Área de Pico	Area / Conc. ml/mg
0.1	308158	3081580
0.1	305878	3058780
0.1	301101	3011010
0.3	913764	3045880
0.3	921480	3071600
0.3	930037	3100123.33
0.5	1500753	3001506
0.5	1484324	2968648
0.5	1518965	3037930
0.7	2075094	2964420
0.7	2088610	2983728.57
0.7	2077642	2968060
1	3019612	3019612
1	3004038	3004038
1	3011386	3011386

r	0.9998
r²	0.9997
m	2990067.87
b	9220.84153
Prom. relación	3021886.79
D.E.	42934.9028
C.V.	1.42 %



Análisis de varianza (ANADEVA) para evaluar la linealidad del sistema (regresión lineal simple)

Prueba de hipótesis:

Ho: No existe una relación lineal entre la concentración de CHL y su respectiva área de pico.

Hi: Existe una relación lineal entre la concentración de CHL y su respectiva área de pico.

Criterio de Aceptación:

Si F calculada $>$ F crítica se rechaza Ho, por lo tanto existe una relación lineal entre la concentración de CHL y su respectiva área de pico.

Si F calculada $<$ F crítica se acepta Ho, por lo tanto no existe una relación lineal entre la concentración de CHL y su respectiva área de pico.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	Valor crítico de F ($\alpha=0.05$)
Concentración	1	1.3089E+13	1.3089E+13	46609.7528	1.7038E-24
Residuos	13	3650646000	280818923		
Total	14	1.3093E+13			

Se rechaza Ho; si hay relación lineal entre la concentración de CHL y su respectiva área de pico.

Prueba de intercepto

Prueba de hipótesis:

Ho: La ordenada al origen es igual a cero.

Hi: La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de Aceptación:

Si t calculada $<$ t crítica no se rechaza Ho, por lo tanto el intercepto es igual a cero.

Si t calculada $>$ t crítica se rechaza Ho, por lo tanto el intercepto es diferente de cero.

	Coefficientes	Estadístico t calculada	T crítica ($\alpha=0.05$, g.l. n-2)
Intercepción b	9220.84153	215.89292	2.1604
Pendiente m	2990067.87		

Como la t calculada $>$ t crítica se rechaza Ho; por lo tanto el intercepto es diferente de cero.

**Anexo iv PRUEBA DE ANADEVA PARA LA COMPARACIÓN DE LAS PENDIENTES EN LAS
CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN DE CHL EN PRESENCIA DE DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE HE β CD A 23 ° C**

[HE β CD] Molaridad	Pendiente
0	0.4609
0.00079295	0.2365
0.00105727	0.2206
0.00132158	0.2067
0.00207929	0.1512
0.00629075	0.0829
0.01039648	0.0621

Prueba de hipótesis:

Ho: No existe diferencia significativa entre las pendientes

Hi: Existe diferencia significativa entre las pendientes

Criterio de Aceptación:

Si F calculada > F crítica se rechaza Ho, por lo tanto existe una diferencia significativa entre las pendientes

Si F calculada < F crítica se acepta Ho, por lo tanto no existe una diferencia significativa entre las pendientes

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	Valor crítico de F ($\alpha=0.05$)
Concentración	1	0.08836889	0.08836889	26.6987191	0.00356357
Residuos	5	0.01654928	0.00330986		
Total	6	0.10491817			

Se rechaza Ho; existe una diferencia significativa entre las pendientes.

**Anexo v PRUEBA DE ANDEVA PARA LA COMPARACIÓN DE LAS PENDIENTES EN LAS
CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN DE CHL EN PRESENCIA DE DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE HE β CD A 37 ° C**

[HE β CD] Molaridad	Pendiente
0	1.7182
0.00079295	1.4927
0.00105727	1.4051
0.00132158	1.2376
0.00207929	0.7496
0.00629075	0.4244
0.01039648	0.3197

Prueba de hipótesis:

Ho: No existe diferencia significativa entre las pendientes

Hi: Existe diferencia significativa entre las pendientes

Criterio de Aceptación:

Si F calculada > F crítica se rechaza Ho, por lo tanto existe una diferencia significativa entre las pendientes

Si F calculada < F crítica se acepta Ho, por lo tanto no existe una diferencia significativa entre las pendientes

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	Valor crítico de F ($\alpha=0.05$)
Concentración	1	1.74380549	1.74380549	116.391232	0.00011867
Residuos	5	0.07491138	0.01498228		
Total	6	1.81871687			

Se rechaza Ho; existe una diferencia significativa entre las pendientes.

