



***“ESTUDIOS
BIOFARMACÉUTICOS IN
VITRO DE COMPUESTOS
MODELO Y DE SUS
COMPLEJOS
MULTICOMPONENTES”***

TESIS DOCTORAL

**Alicia Delrivo
-2013-**

Trabajo de Tesis doctoral realizado en:

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

Para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

DIRECTORA DE TESIS

Dra. MARCELA LONGHI

COMISIÓN DE TESIS

Dra. GLADYS GRANERO

Dra. ELBA BUJAN

Dra. CLARA MONFERRAN

EVALUADOR EXTERNO

Dra. ADRIANA I. SEGALL (Universidad de Buenos Aires)

Agradecimientos

A la Dra. Longhi, por ser mi directora de tesis, por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto y por su apoyo en todas las decisiones que tomé.

A la comisión de tesis, las Dras Granero, Bujan y Monferran, por el asesoramiento profesional que me brindaron todos estos años, los cuales valoro mucho y agradezco.

A la Dra. Segall, por haber aceptado ser mi evaluadora externa.

A la Dra. Gloria Bonetto, Dra Virginia Aiassa y Dr. Quevedo, por la realización y asesoramiento en los diferentes ensayos que realicé con cada uno de ellos.

A los grupos de trabajo de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca y Facultad de Ciencias Farmacéuticas UNESP, Brasil; porque encontré en ellos unos grandes compañeros a pesar del poco tiempo que pude compartir.

A las chicas del laboratorio, Claudia, Ariana, Carolina, Renée, Julia, Gladys, Noel, Noel, Jimena, Dra. Ortiz, Dra. Longhi, por compartir día a día el espacio, por soportar mi voz alta y por estar siempre dispuestas a brindarme ayuda cuando lo necesité.

A mis compañeros de docencia, Moni, Esteban, Sergio, Fredy y Dra. Briñon, por todos estos años compartidos, muy contenta de haberlos conocido y gracias por compartir esta grata tarea que es enseñar!!!

A mis amigos, que con los años conocí y pude compartir muchas cosas gratas, charlas, almuerzos y demás encuentros extracurriculares, Moni, Sole, Julia, Flavia, Diego, Eliseo, Sergio, Noel, Caro, Renée, Dany, Gaby, Marina, Silvi. Gracias por todo, los voy a extrañar!!!!

A Manu y Fabi, compañeros desde hace años, siempre dispuestos a brindar ayuda y una oreja cuando lo necesité, gracias por estar siempre!!!!!!

A los chicos de orgánica Flor, Ani, Jesi, el Manu, la Manu, Eze, Ariel, gracias por todas las charlas en los pasillos!!!!

A todos mis compañeros del departamento de farmacia.

A mis amigos de la infancia y los de la facultad.

A mi familia, mami y papi, gracias por auspiciar y apoyar toda mi carrera, por haberme dado la oportunidad de estudiar, por estar siempre, por ser como son, los quiero mucho.

A mis hermanos, cuñados y sobrinito, Alber, Leo, Mari, Poli, Fer, Anto, Meli y Bauti, gracias chicos por compartir todos estos años conmigo, por estar siempre a mi lado y por aguantarme, los quiero mucho también.

A mi abuela, una gran persona, un ejemplo de vida, gracias por cuidarnos y querernos siempre, te quiero mucho.

A Ani, Joaco, Facu y Leo, personas muy importantes para mi, gracias por estar siempre.

A Pedri y Siri, por ser parte de mi familia y estar a mi lado todos estos años.

Y por ultimo, quería agradecerle especialmente a niki, el cual me acompañó y aguantó; por su apoyo y sobre todo por su amor. Gracias vida, te amo con todo mi corazón.

Abreviaturas	I
Resumen	V
Objetivos	IX
Capítulo 1. Introducción general	1
1.1 Medicamento e Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA).....	3
1.1.1 Consideraciones Generales de los IFAs.....	3
1.2 Membranas biológicas.....	4
1.2.1 Permeabilidad de las membranas biológicas.....	5
1.3 Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB).....	6
1.4 Membranas artificiales.....	8
1.5 Solubilidad de los IFAs.....	8
1.6 Formación de complejo.....	9
1.6.1 Ciclodextrina.....	10
1.6.1.1 Consideraciones generales.....	10
1.6.1.2 Características estructurales.....	10
1.6.1.3 Aspectos Generales de las CDs derivatizadas.....	12
1.6.1.4 Consideraciones toxicológicas.....	13
1.6.1.5 Formación de complejos de inclusión con CDs.....	14
1.6.1.6 Ciclodextrinas en farmacia.....	15
1.7 Fármaco modelo estudiado [Sulfadiazina (SDZ)].....	16
1.8 Complejos multicomponentes. Aminoácidos (AA).....	17

1.9 Referencias bibliográficas.....	19
Capítulo 2. Preparación e identificación de complejos binarios y ternarios.....	23
Parte 1. Estudios de complejos binarios y ternarios en solución acuosa.....	25
2.1 Introducción.....	27
2.2 Materiales y Métodos.....	29
2.2.1 Materiales.....	29
2.2.2 Equipamiento.....	29
2.2.3 Validación del método analítico: Espectroscopía UV-VIS.....	29
2.2.4 Estudios de estabilidad de SDZ.....	29
2.2.5 Diagramas de solubilidad de fases.....	30
2.2.5.1 Estimación de las constantes de equilibrio.....	31
2.2.6 Análisis termodinámico del complejo obtenido entre SDZ y β CD.....	31
2.2.7 Resonancia magnética nuclear de protones (^1H RMN) y efecto de Overhauser en los ejes rotatorios (2D ROESY)	31
2.2.7.1 Determinación de K_s para el sistema SDZ: β CD aplicando la ecuación de Scott.....	32
2.2.8 Aplicación de la técnica espectroscópica de dicroísmo circular para la caracterización de complejos con CD.....	32
2.2.9 Incorporación de SDZ a una microemulsión.....	33
2.3 Resultados y Discusión.....	33
2.3.1 Sistemas binarios.....	33
2.3.1.1 Determinación de los DSFs.....	33

2.3.1.1.1 SDZ:CDs.....	33
2.3.1.1.2 SDZ:AAs.....	38
2.3.1.2 Análisis termodinámico del complejo obtenido entre SDZ y β CD.....	39
2.3.1.3 Espectros de ^1H RMN y de 2D ROESY de SDZ:CDs.....	40
2.3.1.3.1 ^1H RMN.....	40
2.3.1.3.2 Determinación de Ks para el sistema SDZ: β CD aplicando la ecuación de Scott.....	48
2.3.1.3.3 Estudios de 2D ROESY de los sistemas SDZ: β CD y SDZ:M β CD.....	48
2.3.1.4 Aplicación de DC para la caracterización de complejos con CDs.....	50
2.3.1.5 Preparación de una microemulsión y evaluación del uso conjunto de microemulsiones y CDs.....	51
2.3.2 Sistemas Ternarios.....	52
2.3.2.1 Determinación de los DSFs.....	52
2.3.2.2 Espectros de ^1H RMN y de 2D ROESY de SDZ:CDs:AAs.....	57
2.3.2.2.1 ^1H RMN.....	57
2.3.2.2.2 Estudios de 2D ROESY de los sistemas ternarios.....	62
2.4 Conclusión.....	65
2.5 Referencias bibliográficas.....	66
PARTE 2. Estudios de los complejos binarios y ternarios en estado sólido.....	69
2.1 Introducción.....	71
2.2 Materiales y Métodos.....	74
2.2.1 Materiales.....	74

2.2.2 Equipamiento.....	74
2.2.3 Preparación de los sistemas binarios y ternarios en estado sólido (SDZ:CDs, SDZ:CDs:AAs).....	74
2.2.4 Caracterización de los sistemas binarios y ternarios.....	75
2.2.4.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	75
2.2.4.2 Análisis Termogravimétrico (ATG).....	76
2.2.4.3 Difracción de Rayos X (DRX).....	76
2.2.4.4 Espectroscopia infrarrojo mediante el método de transformada de Fourier (FT-IR).....	76
2.2.4.5 Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	76
2.2.5 Estudios de disolución de los sistemas binarios y ternarios.....	77
2.3 Resultados y Discusión.....	77
2.3.1 Sistemas binarios.....	77
2.3.1.1 Análisis térmicos.....	77
2.3.1.2 Difracción de Rayos X.....	87
2.3.1.3 Espectroscopía IR (FT-IR).....	89
2.3.1.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	92
2.3.2 Sistemas Ternarios.....	95
2.3.2.1 Análisis Térmico.....	95
2.3.2.2 Difracción de Rayos X.....	99
2.3.2.3 Espectroscopía IR (FT-IR).....	100
2.3.2.4 Microscopía electrónica de barrido.....	101
2.3.3 Estudios de Disolución.....	103

2.4 Conclusión.....	106
2.4 Referencias bibliográficas.....	106
Parte 3. Modelado Molecular de βCD y sus complejos.....	111
2.1 Introducción.....	113
2.2 Materiales y Métodos.....	114
2.3 Resultados y Discusión.....	115
2.3.1 Estudios Computacionales.....	115
2.3.1.1 Análisis conformacional.....	115
2.3.1.2 Docking Molecular.....	116
2.3.1.3 Dinámica Molecular.....	117
2.3.1.4 Análisis Energético.....	118
2.4 Conclusión.....	119
2.5 Referencias bibliográficas.....	120
Capítulo 3. Estudios de permeabilidad a través de un modelo <i>in vitro</i>.....	123
3.1 Introducción.....	125
3.2 Materiales y Métodos.....	129
3.2.1 Materiales.....	129
3.2.2 Equipamiento.....	130
3.2.3 Elaboración de la membrana artificial.....	130
3.2.4 Estudio de permeabilidad a través de la membrana artificial.....	131
3.3 Resultados y Discusión.....	134

3.3.1	Correlación entre el valor de P_{app} a partir de la membrana artificial y el % Fa.....	134
3.3.1.1	Correlación de P_{app} y los datos de % Fa, en el modelo <i>in vitro</i> a pH 7,4-7,4.....	135
3.3.1.2	Correlación de P_{app} y los datos de % Fa, en el modelo <i>in vitro</i> a pH 5,5-7,4.....	140
3.3.2	Sensibilidad del modelo <i>in vitro</i> estudiado a ambos valores de pH.....	143
3.3.3	Establecimiento del límite entre alta y baja permeabilidad propuesto en el SCB....	144
3.3.4	Correlación entre Log $P_{o/a}$ y Log D, con respecto al valor de P_{app}	146
3.3.5	Efecto de las CDs y los AAs sobre el valor de permeabilidad aparente de SDZ.....	148
3.3.6	Efecto de la concentración de β CD utilizada, sobre la permeabilidad aparente de SDZ en el complejo SDZ: β CD.....	153
3.4	Conclusión.....	155
3.5	Referencias bibliográficas.....	156
Capítulo 4. Ensayos microbiológicos de SDZ y sus complejos multicomponente.....		161
4.1	Introducción.....	163
4.2	Materiales y Métodos.....	165
4.2.1	Materiales.....	165
4.2.2	Estudios Antimicrobianos.....	165
4.3	Resultados y Discusión.....	166
4.3.1	Actividad antimicrobiana.....	166
4.4	Conclusión.....	168
4.5	Referencias bibliográficas.....	168

Capítulo 5. Conclusiones generales y proyecciones	169
5.1 Conclusiones Generales.....	171
5.2 Proyecciones.....	174
Anexos	175
Anexo 1. DFS.....	177
Anexo 2. Estimación de la Ks.....	179
Anexo 3. Estructuras Químicas.....	181
Anexo 4. Espectros RMN de complejos ternarios.....	183
Anexo 5. Curvas, espectros, difractogramas, imágenes.....	187
Anexo 6. Datos de IFAs usados como estándares.....	205
Anexo 7. Trabajos de investigación publicados	207

Abreviaturas

% Fa: Fracción de dosis oral absorbida en humanos

^1H RMN: Resonancia magnética nuclear de protones

2D: bidimensional

A: área de la membrana

AA: Aminoácidos

ABS: Absorbancia

ARG: Arginina

ASP: Ácido Aspártico

ATG: Análisis termogravimétrico

BBB-PAMPA: Barrera hematoencefálica-Parallel Artificial Membrane Permeation Assay

BCS: Sistema de Clasificación Biofarmacéutico

BM-PAMPA: Bio-mimético-Parallel Artificial Membrane Permeation Assay

$C_{d,0}$: Concentración inicial en el compartimento donador

$C_{d,final}$: Concentración medida al final del experimento en el compartimento donador

CD: Ciclodextrina

C_{GI} : Concentración de IFA en el tracto gastrointestinal

CIM: Concentración inhibitoria Mínima

CLog $P_{o/a}$: Coeficiente de partición n-octanol/agua calculado

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CO: Coevaporado

CoTA: Cotensioactivo

C_p : Concentración de IFA en el plasma

$C_{r,final}$: Concentración medida al final del experimento en el compartimento receptor

D: Coeficiente de difusión [representa el flujo de una sustancia por unidad de gradiente de concentración (cm^2/s)]

DC: dicroísmo circular

DRX: Difracción de rayos X

DSC: Calorimetría Diferencial de Barrido

DSF: Diagrama de solubilidad de fase

EMA: European Medicines Agency, siglas en inglés

FCS: fosfatidilcolina de soja

FDA: Food and Drug Administration, siglas en inglés

FO: Fase oleosa

FT-IR: Espectroscopía IR

$G_2\beta\text{CD}$: Maltosil- βCD

GLI: Glicina

GLU: Ácido Glutámico

H: espesor de membrana

HDM-PAMPA: n-hexadecano- Parallel Artificial Membrane Permeation Assay

HP β CD: Hidroxipropil- β -ciclodextrina

HP γ CD: Hidroxipropil- γ CD

I: (S_{\max}/S_0) Incremento en la solubilidad

IFA: Ingrediente Farmacéutico Activo

K: coeficiente de partición lípido/agua del fármaco en la membrana biológica que controla la permeabilidad del fármaco.

L: Ligando

LEU: Leucina

LI: Liofilizado

Log D: Coeficiente de distribución

Log $P_{l/a}$: Coeficiente de Partición lípido/agua

Log $P_{o/a}$: Coeficiente de partición n-octanol/agua

ME: Microemulsión

MF: Mezcla Física

MH: caldo Mueller Hinton

MM-PBSA: *Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area*, siglas en ingles

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAMPA: *Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*

P_{app} : Coeficiente de permeabilidad aparente

PBS: soluciones reguladoras de fosfato

PM: Peso Molecular

RM β CD: β CD metilada al azar

ROESY: Espectroscopia de efecto nuclear de Overhauser en los ejes rotatorios

RSD: desviación estándar relativa

S: Sustrato

S₀: Solubilidad intrínseca

SBE β CD: Sulfobutileter- β CD

SCB: Sistema de Clasificación Biofarmacéutico

SD: Secado por spray (Spray-drying)

SDZ: Sulfadiazina

SEM: Microscopía Electrónica de Barrido

S_{max}: Solubilidad máxima

T: Temperatura

TA: Tensioactivo

TGI: Tracto gastrointestinal

UWL: Capa acuosa estática, siglas en inglés

V_d: Volúmen del compartimento donador

V_r: Volúmen del compartimento receptor

Objetivos

El objetivo general de este trabajo de tesis, estuvo orientado a la investigación de la absorción oral de SDZ, la cual es poco soluble y permeable, y mejorar estas características desfavorables a través de la formación de complejos de inclusión multicomponentes con ciclodextrinas y aminoácidos. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- ❁ Caracterizar y clasificar las propiedades de solubilidad de sulfadiazina y de los complejos binarios y multicomponentes obtenidos entre sulfadiazina, las ciclodextrinas y los aminoácidos.
- ❁ Desarrollar un nuevo método *in vitro*, que simule el comportamiento de las membranas de las células del tracto gastrointestinal, para evaluar y predecir la absorción oral potencial de nuevos ingredientes farmacéuticos activos.
- ❁ Caracterizar y clasificar las propiedades de permeabilidad de sulfadiazina y de los complejos binarios y multicomponentes obtenidos entre sulfadiazina, las ciclodextrinas y los aminoácidos.

La solubilidad y la permeabilidad están consideradas, en el marco del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS), como propiedades fundamentales para definir la velocidad y extensión de absorción del ingrediente activo de un producto farmacéutico.

La disolución del ingrediente farmacéutico activo (IFA), en los fluidos del tracto gastrointestinal (TGI), es una etapa esencial en la absorción de los compuestos que se administran por vía oral y por lo tanto, una adecuada solubilidad en agua es un requisito fundamental para la absorción oral y el éxito clínico de los IFAs cuando son administrados en formas farmacéuticas sólidas. Existen numerosas publicaciones acerca de la utilización de ciclodextrinas (CDs) en la administración de IFAs por vía oral, debido a la capacidad que tienen estos compuestos de influir, de manera favorable, sobre ciertas propiedades fisicoquímicas, a través de la formación de complejos de inclusión. Sin embargo, por diversas razones, la cantidad de CD que puede utilizarse en muchas formulaciones farmacéuticas, es limitada. Se observó que en presencia de algunos contraiones, pueden obtenerse resultados sinérgicos inesperados para la solubilidad de diversos compuestos. Por todo lo nombrado anteriormente, se procedió a mejorar las características de solubilidad acuosa y de permeabilidad del antibiótico sulfadiazina (SDZ), a través de la formación de complejos de inclusión con CDs y aminoácidos (AAs). En una primera etapa se prepararon e identificaron los complejos binarios y ternarios, SDZ:CD y/o AA:

✿ *En solución*, se realizaron diagramas de solubilidad de fases para obtener los valores de las constantes de estabilidad y las relaciones estequiométricas. Otra evidencia de la complejación se obtuvo de los espectros de ^1H RMN y 2D ROESY de las mezclas huésped-receptor, esta técnica permitió determinar el modo de interacción de la molécula huésped con la molécula de CD. Los resultados indican que se obtuvo la formación de complejos de inclusión, con una estequiometría 1:1, para los sistemas SDZ: β CD, SDZ:M β CD, SDZ:HP β CD, y un aumento en la solubilidad acuosa de SDZ. Por otro lado, también se obtuvieron complejos ternarios con los sistemas, los que demostraron tener un efecto sinérgico, frente a la solubilidad de SDZ, entre la CD y los AAs.

✿ *En estado sólido*, se prepararon los complejos de SDZ con las CDs y AAs, por diferentes metodologías, entre ellas la simple mezcla física (MF), el coevaporado (CO), el

lío-filizado (LI) y el secado por spray (SD). La caracterización de ellos se realizó por procedimientos termoanalíticos (DSC, ATG, DTA), por difracción de Rayos X, por espectroscopia IR y microscopía electrónica de barrido (SEM). En todos los casos se observó que, cuando los sistemas se elaboraron por las técnicas de LI y de SD (para el caso particular de SDZ:βCD), se forman verdaderos complejos.

Teniendo en cuenta que la mayoría de los IFAs se absorben a través del TGI por un transporte pasivo, en este trabajo de tesis, se realizaron estudios de permeación intestinal *in vitro*, utilizando celdas de difusión de Franz horizontales, donde una membrana artificial obtenida *in situ*, se colocó entre los compartimientos donador y receptor. El compartimiento receptor de la celda se llenó con una solución salina de fosfato (PBS) de pH 7,4. Por otro lado, el compartimiento donador se llenó con una solución de los IFAs considerados estándar, de una serie de 16, utilizados con la finalidad de validar el método *in vitro* desarrollado; o con una solución de SDZ, o con los complejos multicomponentes obtenidos con la SDZ, las CDs y/o los AAs.

De las pendientes de los perfiles de difusión [IFA acumulado por unidad de área en función del tiempo (s)], se obtuvo la velocidad de flujo para cada compuesto, dato utilizado luego para el cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}).

Los valores de P_{app} obtenidos se correlacionaron con los datos de porcentajes de dosis absorbidas (de los IFAs estándares) en humanos (% Fa) obtenidos de bibliografía, los cuales cubrieron un amplio rango de valores de absorción. Se obtuvo una ecuación específica, que correlacionó, como se comentó previamente, el valor de P_{app} con el % Fa. Cuando los estudios de permeación *in vitro* se realizaron en condiciones de isopH (7,4-7,4), se obtuvo un valor de correlación (r^2) igual a 0,96; mientras que cuando el pH del compartimiento donador fue de 5,5, la correlación fue igual a 0,88. De acuerdo a los resultados obtenidos, se podría suponer que el modelo *in vitro*, realizado a ambos valores de pH en el compartimiento donador, es un método reproducible tanto para IFAs que presentan un valor bajo, como así también alto, de % Fa.

Se obtuvo el valor de P_{app} para la SDZ y para los sistemas formados entre la SDZ, las CDs y/o los AAs, determinando que los sistemas aumentaron el valor de P_{app} del IFA, con respecto a la SDZ pura, siendo el sistema SDZ:βCD:GLI el que mayor valor de P_{app} produjo, independientemente del pH de estudio.

De acuerdo a sus propiedades de solubilidad acuosa y permeabilidad, en este trabajo, SDZ se clasificó como clase IV, del sistema de clasificación biofarmacéutico (SCB). Debido a la formación de los complejos, con CDs y AAs, SDZ se transformó en un

compuesto de clase III del SCB, ya que si bien su permeabilidad continuó siendo baja, se logró un aumento en su solubilidad acuosa con los sistemas SDZ:M β CD, SDZ: β CD:ARG, SDZ: β CD:GLI y SDZ: β CD:GLU.

En este capítulo se presentan los lineamientos generales, los cuales brindan un marco introductorio al desarrollo de este proyecto de investigación.

CAPÍTULO

1

INTRODUCCIÓN

GENERAL

Alicia Delrivo

Introducción General

1.1 Medicamento e Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA)

El término “medicamento” corresponde, según la Farmacopea Argentina^{i,1} a toda preparación o producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad o estado patológico, o para modificar sistemas fisiológicos en beneficio de la persona a quien se lo administra, mientras que principio activo o droga farmacéutica o ingrediente farmacéutico activo (IFA), es toda sustancia química o mezcla de sustancias relacionadas, de origen natural o sintético, que poseyendo un efecto farmacológico específico, se emplea en medicina humana.