**Anexo vi FICHA TÉCNICA DE LA 2-HIDROXI-ETIL- β -CICLODEXTRINA (HE β CD)
DE ACUERDO A PROVEEDOR**

**YIMING FINE CHEMICAL CO. ,LTD
CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Nombre del Producto: 2-Hidroxi-Etil-beta-Ciclodextrina (Grado Farmacéutico)

Lote No: 021222

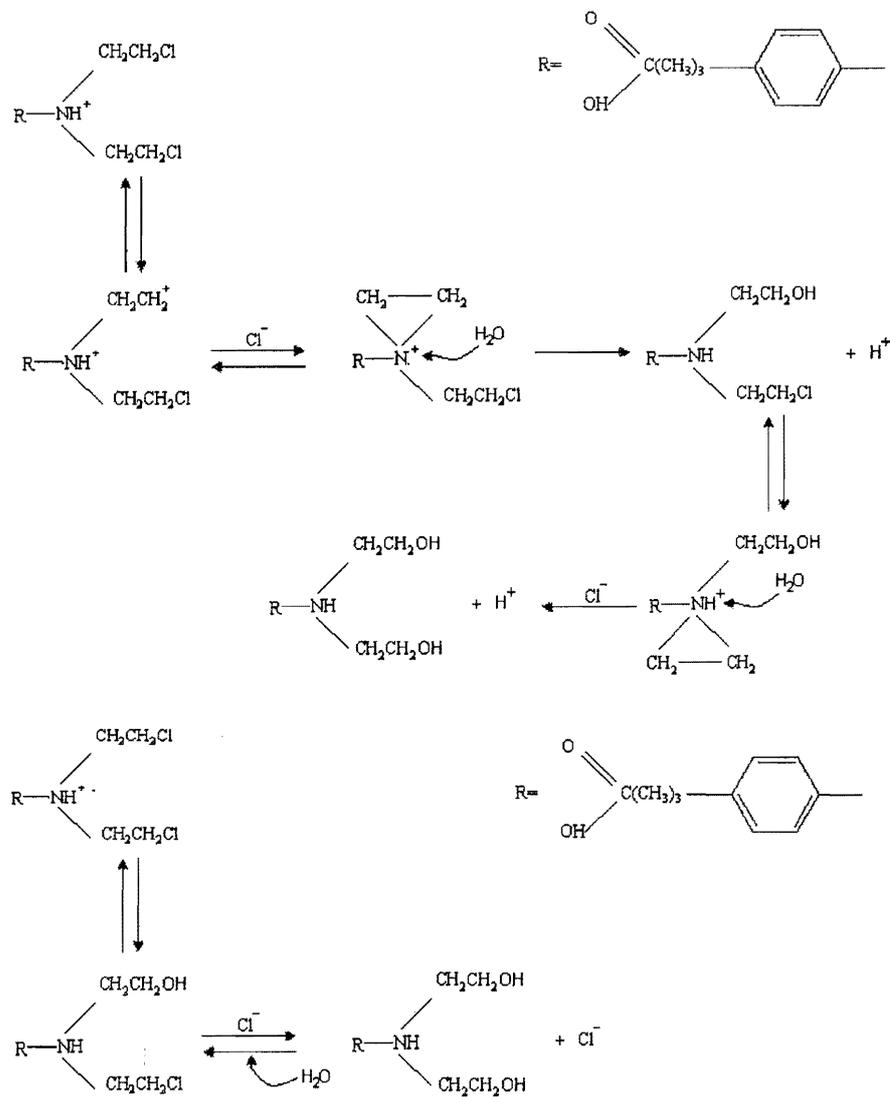
Fecha de Producción: Diciembre 22, del 2002

No	Prueba	Valor Estándar	Resultados
1	Apariencia	Polvo Blanco	Calificado
2	Contenido	$\geq 99\%$	Calificado
3	Solubilidad en Agua	$\geq 80\%$	83%
4	Grado de Substitución	4 – 6	4.8
5	Humedad	$\geq 0.3\%$	0.21%
6	pH al 1 % en solución	6.8 – 7.2	7.11
7	Metales pesados (como plomo)	$\geq 0.001\%$	< 0.001%
8	Cenizas	$\geq 0.2\%$	0.14%
9	Arsénico	$\geq 0.0008\%$	<0.0008%
10	Cloruro de Sodio	$\geq 0.2\%$	0.12%
11	Beta Ciclodextrina no modificada	$\geq 0.05\%$	< 0.05%
12	Glicol	$\geq 0.2\%$	0.13%
Resultados	El producto arriba mencionado esta calificado por nuestro producto estándar		

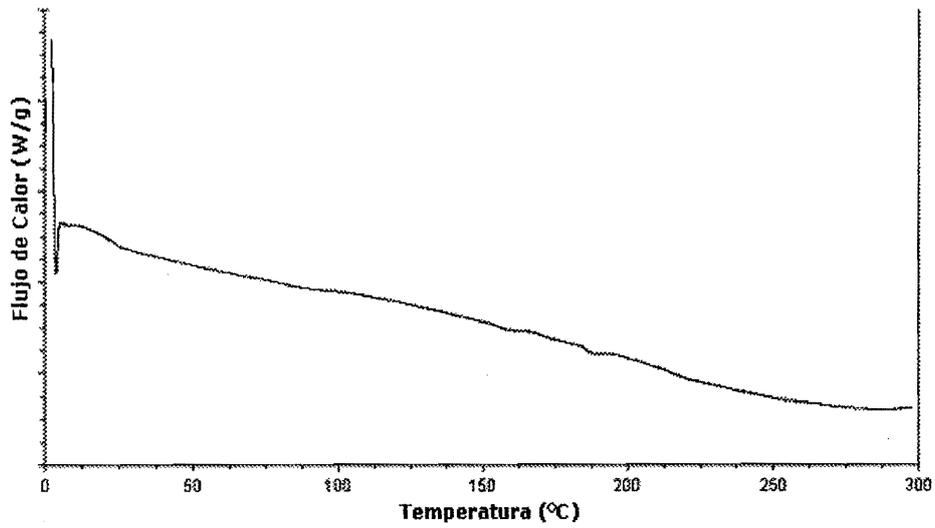
Analista: Gu Zhiming

Certificó: Chen Jiangping

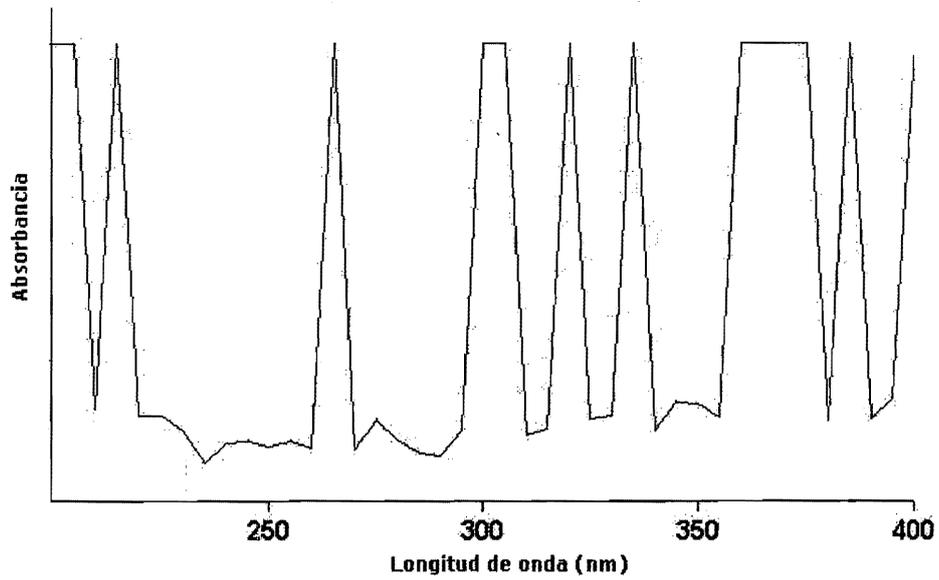
**Anexo vii CONVERSIÓN E HIDRÓLISIS DEL CLORAMBUCILO (CHL)
PARA COMPARACIÓN CON SUS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN**