1.1.1 Consideraciones Generales de los IFAs

Los IFAs deben alcanzar la circulación sistémica para poder ejercer su efecto terapéutico. La ruta o camino a seguir hasta lograrlo depende de la vía de administración que se utilice, de manera que, cuando ésta no es intravascular, el IFA debe atravesar una o más membranas biológicas, es decir, primero debe absorberse, para luego poder alcanzar la biofase y así, ejercer la acción farmacológica (biofarmacia y farmacocinética), para lo cual necesita lograr concentraciones adecuadas en el sitio donde ejercerá su acción. La concentración obtenida, que es función de la dosis administrada, también depende de la magnitud y la tasa de absorción, de la distribución, la unión o localización en tejidos, la biotransformación y su excreción; todos estos procesos, requieren el paso del IFA a través de las membranas celulares. Por lo tanto, es esencial considerar los mecanismos por los cuales estos IFAs atraviesan las membranas y también, sus propiedades fisicoquímicas que influyen en dicho desplazamiento. Entre las características importantes de un IFA se destacan su tamaño y forma molecular, su solubilidad en el sitio de absorción, su grado de

ⁱ La Farmacopea es el texto oficial que codifica los principios activos, excipientes y productos farmacéuticos y contiene las especificaciones que éstos deben cumplir para demostrar su calidad y resguardar la salud de la población.¹

ionización y la liposolubilidad relativa de sus formas ionizadas y no ionizadas.² Para que un IFA pueda absorberse, primero debe hallarse disuelto en los fluidos acuosos del lugar de absorción y posteriormente, difundir a través de las membranas biológicas.

1.2 Membranas biológicas

La superficie externa de las células está revestida por la membrana plasmática, una capa delgada de 6 a 10 nm de espesor compuesta por lípidos (principalmente fosfolípidos, los cuales poseen una cabeza polar o hidrofílica y largas cadenas hidrocarbonadas apolares o hidrofóbicas, y colesterol), proteínas e hidratos de carbono.³ La estructura básica, de acuerdo a la teoría de mosaico fluido, propuesta en 1972 por Singer y Nicholson,⁴ está formada por una bicapa lipídica (Figura 1.1).⁵

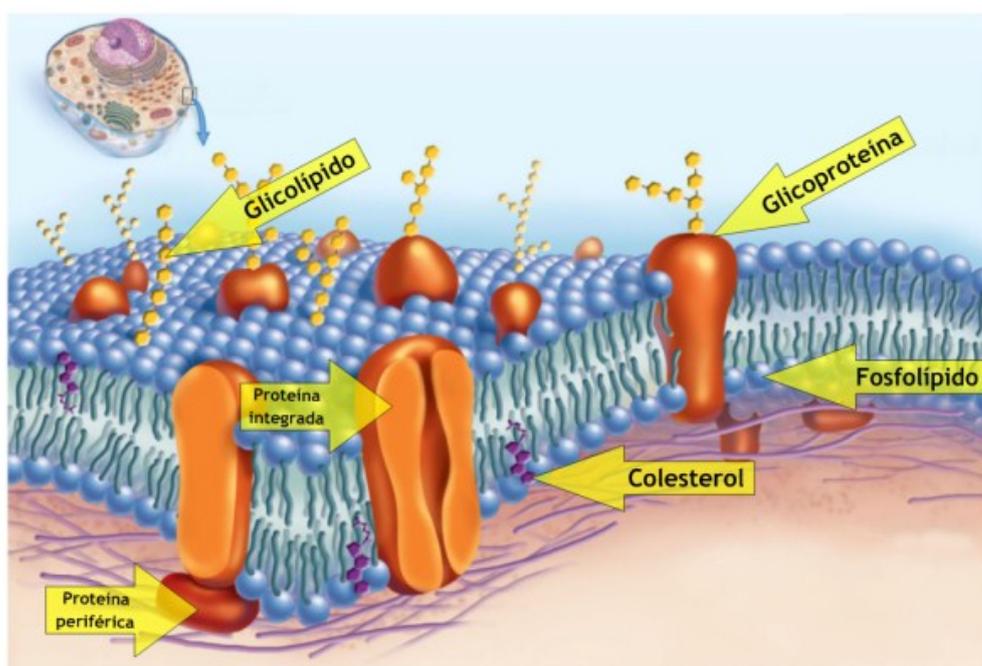


Figura 1.1. Esquema tridimensional de una membrana celular.

Las membranas biológicas son estructuras que cumplen diversas funciones. A pesar de esta diversidad, se ha demostrado que la estructura básica es común a todas ellas, es decir, las membranas propiamente absorbentes no se diferencian estructuralmente del resto de las membranas biológicas.⁵

Las membranas biológicas, no son simples fronteras inertes que compartimentan a la célula, sino estructuras que ejercen actividades complejas, como las siguientes:

- ↻ Constituyen verdaderas barreras permeables selectivas que controlan el pasaje de iones y de moléculas pequeñas, es decir de solutos. Así, la permeabilidad selectiva de la membrana impide el intercambio indiscriminado de los componentes de los orgánulos entre sí y de los componentes extracelulares con los de la célula.
- ↻ Proveen el soporte físico para la actividad ordenada de las enzimas que se asientan en ella.
- ↻ Posibilitan el desplazamiento de sustancias por el citoplasma, mediante vesículas transportadoras.
- ↻ Participan en los procesos de endocitosis y de exocitosis.
- ↻ En las membranas biológicas existen moléculas mediante las cuales las células se reconocen y se adhieren entre sí y con componentes de la matriz extracelular.
- ↻ Poseen receptores que interactúan específicamente con moléculas provenientes del exterior, como hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento y otros inductores químicos.⁶

1.2.1 Permeabilidad de las membranas biológicas

Según los casos, el pasaje a través de las membranas celulares se produce sin gasto de energía (transporte pasivoⁱⁱ), o por mecanismos que requieren de ella (transporte activo), ya que se realizan en dirección contraria a su gradiente de concentración o gradiente electroquímico. En el primer caso, la molécula del IFA, por lo común, penetra por difusión pasiva a favor de un gradiente de concentración, gracias a su solubilidad en la bicapa lipídica. Dicha transferencia es directamente proporcional a la magnitud del gradiente de concentración a uno y otro lado de la membrana, y también al coeficiente de partición lípido:agua ($\text{Log } P_{l/a}$) propio del IFA. Cuanto mayor sea el coeficiente mencionado, tanto más grande será la concentración de IFA en la membrana y más rápida su difusión. En el caso de compuestos ionizados, las concentraciones en equilibrio dinámico dependerán de diferencias de pH entre uno y otro lado de la membrana, lo cual puede influir en el estado de ionización de las moléculas a cada lado de dicha estructura y también, en el gradiente electroquímico correspondiente al ion.²

ⁱⁱ El transporte pasivo a través de la bicapa lipídica se denomina difusión simple, y el que se realiza a través de canales iónicos y permeasas, lleva el nombre de difusión facilitada.⁶

1.3 Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB)

En los estudios de preformulación es importante determinar la solubilidad acuosa del IFA, especialmente cuando se trata de un compuesto poco soluble, no sólo para conocer sus características biofarmacéuticas, sino porque es de interés para los estudios farmacológicos y toxicológicos. Además, puede evitarse así la consideración de que un IFA es inactivo o atóxico, por su demostrada inocuidad al ser administrado oralmente, cuando de hecho, se debe a que el mismo no ha podido absorberse por su escasa solubilidad en el medio acuoso del lugar de absorción.

Entonces, una adecuada solubilidad en agua es un requisito fundamental para la absorción oral y el éxito clínico de los IFAs, cuando son administrados en formas farmacéuticas sólidas.

Tanto la solubilidad como la permeabilidad de los IFAs están consideradas en el marco del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB) [propuesto por Amidon y col. en 1995]⁷ como propiedades fundamentales para definir la velocidad y extensión de absorción del IFA de un producto farmacéutico.⁵

Esta clasificación divide a los IFAs en cuatro clases, según sus características de solubilidad y de permeabilidad, y permite predecir correlaciones *in vitro/in vivo* para IFAs contenidos en formas de dosificación de liberación rápida (Tabla 1.1).

Una sustancia medicamentosa se considera altamente soluble cuando la mayor concentración posológica de la misma es soluble en 250 mLⁱⁱⁱ o menos de medio acuoso, en el intervalo de valores de pH entre 1,0 y 7,5 y a 37°C de acuerdo a la guía de la FDA,⁹ por otro lado, otros organismos como la EMEA (European Medicines Agency) y la OMS definen a la sustancia medicamentosa como altamente soluble al igual que la FDA, pero modificando el intervalo de pH, siendo en este caso entre 1,0 y 6,8.^{10, 11}

ⁱⁱⁱ La razón de utilizar 250 mL como criterio para la relación dosis:solubilidad, es debido a que en los estudios de bioequivalencia farmacocinética, la formulación de IFA debe ser ingerida con un gran vaso de agua, el cual corresponde a aproximadamente 250 mL.⁸

Tabla 1.1. Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.

CLASE	SOLUBILIDAD	PERMEABILIDAD	CORRELACIÓN
			<i>InVitro/InVivo</i> : POSIBILIDAD
I	Alta	Alta	Si la velocidad de disolución es más lenta que la velocidad gástrica.
II	Baja	Alta	Si la velocidad de disolución <i>in vitro</i> es similar a la velocidad de disolución <i>in vivo</i> .
III	Alta	Baja	La velocidad de absorción (permeabilidad) es el factor que limita la posibilidad de obtener correlaciones.
IV	Baja	Baja	Para IFAs de este grupo es difícil obtener correlación.

La permeabilidad se basa indirectamente en la medida de absorción (fracción de dosis absorbida) de una sustancia medicamentosa en el hombre y directamente en mediciones de velocidad de transferencia de masa por la membrana intestinal humana. Se considera que un IFA es altamente permeable cuando se determina que la medida de absorción en humanos es del 90% o más, de una dosis administrada en base a una determinación de balance de masa o en comparación con una dosis de referencia intravenosa según la FDA,⁹ por otro lado, los otros organismos como la EMEA y la OMS proponen que la medida de absorción en humanos sea del 85% o más de la dosis administrada.^{10,11}

Como alternativa, se pueden usar sistemas no humanos, capaces de predecir la medida de absorción del IFA en el hombre.