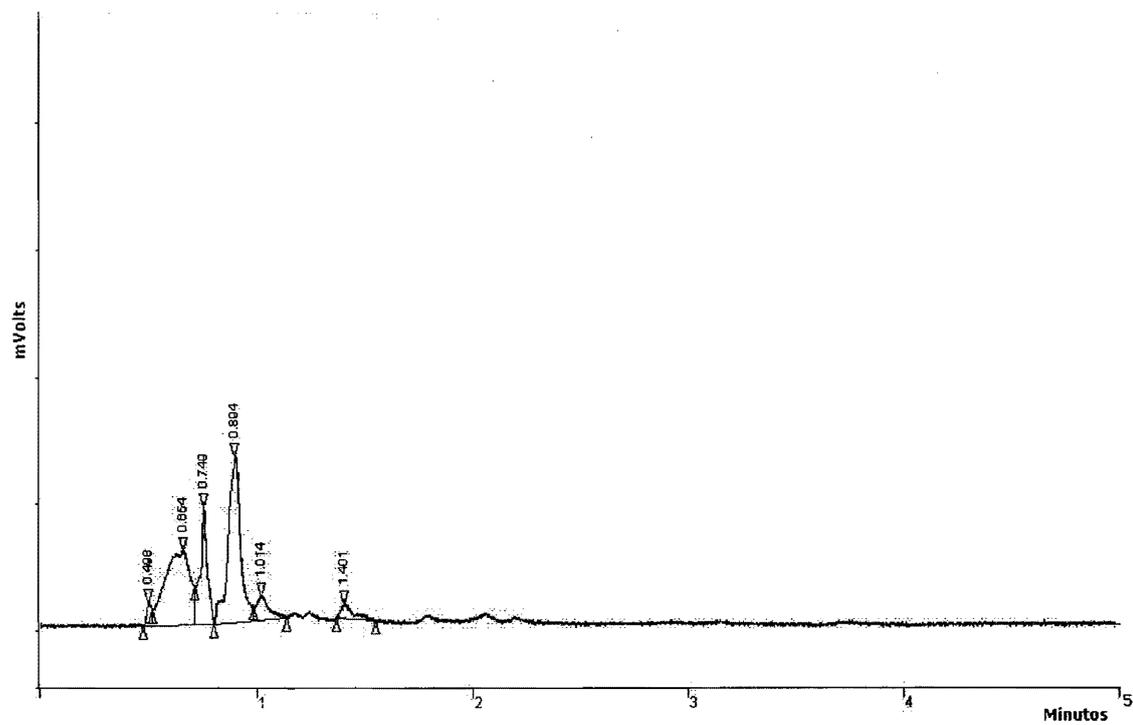
Mecanismos en la degradación del CHL en solución acuosa. (43)



DSC.- Termograma que muestra el CHL degradado.



UV.- Espectro de absorción para el CHL degradado.



HPLC.- Cromatograma obtenido para el CHL degradado.

**Anexo viii TRATAMIENTO DE DATOS: PERMEACIONES A TRAVES DE MUCOSA BUCAL
PORCINA DEL CHL Y SUS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN**

PERMEACIÓN SIN PROMOTOR (HE β CD) CHL SOLO

Tiempo (hrs)	Celda 1 (mg/cm ²)	Celda 2 (mg/cm ²)	Celda 3 (mg/cm ²)	Celda 4 (mg/cm ²)	Celda 5 (mg/cm ²)	Celda 6 (mg/cm ²)	Promedio	SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.0036	0.0036	0.0036	0.0036	0.0036	0.0065	0.0041	0.0011
0.50	0.0166	0.0111	0.0293	0.0309	0.0256	0.0332	0.0245	0.0080
0.75	0.0305	0.0509	0.0870	0.0589	0.0732	0.0396	0.0567	0.0192
1	0.0644	0.1261	0.1629	0.0961	0.0950	0.0585	0.1005	0.0357
2	0.1217	0.2426	0.4742	0.1922	0.3561	0.1050	0.2486	0.1306
3	0.1377	0.3926	0.5050	0.6704	0.4817	0.4029	0.4317	0.1600
4	0.1911	0.7046	0.8199	0.7899	1.1251	0.4636	0.6824	0.2933
5	0.2163	1.2249	0.8894	1.3354	1.4476	0.7662	0.9800	0.4168
6	0.3238	1.4647	1.0844	1.4861	1.5899	0.9403	1.1482	0.4352
7	0.3247	1.4683	1.0913	1.5979	1.7926	1.1557	1.2384	0.4748
8	0.3294	1.4813	1.0937	1.6307	1.8114	1.1625	1.2515	0.4819
Promedio total 8mg/cm ² = 1.2515								
SD \pm 0.5278								

PERMEACIÓN MEZCLA FÍSICA

Tiempo (hrs)	Celda 1 (mg/cm ²)	Celda 2 (mg/cm ²)	Celda 3 (mg/cm ²)	Celda 4 (mg/cm ²)	Celda 5 (mg/cm ²)	Celda 6 (mg/cm ²)	Promedio	SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.1230	0.1436	0.1900	0.0468	0.1493	0.0176	0.1117	0.0602
0.5	0.3184	0.2533	0.3865	0.1044	0.1982	0.0977	0.2264	0.1057
0.75	0.4689	0.3159	0.5104	0.1105	0.3523	0.2030	0.3268	0.1395
1	0.6817	0.4012	0.6553	0.1771	0.3638	0.2632	0.4237	0.1875
2	0.9196	0.4706	0.7810	0.2338	0.4103	0.3026	0.5197	0.2488
3	0.9382	0.5302	0.7837	0.2825	0.4208	0.3102	0.5443	0.2420
4	0.9428	0.5615	0.8330	0.3246	0.4640	0.3508	0.5795	0.2335
5	1.0168	1.1161	1.0327	0.6542	0.6945	0.6387	0.8588	0.1995
6	1.2703	2.0713	1.4947	1.3633	0.8253	1.0338	1.3431	0.3922
7	1.4852	2.6690	1.6029	2.7535	1.3193	1.2227	1.8421	0.6266
8	1.7172	2.8197	2.1862	4.0758	1.5635	1.3036	2.2777	0.9406
Promedio total (mg/cm ²) = 2.2776								
SD \pm 1.0304								

PERMEACIÓN COMPLEJO COEVMET

Tiempo (hrs)	Celda 1 (mg/cm ²)	Celda 2 (mg/cm ²)	Celda 3 (mg/cm ²)	Celda 4 (mg/cm ²)	Celda 5 (mg/cm ²)	Celda 6 (mg/cm ²)	Promedio	SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.0275	0.0481	0.0528	0.0438	0.0252	0.0493	0.0395	0.0132
0.5	0.0551	0.0984	0.1250	0.0884	0.0527	0.1191	0.0866	0.0327
0.75	0.0736	0.1417	0.2078	0.1334	0.0730	0.2089	0.1354	0.0609
1	0.0952	0.2104	0.2508	0.2081	0.0985	0.3328	0.1937	0.0909
2	0.1184	0.3783	0.4603	0.3429	0.1412	0.5478	0.3246	0.1665
3	0.2070	0.7015	0.7793	0.6233	0.2674	0.8291	0.5559	0.2617
4	0.3086	1.1484	1.2776	0.9860	0.4246	1.2299	0.8779	0.4149
5	0.4594	1.7246	1.7573	1.4493	0.6484	1.7594	1.2729	0.5839
6	0.6719	2.3647	2.1139	1.9128	0.8962	2.3361	1.6767	0.7418
7	0.9511	3.0519	2.5732	2.4785	1.1751	3.0109	2.1513	0.9254
8	1.2535	3.7761	3.0568	3.2036	1.6801	3.7993	2.7218	1.1060
Promedio total (mg/cm ²) = 2.7949								
SD ± 1.0794								