La absorción de IFAs, administrados por vía oral, es uno de los factores claves para determinar su biodisponibilidad.^{iv} Diferentes propiedades moleculares demostraron ser útiles para predecir el comportamiento de absorción pasiva de IFAs, entre las cuales se encuentran el Log $P_{1/a}$ y el coeficiente de distribución (Log $D_{1/a}$), el peso molecular (PM),

^{iv} Biodisponibilidad: Término que indica tanto la medida de velocidad de absorción como la cantidad total de un IFA que llega a la circulación general a partir de una forma farmacéutica administrada.

el estado de ionización y la capacidad de formar puentes hidrógeno; pero dificultades en la disponibilidad de estos datos restringieron su uso.¹²

Aunque se han propuesto diferentes métodos para la evaluación *in vitro* y la predicción de la permeabilidad gastrointestinal de los IFAs, hasta el presente no se cuenta con métodos oficiales disponibles para esta determinación.⁹

1.4 Membranas artificiales

Un enfoque prometedor radica en los ensayos de permeabilidad *in vitro* donde, una barrera química o bioquímica se utiliza para imitar las propiedades fisicoquímicas de las membranas celulares.¹³ Así, se diseñaron membranas artificiales con la finalidad de determinar la permeabilidad, por difusión pasiva, de los IFAs.

Existen membranas artificiales obtenidas por impregnación, con una fase oleosa, de un soporte derivado de celulosa. El mecanismo de transporte se basa en la presunción de que los poros impregnados en fosfolípidos constituyen una barrera efectiva con respecto al transporte y que son mayores que la dimensión de la molécula penetrante.

En la última década, el ensayo en paralelo con membranas artificiales, cuya sigla en inglés es PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*), se ha convertido en un estándar para predecir la absorción oral de los IFAs en humanos, en las primeras etapas del descubrimiento de los mismos.¹⁴ Muchos grupos de trabajo desarrollaron su propia versión de PAMPA, cuya principal diferencia radica en la composición de la membrana artificial.

1.5 Solubilidad de los IFAs

Como se comentó, una adecuada solubilidad acuosa de un IFA es fundamental para su éxito clínico; por ello resultó interesante abordar esta temática y desarrollar metodologías capaces de mejorar esta característica, cuando esta se considera inadecuada, a través de la formación de complejos.

1.6 Formación de complejos

Un complejo es una especie formada por la asociación de dos o más moléculas o iones interactuantes. Para perfeccionar este concepto, deben considerarse estas definiciones:

Un sustrato (S) es el interactuante cuyas propiedades físicas o químicas se observan experimentalmente.

Un ligando (L) es el segundo interactuante, cuya concentración puede ser variada en forma independiente en un estudio experimental.

Un complejo es una especie de estequiometría definida S-L, que puede formarse en un proceso de equilibrio en solución, así como también puede existir en estado sólido.

Es evidente que el complejo debe poseer algunas propiedades diferentes de las de sus componentes; de otro modo, no habría ninguna evidencia de su existencia. Entre las propiedades que se pueden alterar por la formación de complejos se encuentran: solubilidad, absorción de energía, conductancia, comportamiento de partición y reactividad química. Estudiando dichas propiedades del sustrato, en función de la concentración de ligando, puede reconocerse y describirse la formación de complejos.

La definición omite toda consideración de las fuerzas que actúan entre el sustrato y el ligando en el complejo; por lo tanto es muy general. En consecuencia, pueden restringirse más los fenómenos de interés al especificar que en la formación de complejos no intervienen los enlaces covalentes clásicos.

La clasificación de los complejos, conduce a dos tipos, basados en el tipo de enlace químico:

- Complejos de coordinación: se forman por enlaces de coordinación en los que un par de electrones se transfiere, en cierto grado, de un interactuante al otro.
- Complejos moleculares: se forman por interacciones no covalentes entre el sustrato y el ligando. Las fuerzas no covalentes^v surgen por interacciones electrostáticas de inducción y de dispersión e incluyen o dan origen a uniones de hidrógeno, transferencia de carga y efectos hidrófobos. Entre los

^v Las fuerzas no covalentes son de tres tipos amplios: La fuerza electrostática entre iones y moléculas que poseen momentos dipolares permanentes; la fuerza de inducción entre un ion y una molécula no polar o una molécula polar y una molécula no polar y por último, la fuerza de dispersión (de London) que actúa entre todas las moléculas.¹⁵

tipos de especies contempladas en esta clasificación se encuentran los complejos de inclusión.¹⁵

Los complejos de inclusión son entidades que comprenden dos o más moléculas, en las cuales una de las moléculas, llamada “hospedador”, incluye a otra molécula, llamada “huésped”, total o parcialmente, sólo por fuerzas físicas sin involucrar, por ejemplo, enlaces covalentes. Las ciclodextrinas (CDs) son típicas moléculas “hospedoras” y pueden incluir una gran variedad de moléculas.¹⁶

1.6.1 Ciclodextrinas

1.6.1.1 Consideraciones generales

Las CDs fueron descubiertas por Villiers en 1891. Sin embargo, su descripción, preparación y aislamiento se debe a Schardinger en 1903. En los años 50 se llevó a cabo la determinación exacta de su peso molecular (PM) y se confirmó su estructura cíclica mediante difracción de rayos X, momento a partir del cual comienzan a llamarse ciclodextrinas.^{17,18}

Las CDs se obtienen por la acción de la amilasa del *Bacillus maceraus* sobre el almidón, dando un crudo que contiene una mezcla de α , β y γ -CD y que, debido a razones estéricas, solo estas tres CDs son formadas en cantidades significativas.¹⁹

1.6.1.2 Características estructurales

Las CDs están formadas por distintos residuos de D (+) glucopiranososa, de conformación silla (Figura 1.2), unidos mediante enlaces α (1-4). La α , β y γ -CD contienen 6, 7 y 8 residuos de D (+) glucopiranososa (Tabla 1.2, Figura 1.3), respectivamente. Son compuestos cíclicos orgánicos de especial interés en la química supramolecular.¹⁸

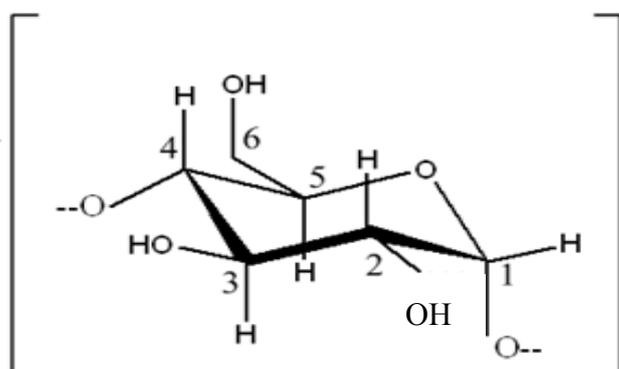


Figura 1.2. Diagrama esquemático de la molécula de D (+) glucopiranososa.

Tabla 1.2. Propiedades características de las CDs.

	α CD	β CD	γ CD
Peso Molecular	972	1135	1297
Punto de fusión (°C)	> 280	> 300	> 300
Solubilidad en agua (g/100 mL a 25 °C)	14.5	1.85	23.2
Número de moléculas de agua en el interior de la cavidad	6	11	17

Las CDs tienen aspecto de cono truncado (Figura 1.3), debido a la posición espacial característica de los distintos grupos funcionales de las unidades de glucopiranosas. Como consecuencia de esta disposición todos los grupos hidroxilos secundarios (correspondientes a los átomos de los C2 y C3 de las unidades de glucopiranosas) se encuentran situados en uno de los bordes de la cavidad, mientras que los hidroxilos primarios (correspondiente al átomo de C6) se encuentran en el otro extremo. La rotación de estos grupos funcionales reduce el tamaño efectivo de la cavidad, haciendo que ésta posea un aspecto de cono truncado más abierto hacia el lado de los hidroxilos secundarios. Esta disposición le proporciona, al interior de la cavidad, un carácter apolar, mientras que los bordes del cono son polares, debido a la presencia de los hidroxilos, lo que hace que estos compuestos sean hidrosolubles.¹⁷ La conformación de las CDs en solución es idéntica a la conformación en estado sólido.¹⁶

Todas son cristalinas, no higroscópicas (aunque forman varios hidratos),²⁰ estables y no presentan absorción en la región UV-VIS del espectro electromagnético. Son producidas industrialmente, aún en calidad farmacéutica.

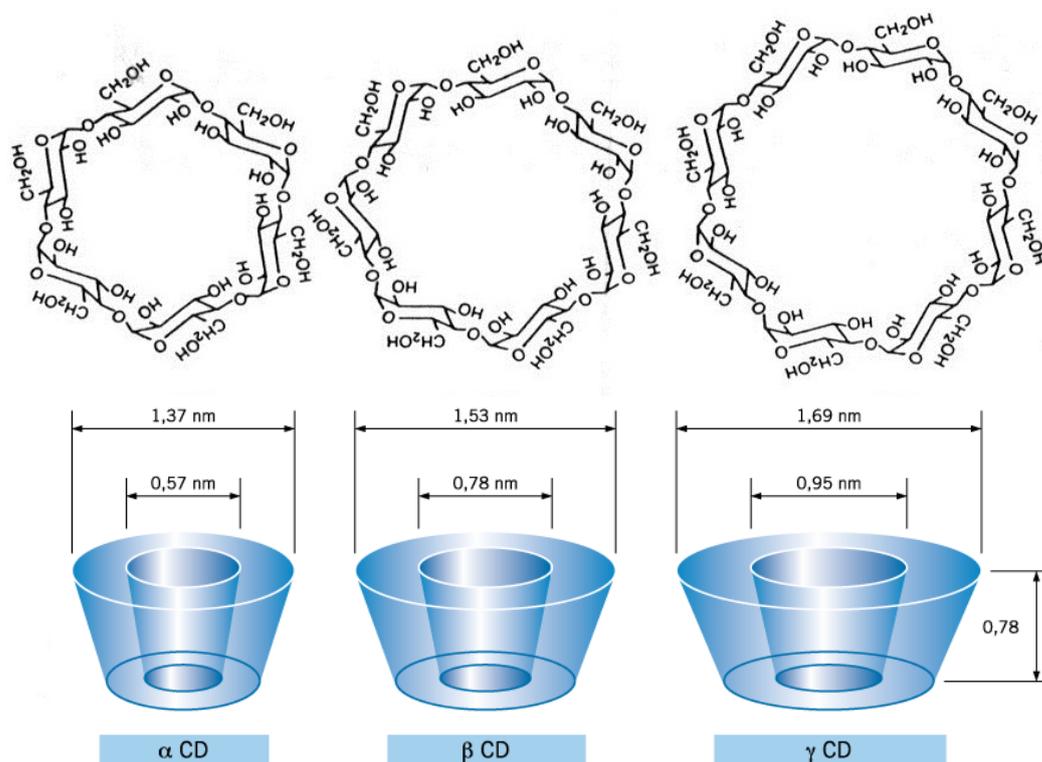


Figura 1.3. Estructura de las CDs.

1.6.1.3 Aspectos Generales de las CDs derivatizadas

La β CD es una de las CDs más utilizada, resistente a la hidrólisis enzimática por las β y α amilasas (de la saliva) y es poco hidrolizada en el intestino delgado, pero es fermentada por la microflora colónica. Por diversas razones, tales como su precio, la dimensión de la cavidad (262 Å³), y la disponibilidad, la β CD, como ya se comentó, es la más usada, representando el 95% de la producción y consumo;^{19,21} no obstante, presenta como principal inconveniente su baja solubilidad acuosa.

Afortunadamente, debido a modificaciones químicas y enzimáticas, la solubilidad de todas las CDs pudo ser aumentada. Las unidades de glucopiranososa, poseen tres grupos hidroxilos libres. Por ende, las CDs contienen 18 (α CD), 21 (β CD) o 24 (γ CD) grupos hidroxilo, los cuales pueden ser modificados químicamente. La reactividad relativa de los hidroxilos secundarios de los C2 y C3, así como la del hidroxilo primario del C6, dependen de las condiciones de reacción (pH, temperatura, reactivos).

Entre los derivados de interés farmacéutico se incluyen los hidroxipropílicos de β CD y γ CD (HP β CD y HP γ CD), la β CD metilada al azar (RM β CD), la sulfobutyleter- β CD (SBE β CD) y la maltosil- β CD (G₂ β CD).²² Estos derivados son utilizados para las siguientes finalidades:

- Aumento de la solubilidad de las CDs y de sus complejos.
- Aumento apropiado y/o asociación entre la CD y el huésped, con estabilización concomitante del mismo, reduciendo su reactividad y movilidad.
- Unión específica (catálisis) de los grupos en el sitio de enlace.

A continuación se detallan las propiedades fisicoquímicas más importantes de la β CD y sus derivados (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Comparación de las propiedades fisicoquímicas de la β CD y sus principales derivados.

	CDs			
	β CD	HP β CD	SBE β CD	RM β CD
Sustitución molecular	---	0,65	0,9	1,8
PM del compuesto anhidro	1135	1400	2163	1312
Log P (octanol/agua) a 25°C	-14	-11	< -10	-6
Solubilidad en agua a 25°C (mg/mL)	18,4	>600	> 500	> 600
H donador	21	21	15	8
H aceptor	35	39	53	35
Biodisponibilidad oral aproximada medida en ratas (%)	-0,6	≤ 3	1,6	≤ 12

1.6.1.4 Consideraciones toxicológicas

Los estudios toxicológicos de las CDs demostraron, luego de una administración oral, que son prácticamente no tóxicas, debido a la falta de absorción en el tracto gastrointestinal. Luego, numerosas evaluaciones demostraron que γ -CD, HP β CD, SBE β CD, β CD sulfatada y la maltosil- β CD son seguras, aún al ser administradas de manera parenteral. No obstante, se demostró que β CD, α CD y M β CD no son adecuadas para la administración parenteral,²³ debido a que son nefrotóxicas,¹⁶ si bien el mecanismo de toxicidad en el riñón no es claro, se comprobó una acumulación de cristales de CD o de un complejo insoluble de CD con colesterol.

1.6.1.5 Formación de complejos de inclusión con CDs

El principal interés de las CDs radica en su capacidad de formar complejos de inclusión con una gran cantidad de compuestos,²³ tanto en estado sólido como en solución. Se puede considerar como una auténtica encapsulación del huésped a nivel molecular, protegiéndolo del entorno en que se encuentra (Figura 1.4).

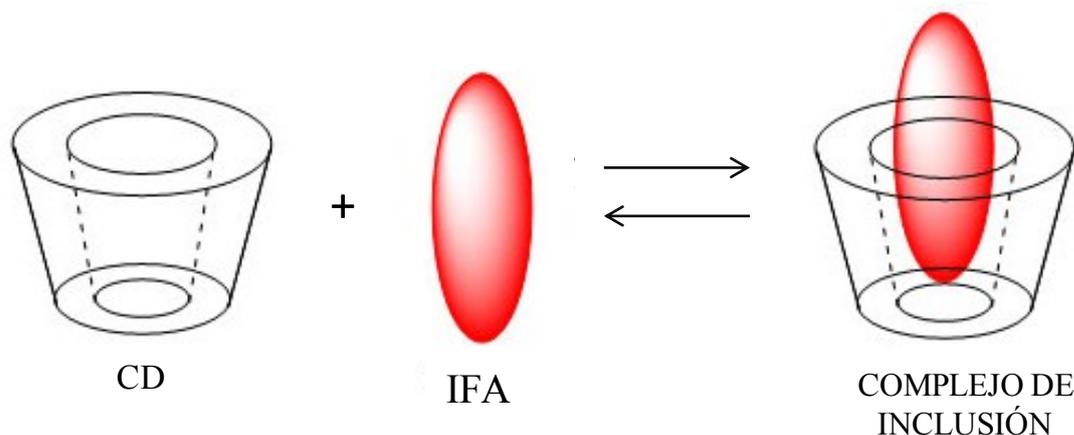


Figura 1.4. Esquema de formación de complejo.

Las CDs pueden incluir una gran variedad de moléculas huésped, de tamaño compatible con las dimensiones de su cavidad; aquellas de carácter hidrofóbico, se alojarán en el interior de la cavidad, a causa de interacciones hidrofóbicas de tipo Van der Waals, como así también, pueden establecerse interacciones polares, debido a la formación de puentes hidrógeno con los hidroxilos primarios. Los factores geométricos son los más decisivos en la penetración de la molécula huésped, comparado con los factores químicos.¹⁶ También es posible la formación de complejos con moléculas significativamente mayores que el tamaño de la cavidad, en este caso solo penetran ciertos grupos o ciertas cadenas laterales. Las moléculas de agua en la cavidad lipofílica, con una interacción polar-apolar, son reemplazadas por las moléculas huésped menos polares, ya que están más favorecidas energéticamente. Por lo tanto, los complejos de inclusión con las CDs son generalmente sustancias hidrofílicas, aún cuando un huésped hidrofóbico es incorporado en la cavidad.

1.6.1.6 Ciclodextrinas en farmacia

Las ciclodextrinas son ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica y en el área de investigación y desarrollo. En la actualidad hay más de 30 productos farmacéuticos comercializándose, los cuales contienen CDs,^{18,24} debido a que la formación de complejos tiene como finalidad lograr una mejora de las características del producto terminado, como por ejemplo, incrementar la solubilidad, y la estabilidad, como así también facilitar la absorción y liberación de IFAs. Al respecto, existen numerosas publicaciones en nuestro grupo de investigación, acerca de la utilización de ciclodextrinas (CDs) en la administración de IFAs por vía oral, debido a la capacidad que tienen estos compuestos de influir, de manera favorable, sobre la solubilidad acuosa y la estabilidad química de los mismos.^{25,26}

Además, existen publicaciones que citan sobre el efecto que ejercen las CDs en la liberación de IFAs a través de las membranas biológicas. En la mayoría de los estudios, las CDs aumentan la liberación de los IFAs, en otros casos no la afectan y en muy pocos, la reducen o previenen.^{24,27,28} Como se describe en la Figura 1.5, una vez que el IFA sólido es liberado en el tracto gastrointestinal, ya sea como IFA libre o como complejo con CD, la disolución y la permeación deben ocurrir, para que el IFA pueda ser absorbido.

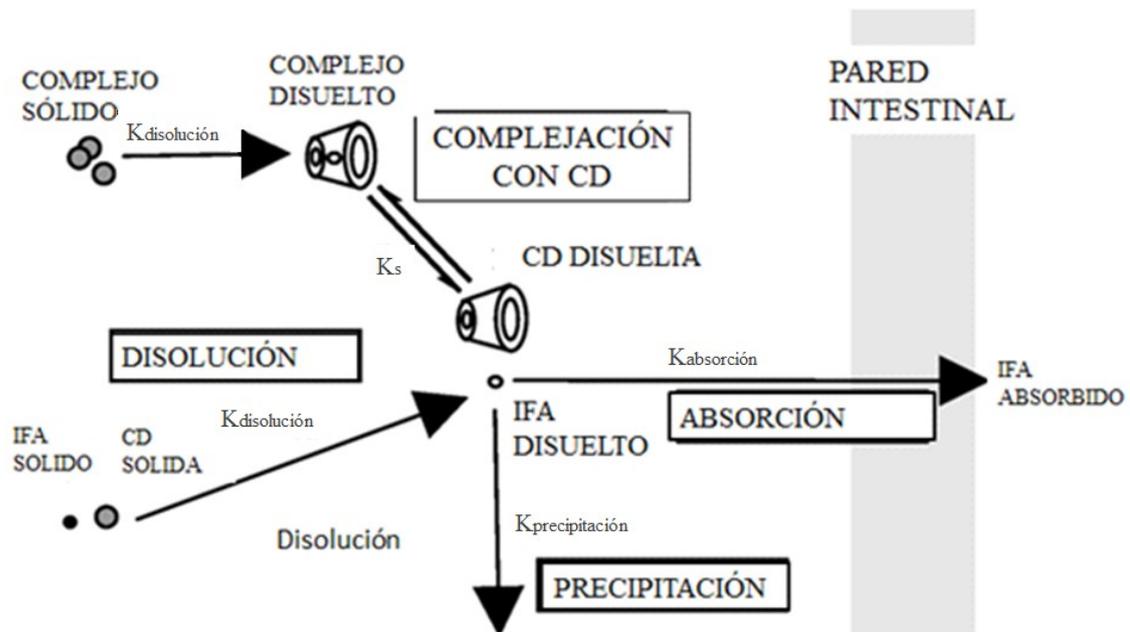


Figura 1.5. Diagrama del proceso de un IFA en el sistema gastrointestinal cuando se dosifica, como por ejemplo, como un complejo con CD.

Estos procesos que ocurren, son influenciados por la presencia de CD, e incluyen disolución del IFA y/o de los complejos, precipitación del IFA (si la concentración de IFA libre excede la solubilidad en el equilibrio), complejación del IFA y la CD y absorción del IFA. Estos eventos interactúan para influir, con el tiempo, en la cantidad de sólido, IFA o complejo en solución, absorbido. Las propiedades de los IFAs, las CDs y el entorno intestinal, determinan la cinética de estos procesos y sus efectos sobre la absorción de los componentes en general.