PERMEACIÓN COMPLEJO AMASADO

Tiempo (hrs)	Celda 1 (mg/cm ²)	Celda 2 (mg/cm ²)	Celda 3 (mg/cm ²)	Celda 4 (mg/cm ²)	Celda 5 (mg/cm ²)	Celda 6 (mg/cm ²)	Promedio	SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.0109	0.0113	0.0114	0.0117	0.0103	0.0106	0.0110	0.0005
0.5	0.0360	0.0330	0.0259	0.0270	0.0428	0.0284	0.0322	0.0059
0.75	0.0389	0.0722	0.0537	0.2345	0.1338	0.0482	0.0969	0.0689
1	0.0647	0.1467	0.1242	0.3280	0.1660	0.0693	0.1498	0.0879
2	0.3369	0.2974	0.2516	0.7576	0.2597	0.2595	0.3605	0.1800
3	0.3524	0.7206	0.3298	0.8349	0.3402	0.2947	0.4788	0.2147
4	0.3532	0.7518	0.8362	1.2483	0.7968	0.3143	0.7168	0.3159
5	0.4092	1.2353	0.8704	1.9263	1.3543	0.9086	1.1174	0.4709
6	0.9411	1.7675	1.4005	3.1632	1.4335	0.7795	1.5809	0.7794
7	1.2466	1.7758	2.0288	4.3113	2.2003	1.4028	2.1609	1.0167
8	0.9129	1.7001	1.9465	4.2463	2.1386	1.2192	2.0273	1.0759
Promedio total (mg/cm ²) = 2.0273								
SD ± 1.1786								

Anexo ix PRUEBA DE ANADEVA PARA LA COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD MÁXIMA ACUMULADA (C.M.A.) POR UNIDAD DE ÁREA PARA LAS PERMEACIONES A TRAVÉS DE MUCOSA BUCAL PORCINA

<i>Cantidad Máxima Acumulada de CHL (C.M.A.) en 8 h</i>						
	C.M.A. [=] mg/ cm ²		SD	C.M.A. [=] mmol/ cm ²		SD
CHL	1.2515	±	0.5278	0.004114	±	0.001735
M. F.	2.2776	±	1.0304	0.006773	±	0.003356
Amasado	2.0273	±	1.1786	0.006664	±	0.003874
CoevMet	2.7949	±	1.0794	0.009188	±	0.003548

Prueba de hipótesis:

Ho: No existe diferencia significativa entre la C.M.A.

Hi: Existe diferencia significativa entre la C.M.A.

Criterio de Aceptación:

Si F calculada > F crítica se rechaza Ho, por lo tanto existe una diferencia significativa entre las pendientes

Si F calculada < F crítica se acepta Ho, por lo tanto no existe una diferencia significativa entre las pendientes

<i>Fuentes de variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F calculada</i>	<i>Valor crítico de F (α=0.05)</i>
Tratamiento	1	0.9591762	0.9591762	6.85379969	0.12016576
Residuos	2	0.27989619	0.13994809		
Total	3	1.23907239			

Se rechaza Ho; existe una diferencia significativa entre la cantidad máxima acumulada.

Anexo x PRUEBA DE ANADEVA PARA LA COMPARACIÓN DEL FLUJO OBTENIDO EN LAS PERMEACIONES A TRAVÉS DE MUCOSA BUCAL PORCINA

<i>Flujo</i>						
	J [=] (mg/h cm ²)		SD	J [=] (mmol/h cm ²)		SD
CHL	0.1987	±	0.0873	0.000653	±	0.0002868
M.F.	0.2860	±	0.2929	0.000940	±	0.0009631
Amasado	0.2452	±	0.1201	0.000806	±	0.0003948
CoevMet	0.3282	±	0.1343	0.001079	±	0.006441

Prueba de hipótesis:

Ho: No existe diferencia significativa entre los flujos.

Hi: Existe diferencia significativa entre la flujos.