Por otro lado, la cantidad de CD que puede utilizarse en diferentes formulaciones, se ve limitada por razones técnicas, debido a que en ciertos casos, se necesitan altas concentraciones de IFA o de CD para obtener una relación molar adecuada entre ellos, por lo que se obtendría un comprimido de peso inaceptable, por ejemplo mayor a 500 mg. Por ello, en nuestro grupo de investigación se adicionaron agentes alcalinizantes, como por ejemplo las etanolaminas, para evaluar la incidencia de un tercer componente sobre la formación de complejos, observándose el aumento significativo de la solubilidad de ciertos IFAs ácidos.²⁹⁻³¹

1.7 FÁRMACO Modelo estudiado [Sulfadiazina (SDZ)]

La selección de Sulfadiazina (SDZ), como IFA modelo, para el presente trabajo de tesis, se debió a que presenta una baja solubilidad acuosa y diferentes datos de permeabilidad. Por ejemplo, Kasim y colaboradores,⁸ presentaron un SCB provisional, basado en los valores Log $P_{o/a}$ o Coeficiente de partición n-octanol/agua calculado (CLog $P_{o/a}$), donde establecen que SDZ es de Clase IV y con valores de 0,21 y 0,1, para Log $P_{o/a}$ y CLog $P_{a/o}$, respectivamente. Por otro lado, Tam y colaboradores,³² establecieron que SDZ es un IFA anfotérico, cuyo valor de permeabilidad, obtenido en su investigación, estuvo por debajo del valor esperado. A pesar de estos resultados, aún se considera que posee datos inconclusos a nivel de la permeabilidad en el SCB.³³ Además, su uso está limitado, debido a que se requieren altas dosis de SDZ para ejercer su acción terapéutica.³⁴ Por estos motivos, resultó sumamente interesante desarrollar estrategias capaces de revertir los inconvenientes citados, a través de la formación de complejos de inclusión con CDs y de esta manera, mejorar la eficacia terapéutica de este IFA. A continuación se listan algunas de sus características:^{35A,36}

 Nombre químico: (N-2 pirimidinilsulfalilamida)

🌀 Estructura: Posee dos valores de pKa; 2,21 y 6,35 (Figura 1.6)

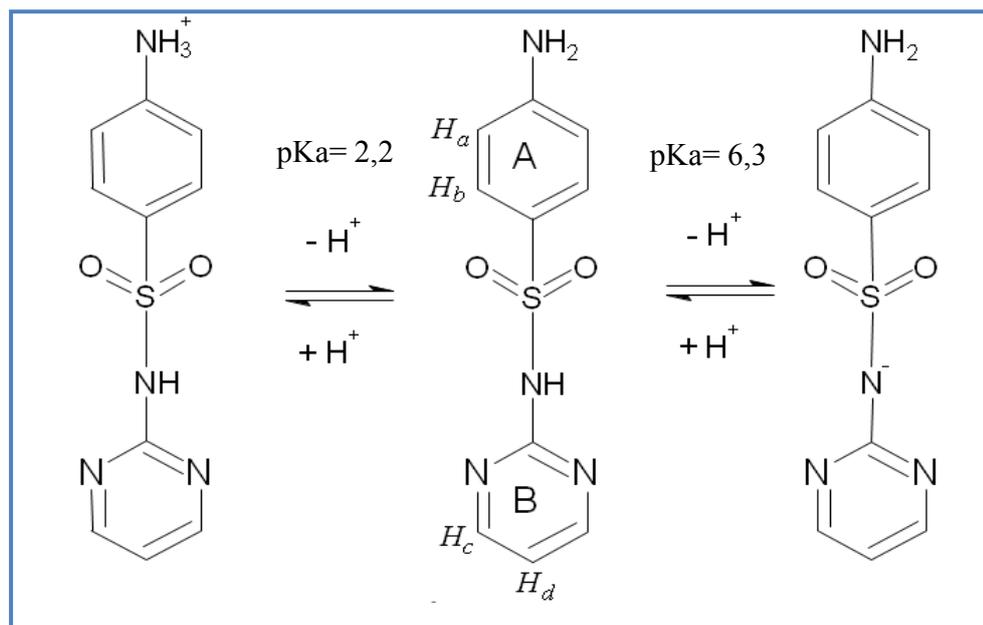


Figura 1.6. Estructura química de SDZ.

🌀 Peso molecular (PM): 250,27

🌀 Solubilidad: La solubilidad acuosa es de 0,074 mg/mL a 25 °C. Posee alta solubilidad en metanol.

🌀 Estabilidad: es estable, en el estado sólido, a la exposición al aire, humedad y temperaturas por arriba de los 100 °C por dos semanas.

🌀 Toxicidad: la toxicidad sistémica es baja y relativamente pocos efectos secundarios son asociados con su uso.

🌀 Acción Terapéutica: tratamiento de infecciones bacterianas (bacteriostáticos).

1.8 Complejos multicomponentes. Aminoácidos (AAs)

Este proyecto de tesis es de gran interés para ampliar los conocimientos de nuestro grupo de investigación, con respecto a la tecnología de utilización de sistemas multicomponentes, como una estrategia para mejorar el poder solubilizante de las CDs y para investigar el efecto combinado de la β CD con una serie de aminoácidos, entre ellos, L-Leucina (LEU) y L-Arginina (ARG); Acido L-Aspártico (ASP), Acido L(+)-Glutámico (GLU) y Glicina (GLI), seleccionados para determinar su eficacia como posibles componentes ternarios. El uso de una variedad de AAs (neutros, ácidos y básicos) para la

formación de complejos ternarios con un IFA anfotérico, como en este caso en particular, fue de especial interés, para evaluar la potencial capacidad de interactuar simultáneamente tanto con el IFA, a través de interacciones electrostática, como con la CD, a través de enlaces de hidrógeno.³⁷

A continuación se listan los AAs utilizados en este trabajo, con sus respectivas características estructurales:³⁵

Glicina: Acido aminoetanoico, ácido 2-aminoacético.^{35B}

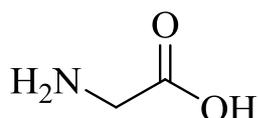


Figura 1.7. Estructura química de GLI.

Aminoácido no esencial para el desarrollo humano, PM 75,07.

pKa₁= 2,34, pKa₂= 9,60

Leucina: Acido 2-amino-4-metilpentanoico.^{35C}

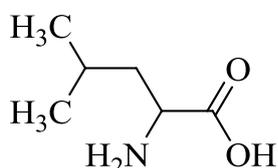


Figura 1.8. Estructura química de LEU.

Aminoácido esencial, PM 131,17

pKa₁= 2,33, pKa₂= 9,74

Acido aspártico: Acido (2S)-2-aminobutanodioico.^{35D}

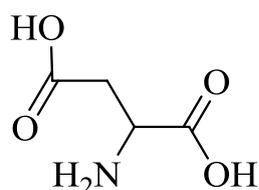


Figura 1.9. Estructura química de ASP.

Aminoácido no esencial para el desarrollo humano, PM 133,10.

$pK_{a1}= 1,88$, $pK_{a2}= 3,65$, $pK_{a3}=9,60$.

Acido glutámico: Acido (2S)-2-aminopentanodioico.^{35E}

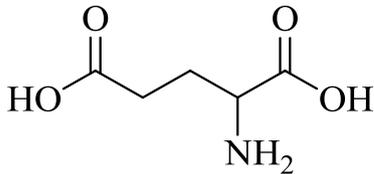


Figura 1.10. Estructura química de GLU.

Aminoácido no esencial para el desarrollo humano, PM 147,13

$pK_{a1}= 2,19$, $pK_{a2}= 4,25$, $pK_{a3}=9,67$

Arginina: Acido (S)-2-amino-5-guanidinopentanoico.^{35F}

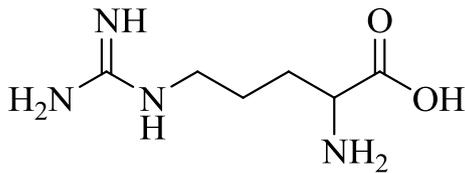


Figura 1.11. Estructura química de ARG.

Aminoácido esencial para el desarrollo humano, PM 174,20

$pK_{a1}= 2,18$, $pK_{a2}= 9,09$, $pK_{a3}=13,2$

1.9 Referencias bibliográficas

- 1) Farmacopea Argentina 8ª Edición; 2010; pp.3.
- 2) Molinoff PB, Ruddon RW. Goodman and Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. Capítulo 1, Farmacocinética. 9ª ed. New York: McGraw-Hill; 1996; pp. 3-29.
- 3) Blanco A. Química biológica. Capítulo 10, Membranas. 7ª ed. Buenos Aires: El Ateneo; 2000; pp. 167-190.
- 4) Singer SJ, Nicolson GL. Fluid mosaic model of structure of cell membranes. Science 1972; 175: 720-31.

- 5) Domenech J, Martínez Lanao J, Plá Delfina JM, ed. Biofarmacia y Farmacocinética. Vol. II. Biofarmacia. Capítulo 4, Absorción, estudio general. Madrid: Editorial Síntesis; 1998; pp. 77-94.
- 6) De Robertis EMF, Hib J. Fundamentos de biología celular y molecular de De Robertis. Capítulo 3, Las membranas celulares. 3ª ed. Buenos Aires: El Ateneo; 2001; pp. 48-72.
- 7) Amidon GL, Lennernås H, Shah VP, Crison JR. Theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res* 1995; 12: 413–20.
- 8) Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Beremjo M, Lennernäs H, Hussain AS, Junginger HE, Stavchansky SA, Midha KK, Shah VP, Amidon GL. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. *Mol Pharmaceut* 2004; 1: 85-96.
- 9) The Biopharmaceutics Classification Systems (BCS) Guidance. US Food and Drug Administration (FDA). Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2001.
- 10) World Health Organization (WHO). Proposal To Waive *In Vivo* Bioequivalence Requirements For The WHO Model List Of Essential Medicines Immediate Release, Solid Oral Dosage Forms. 17th list; 2011.
- 11) European Medicines Agency (EMA). Committee For Medicinal Products For Human USE (CHMP). Guideline On The Investigation Of Bioequivalence. London; 2010.
- 12) Kansy M, Senner FK, Gubernator K. Physicochemical High throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem* 1998; 41: 1007-10.
- 13) Wohnsland F, Faller B. High-Throughput permeability pH profile and High-throughput alkane/water log P with artificial membranes. *J Med Chem* 2001; 44: 923-30.
- 14) Velicky M, Bradley D, Tam KY, Dryfe RAW. *In situ* artificial membrane permeation assay under hydrodynamic control: permeability-pH profiles of warfarin and Verparmil. *Eur J Pharm Sci* 2011; 44: 299–309.
- 15) Connors KA. Formación de complejos. En Gennaro AR, editor. Remington Farmacia, 20ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana SA; 2003; pp. 213-30.

- 16) Frömmling KH, Szejtli S. Cyclodextrins in Pharmacy. En: Davies JED, editor. Topics in Inclusion Science. Capítulo 4, Cyclodextrin Inclusion Complexes. Volumen 5. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1994; pp.45-82.
- 17) Muñoz-Botella S, Del Castillo B, Martín, MA. Cyclodextrin: Properties and Applications of Inclusion Complex Formation. *Ars Pharm* 1995; 36: 187-98.
- 18) Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins. *Int J Pharm*. En prensa 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.055>.
- 19) Szejtli J. Medicinal Applications of Cyclodextrin. *Med Res Rev* 1994; 14: 353-86.
- 20) Szejtli, J. Cyclodextrin in Drug Formulations. Part I. *Phar Technol* 1991; 3: 15–23.
- 21) Chekirou NL, Benomrane I, Lebsir F, Krallafa AM. Theoretical and experimental study of the tetracain/ β -cyclodextrin inclusion complex. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 2012; 74: 211–21.
- 22) Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59: 645-66.
- 23) Martin Del Valle EM. Cyclodextrin and their uses: a review. *Process Biochem* 2004; 39: 1033-46.
- 24) Carrier RL, Miller LA, Ahmed I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *J Control Release* 2007; 123: 78–99.
- 25) Garnero C, Aiassa V, Longhi M. Sulfamethoxazole:hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex: preparation and characterization. *J Pharmaceut Biomed* 2012; 63: 74–9
- 26) Zoppi A, Garnero C, Garro Linck Y, Chattah AK, Monti CA, Longhi MR. Enalapril: β CD complex: Stability enhancement in solid state. *Carbohydr Polym* 2011; 86: 716-21.
- 27) Figueiras A, Hombach J, Veiga F, Bernkop-Schnürhc A. In vitro evaluation of natural and methylated cyclodextrins as buccal permeation enhancing system for omeprazole delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 71: 339-45.
- 28) Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. *J Pharm Pharmacol* 2011; 63: 1119-35.

- 29) Granero G, Garnero C, Longhi M. The effect of pH and triethanolamine on sulfisoxazole complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Eur J Pharm Sci* 2003; 20: 285-93.
- 30) Granero GE, Maitre MM, Garnero C, Longhi MR. Synthesis, characterization and in vitro release studies of a new acetazolamide: HP- β -CD-TEA inclusion complex. *Eur J Med Chem* 2008; 43: 464-70.
- 31) Garnero C, Longhi MR. Development of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of ascorbic acid using hydroxypropyl- β -cyclodextrin and triethanolamine as photostabilizing agents. *Anal Chim Acta* 2010; 659: 159–66.
- 32) Tam KY, Avdeef A, Tsinman O, Sun N. The Permeation of Amphoteric Drugs through Artificial Membranes - An in Combo Absorption Model Based on Paracellular and Transmembrane Permeability. *J Med Chem* 2010; 53: 392–401.
- 33) Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58:265–78.
- 34) Mascaretti, OA. *Bacteria versus Antibacterial Agents: An Integrated Approach*. Washington: ASM Press; 2003.
- 35) The Merck Index, thirteenth edition; 2001; 35A pp. 1586, 35B pp. 800, 35C pp. 974, 35D pp. 143, 35E pp. 796, 35F pp. 133.
- 36) Stober H, DeWitte W. Sulfadiazine. En: Florey K, editor. *Analytical profiles of drug substances*, New York: Academic Press, 1982, pp. 523-51.
- 37) Mura P, Maestrelli F, Cirri M. Ternary systems of naproxen with hydroxypropyl-cyclodextrin and aminoacids. *Int J Pharm* 2003; 260: 293-302.

En este capítulo se demuestra como las características desfavorables de solubilidad de SDZ, mejoraron a través de la formación de complejos de inclusión multicomponentes con ciclodextrinas y/o aminoácidos, en solución y en estado sólido, aplicando diferentes metodologías.

CAPÍTULO

2

PREPARACION E IDENTIFICACIÓN DE COMPLEJOS BINARIOS Y TERNARIOS

Alicia Delrivo

PARTE

1

ESTUDIOS DE COMPLEJOS BINARIOS Y TERNARIOS EN SOLUCIÓN ACUOSA



Parte 1

Estudios de los complejos binarios y ternarios en solución acuosa

2.1 Introducción

Uno de los principales inconvenientes que presenta la SDZ es su baja solubilidad en agua (0,074mg/mL),¹ lo cual podría incidir de manera negativa sobre su biodisponibilidad. Debido a ello, resultó sumamente atractivo poder desarrollar metodologías capaces de revertir este inconveniente, incrementando la hidrofiliidad y de esta manera, la eficacia terapéutica de este IFA.

Como se comentó en el capítulo 1, existen numerosas publicaciones acerca de la utilización de CDs en la administración de fármacos por vía oral, debido a la capacidad que tienen estos compuestos de influir, de manera favorable, sobre su solubilidad acuosa.²⁻⁵ Sin embargo, por diversas razones, tales como su alto peso molecular, su solubilidad en agua y su posible toxicidad parenteral, la cantidad de CD que puede utilizarse en muchas formulaciones farmacéuticas, es limitada.^{6,7} Se observó que en presencia de algunos contraiones, tales como los aminoácidos (AAs), pueden obtenerse resultados sinérgicos inesperados para la solubilidad de diversos IFAs.⁸⁻¹⁰

Por lo anteriormente expuesto, en esta primera parte, se presenta la formación de complejos de inclusión multicomponentes con CDs y/o aminoácidos en solución acuosa, y se describe la utilización de diferentes técnicas, tales como diagrama de solubilidad de fase (DSF), resonancia magnética nuclear de protones (¹H RMN), espectroscopia de efecto nuclear de Overhauser en los ejes rotatorios (ROESY), dicroísmo circular (DC), para verificar la formación de los complejos y por último, se evaluó la incorporación de SDZ a un sistema de microemulsiones.

Con la realización de los diagramas de solubilidad de fase, se estudió la interacción molecular entre los componentes, por medio de la medición de solubilidad. Se especifican detalles acerca del uso de esta técnica, en el Anexo 1.

La espectroscopia *RMN* de 1H y *ROESY* se usó como herramienta útil en el estudio de inclusión de la molécula huésped en la cavidad de las CDs.¹¹ Esta técnica permitió obtener una clara distinción entre la inclusión y otros posibles procesos de interacción externa mediante la observación simultánea del huésped y la CD, ya que es capaz de diferenciar la parte de la molécula involucrada en la interacción con la cavidad de la macromolécula. Los datos de 1H *RMN* proveen información sobre la estructura y los enlaces de hidrógeno con las CDs, mientras que, un análisis más detallado sobre la conformación del sistema puede obtenerse de los estudios bidimensionales (*2D*) como el *ROESY*.¹²

A su vez, el dicroísmo circular es una técnica espectroscópica que detecta la diferencia de absorción de la luz circularmente polarizada pasando a través de una sustancia quiral. Está definida como la diferencia de los coeficientes de extinción molar de la luz circularmente polarizada hacia la izquierda y hacia la derecha, $\Delta\epsilon = \epsilon_l - \epsilon_d$. En consecuencia, el resultado es un espectro de absorción con signos positivo o negativo.¹³ El uso de esta técnica espectroscópica tuvo la finalidad de conocer la formación del complejo de β CD con SDZ, en solución acuosa, ya que, cuando los compuestos ópticamente inactivos forman complejos con CD, estos pueden presentar actividad óptica. Los espectros de dicroísmo circular de estos complejos también pueden brindar información sobre sus estructuras.

Por otra parte, las microemulsiones (ME) son sistemas coloidales que contienen una fase acuosa, una oleosa, concentraciones suficientes de un tensioactivo (TA) apropiado y cuando es necesario, combinado con un cotensioactivo (CoTA). Son ópticamente transparentes o semitransparentes y termodinámicamente estables.¹⁴ Las partículas son de tamaño menor a $1,0 \mu\text{m}$ y por lo tanto, factibles de ser estabilizadas por filtración. La característica más importante que presentan, es la capacidad de incorporar IFAs con diferentes propiedades fisicoquímicas, pudiendo aumentar la solubilidad y la biodisponibilidad de IFAs hidrofóbicos.¹⁵ Las MEs se han convertido en vehículos de nuevos IFAs, que permiten la entrega sostenida o liberación controlada de los mismos, utilizando diferentes vías de administración (transdérmica, tópica, oral, nasal, intravenosa, ocular, parenteral, entre otras).¹⁶

2.2 **Materiales y Métodos**

2.2.1 *Materiales*

SDZ (Parafarm, Argentina); β CD, HP β CD y M β CD fueron una donación de Roquette (Ferromet S.A, agente en Argentina). L-Leucina (LEU) y L-Arginina (ARG) (SIGMA); Acido L-Aspártico (ASP) y Acido L(+)- Glutámico (GLU) (Anedra) y Glicina (GLI) (Todo Droga).

Los experimentos fueron realizados con reactivos y solventes grado analítico. El agua tridestilada que se usó en estos estudios, se obtuvo mediante un sistema de purificación Milli-Q (Millipore® Bedford, USA). Se usaron soluciones reguladoras H₂KPO₄/HK₂PO₄ de valores de pH 2,0 y 8,0.

2.2.2 *Equipamiento*

- ☞ Balanza analítica: Voyager Ohaus modelo Explorer E01140.
- ☞ pHmetro: HI 255 Combined Meter HANNA®, USA.
- ☞ Espectrofotómetro UV-VIS: SHIMADZU UV-160A.
- ☞ Baño ultrasónico: Ultrasonic LC-30H Elma (Alemania).
- ☞ Espectrómetro RMN: Bruker Advance II de alta resolución.
- ☞ Espectropolarímetro: JASCO Modelo J-810.

2.2.3 *Validación del método analítico: Espectroscopía UV-VIS*

Se prepararon tres soluciones madres de SDZ (10 mg/100 mL) utilizando como co-solvente metanol. Se realizaron siete diluciones a partir de cada una de las soluciones madres, luego se seleccionaron tres concentraciones (alta, media, baja) y se hicieron tres repeticiones de cada una a los fines de determinar el rango lineal, la exactitud y la precisión. Se midió la absorbancia a 264 nm. Se realizaron las correspondientes curvas de calibrado, de las cuales se obtuvieron los parámetros necesarios para realizar la validación, así como de las pendientes se obtuvo el valor de absortividad molar.

2.2.4 *Estudios de estabilidad de SDZ*

Se prepararon dos soluciones madres de SDZ (0,056 mM), las cuales fueron sometidas a condiciones extremas de temperatura (70°C), frente a lámpara UV de 254 nm de emisión, durante 8 h. A intervalos regulares de tiempo se obtuvieron muestras, las cuales se evaluaron por espectrofotometría UV-VIS a una longitud de onda de 264 nm.

2.2.5 Diagramas de solubilidad de fases

El efecto de las CDs y de los AAs sobre la solubilidad acuosa de SDZ, se estudió según el método descrito por Higuchi y Connors¹⁷ (Anexo 1). Se realizaron diferentes ensayos para los sistemas binarios en los cuales se mantuvo, en todos los casos, un exceso de SDZ, agregando luego, concentraciones crecientes de las tres CDs (β CD, M β CD y HP β CD) y por otro lado, concentraciones crecientes de los cinco aminoácidos (LEU, GLI; ARG, ASP y GLU). Los sistemas de las CDs con los AAs no fueron estudiados por DSF, debido a que está técnica no es aplicable a situaciones en las cuales ambos componentes presentan alta solubilidad en agua.¹⁷ Por último, los estudios para los sistemas ternarios, se realizaron utilizando concentraciones crecientes de β CD y constantes de todos los AAs y luego, concentraciones crecientes de los diferentes AAs y constantes de β CD, para poder realizar un análisis de cada situación.

Los ensayos se realizaron en tubos de cierre hermético, colocando un exceso de SDZ y concentraciones crecientes de β CD (0-13,2 mM), M β CD (0-105 mM), HP β CD (0-30 mM), o aminoácidos [LEU (0-138 mM), GLI (0-55,7 mM), ARG (0-179 mM), ASP (0-37 mM) y GLU (0-37 mM)]. Los estudios se realizaron manteniendo constante el volumen de solución acuosa o de soluciones reguladoras de pH 2 y 8 (en este último caso sólo para los sistemas SDZ:CDs).

Sumado a lo anterior, cantidades en exceso de SDZ y cantidades constantes de los AAs [LEU (28 mM), ARG (28 mM), GLU (7,5 mM), ASP (7,5 mM) y GLI (28 mM)] fueron adicionadas con concentraciones variables de β CD (0-13,2 mM) en agua y en soluciones reguladoras de pH 6 (este último, para los AAs GLU y ASP).