Criterio de Aceptación:

Si F calculada > F crítica se rechaza Ho, por lo tanto existe una diferencia significativa entre las pendientes

Si F calculada < F crítica se acepta Ho, por lo tanto no existe una diferencia significativa entre las pendientes

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	Valor crítico de F (α=0.05)
Tratamiento	1	0.0060448	0.00604476	3.80496572	0.1903906
Residuos	2	0.0031773	0.00158865		
Total	3	0.0092221			

Se rechaza Ho; existe una diferencia significativa entre los flujos.

Anexo xi PRUEBA DE TUKEY PARA ESTABLECER ENTRE CUALES TRATAMIENTOS EXISTE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA DE LA CANTIDAD MÁXIMA ACUMULADA OBTENIDA EN LAS PERMEACIONES A TRAVÉS DE MUCOSA BUCAL PORCINA

Tratamiento C.M.A.	CHL 1.2515	M.F. 2.2776	Amasado 2.0273	CoevMet 2.7949
CHL 1.2515	0	X	X	X
M.F. 2.2776	1.0261	0	X	X
Amasado 2.0273	0.7758	0.2503	0	X
CoevMet 2.7949	1.5434	0.5173	0.7676	0

Prueba de hipótesis:

Ho: No existe diferencia significativa entre las medias de C.M.A. del experimento entre tratamientos

Hi: Existe diferencia significativa entre las medias de C.M.A. del experimento entre tratamientos

Si la DVS calculada > la diferencia entre las medias se rechaza Ho, por lo tanto existe una diferencia significativa entre ellas

Si la DVS < la diferencia entre las medias se acepta Ho, por lo tanto no existe una diferencia significativa entre ellas

$$DVS = q_{\alpha, K, N-K} (PC/n)^{1/2}$$

DVS: Diferencia Verdaderamente Significativa

α : Nivel de significancia (0.95)

K: Número de medias del experimento

N: Número total de observaciones del experimento

n: Número total de observaciones del tratamiento

PC: Promedio de los cuadrados (ANADEVA)

q: Valor obtenido de tablas con valor de α

$$DVS = 3.96 (0.13994809 / 4)^{1/2}$$

$$DVS = 0.7354$$

Por lo tanto existe diferencia significativa entre los siguientes pares de medias de C.M.A.:

CHL-M.F.; CHL-Amasado; CHL-CoevMet; Amasado-CoevMet

**Anexo xii PRUEBA DE TUKEY PARA ESTABLECER ENTRE CUALES TRATAMIENTOS
EXISTE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA DEL FLUJO OBTENIDO EN LAS PERMEACIONES A
TRAVÉS DE MUCOSA BUCAL PORCINA**

Tratamiento C.M.A.	CHL 0.1987	M.F. 0.2860	Amasado 0.2452	CoevMet 0.3282
CHL 0.1987	0	X	X	X
M.F. 0.2860	0.0873	0	X	X
Amasado 0.2452	0.0465	0.0408	0	X
CoevMet 0.3282	0.1295	0.0422	0.083	0

Prueba de hipótesis:

Ho: No existe diferencia significativa entre las medias de flujo del experimento entre tratamientos

Hi: Existe diferencia significativa entre las medias de flujo del experimento entre tratamientos

Si la DVS calculada > la diferencia entre las medias se rechaza Ho, por lo tanto existe una diferencia significativa entre ellas

Si la DVS < la diferencia entre las medias se acepta Ho, por lo tanto no existe una diferencia significativa entre ellas

$$DVS = q_{\alpha, K, N-K} (PC/n)^{1/2}$$

DVS: Diferencia Verdaderamente Significativa

α : Nivel de significancia (0.95)

K: Número de medias del experimento

N: Número total de observaciones del experimento

n: Número total de observaciones del tratamiento

PC: Promedio de los cuadrados (ANADEVA)

q: Valor obtenido de tablas con valor de α

$$DVS = 3.96 (0.00039718 / 4)^{1/2}$$

$$DVS = 0.7354$$

Por lo tanto existe diferencia significativa entre los siguientes pares de medias de flujo:

CHL-M.F.; CHL-CoevMet; Amasado-CoevMet