Además, cantidades en exceso de SDZ y constantes de β CD (4 mM) fueron adicionadas, en agua, con diferentes concentraciones de los AAs citados precedentemente.

En todos los casos, se dejó alcanzar el equilibrio de solubilidad a temperatura constante (25°C), aproximadamente por 72 h, sonicando dos veces al día por 15 min. Luego, las soluciones obtenidas se filtraron a través de una membrana de Nylon-Blanca de 0,45 μ m de tamaño de poro (GAMAFIL) y se analizaron por espectrofotometría UV-VIS, para determinar la concentración total de SDZ en solución. Las muestras obtenidas se analizaron a una longitud de onda de 264 nm en el caso de soluciones acuosas y de pH 2, y a 241 nm en el caso de soluciones de pH 8. Para la cuantificación, se necesitó la construcción previa de las curvas de calibrado correspondientes.

Los diagramas se construyeron por medio de un gráfico, que posee en el eje de las ordenadas la concentración total de compuesto sustrato (SDZ, en este caso particular) encontrado en solución, en función de la concentración de ligando o agente acomplejante adicionado al sistema (CDs). Cada experimento se realizó por triplicado y se usó un promedio de los resultados obtenidos.

2.2.5.1 Estimación de las constantes de equilibrio

Las constantes de formación (o de estabilidad) de los complejos (K_s) se calcularon según la siguiente ecuación:

$$K_s = \frac{\text{pendiente}}{(1 - \text{pendiente}) \times \text{intercepto}} \quad (\text{Ec. 2.1})$$

(ver Anexo 2, desarrollo de la ecuación).

Esta ecuación se aplica para calcular la constante de estabilidad sobre la base de una relación estequiométrica 1:1, para los diagramas de solubilidad de fases, Tipo A (incremento lineal de la solubilidad en función de la concentración de CD), así como también a la porción inicial lineal de los diagramas Tipo B_s, suponiendo que solo el complejo es el responsable del aumento de la solubilidad aparente del sustrato.

2.2.6 Análisis termodinámico del complejo obtenido entre SDZ y β CD

Se realizaron diagramas de solubilidad de fase de SDZ con β CD (0-13,2 mM), a diferentes temperaturas (25, 30, 35, 40 y 45°C), para evaluar el efecto del cambio de temperatura sobre el equilibrio de formación del complejo.

2.2.7 Resonancia magnética nuclear de protones (^1H RMN) y efecto de Overhauser en los ejes rotatorios (2D ROESY)

Los espectros de RMN se adquirieron en un espectrómetro de alta resolución, equipado con resolución digital, sonda de detección inversa y unidad de temperatura variable.

Las mediciones se adquirieron en secuencias de pulso estándar BRUKER. Los experimentos 2D ROESY se realizaron utilizando el programa estándar roesy.2 avance-version, con cw spinlock para tiempo de mezcla y spinlock sensible a la fase utilizando pulsos 180-x, 180-x.

Los espectros, obtenidos a 400,16 MHz y a una temperatura de 298 K, se procesaron con el programa Bruker TOPSPIN 2.0. Los corrimientos químicos (δ) fueron expresados en ppm y se utilizó como referencia interna la señal que aparece a 4,8, atribuida al agua residual. Diferencias en los corrimientos químicos ($\Delta\delta$) de los protones de CDs, AA y/o SDZ, originados por la complejación, se calcularon utilizando la siguiente ecuación (Ecuación 2.2):

$$\Delta\delta = \delta_{\text{complejado}} - \delta_{\text{libre}} \quad \text{Ec.2.2}$$

2.2.7.1 Determinación de K_s para el sistema SDZ: β CD aplicando la ecuación de Scott

Esta ecuación se aplica a datos de RMN obtenidos para complejos que poseen una estequiometría 1:1, empleando mezclas con exceso de agente acomplejante. La concentración de IFA se mantuvo constante (1 mM), mientras que la de β CD fue variando de 5 a 10 mM en D₂O. Los valores de las constantes se calcularon a partir del intercepto del gráfico lineal obtenido al representar $[\beta\text{-CD}]_t/\Delta\delta_{\text{obs}}$ versus $[\beta\text{-CD}]_t$, según la siguiente ecuación:

$$\frac{[\beta\text{CD}]_t}{\Delta\delta_{\text{obs}}} = \frac{[\beta\text{CD}]_t}{\Delta\delta_c} + \frac{1}{K_s\Delta\delta_c} \quad \text{Ec.2.3}$$

donde $[\beta\text{CD}]_t$ es la concentración total de β CD; $\Delta\delta_{\text{obs}}$ es el δ observado, que tiene un valor promedio entre el δ del IFA libre y el IFA en presencia de β CD; $\Delta\delta_c$ es la diferencia entre el δ de la muestra pura del complejo y el de sus componentes libres.

Graficando $[\beta\text{CD}]_t/\Delta\delta_{\text{obs}}$ en función de $[\beta\text{CD}]_t$, la K_s se puede calcular del intercepto obtenido por análisis de regresión lineal por cuadrados mínimos.

2.2.8 Aplicación de la técnica espectroscópica de dicroísmo circular para la caracterización de complejos con CD

Se prepararon soluciones acuosas de SDZ (0,05 mM) y SDZ: β CD [modificando la relación de β CD (0-13,2 mM) y manteniendo constante la de SDZ] y se midió la aparición de dicroísmo circular en un espectropolarímetro. Se compararon los espectros del IFA y de la β CD con el obtenido para el sistema SDZ: β CD.

2.2.9 Incorporación de SDZ a una microemulsión

Se elaboró una ME con cantidades adecuadas de fosfatidilcolina de soja (FCS) como tensioactivo (TA), Emulgin 40 (oleo de ricino polioxi- 40 hidrogenado) como cotensioactivo (CoTA), Captex 200 (1,2,3,6 –tetrahydro-*N*-(triclorometilitio) ftalamida) como fase oleosa (FO) y por último, una solución reguladora de pH 7,4 como fase acuosa (Tabla 2.1). Luego se incorporó un exceso de SDZ. Mediante espectroscopia UV-VIS se evaluó la concentración de SDZ incorporada en la ME.

Tabla 2.1. Porcentajes utilizados de los componentes para el preparado de la microemulsión.

Composición	Porcentaje utilizado (%)
Captex 200	11,0
FCS	6,3
Emulgin	14,7
Buffer fosfato pH 7,4	68,0

De acuerdo a la Tabla 2.1, la suma de FO, TA y CoTA representa el 32% (ME); a partir de ésta, se realizaron las siguientes diluciones: 6, 8, 12, 16, 20, 22, 24 y 28 % (de FO + TA + CoTA), llevando a volumen final con solución reguladora de pH 7,4.

Luego se realizó una comparación agregando β CD a la solución acuosa de la microemulsión, para estimar si ambos sistemas poseían un comportamiento sinérgico.

Estos estudios se realizaron en la Facultad de Ciencias Farmacéuticas UNESP, Departamento de Fármacos y Medicamentos, Universidad Estatal Paulista, San Pablo, Brasil, bajo la dirección del Profesor Doctor Anselmo Gomes de Oliveira. Pasantía en el marco del Programa CAPES-SPU 025/05.

2.3 **Resultados y Discusión**

2.3.1 *Sistemas binarios*

2.3.1.1 *Determinación de los DSFs*

2.3.1.1.1 *SDZ:CDs*

Como ya se mencionó, las determinaciones analíticas de los estudios de solubilidad se realizaron por espectrofotometría UV-VIS, para lo cual se desarrolló y validó el procedimiento analítico (Figura 2.1, Tablas 2.2 y 2.3). Las buenas prácticas de control

requieren que los métodos analíticos empleados para evaluar las especificaciones sean apropiados.¹⁸

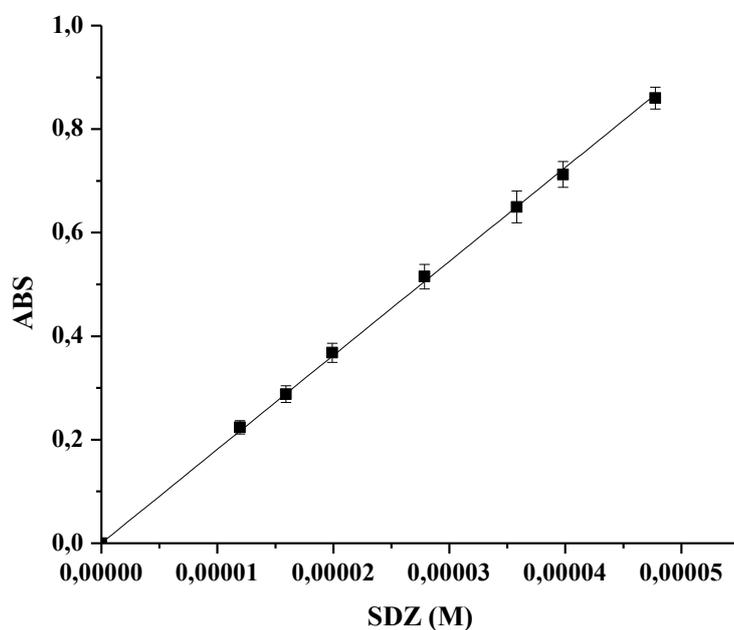


Figura 2.1. Curva de Calibración del método espectrofotométrico.

Tabla 2.2. Resultados de Calibración.

Pendiente	17750 ± 293
Intercepto	$0,013 \pm 0,009$
r^2	0,993
N	27
LD ($\mu\text{g/mL}$)	0,39
LC ($\mu\text{g/mL}$)	1,27

N: número de mediciones, LD: límite de detección, LC: límite de cuantificación.

Tabla 2.3. Precisión y exactitud.

Concentración Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Hallada ($\mu\text{g/mL}$)	Exactitud (% Recuperación)	% Recuperación medio	RSD
3,10	3,05	$98,5 \pm 0,9$		
7,23	7,20	$99,7 \pm 0,6$	$99,2 \pm 0,8$	0,8
12,38	12,31	$99,4 \pm 0,3$		

RSD: desviación estándar relativa.

Los resultados alcanzados indican que el método obtenido fue sensible, obteniendo parámetros de calidad aceptables, respecto a linealidad, exactitud, precisión, de acuerdo a lo establecido en normas nacionales e internacionales.^{18, 19}

Por otro lado, los ensayos de estabilidad indicaron que SDZ se mantuvo estable frente a las condiciones a las que fue expuesta, en el intervalo de tiempo estudiado.

Luego, se procedió a realizar los diagramas de solubilidad de fases, para lo cual se usaron diferentes valores de pH, con la finalidad de evaluar como incidían las diferentes especies del IFA, neutra o iónica, en la formación de los complejos (SDZ, pK_{a1} 6,35, pK_{a2} 2,20). [Especie neutra en agua, especie catiónica a pHs por debajo de 2,2 y especie aniónica a pHs por encima de 6,35 (más del 50%)].

Con respecto a las tres CDs, β CD, M β CD e HP β CD, las mismas se usaron con el fin de comparar la interacción con la SDZ, debido a que se pueden utilizar diferentes concentraciones máximas de cada una, ya que poseen distintas solubilidades acuosas (β CD 18,5 g/L, M β CD 190 g/L e HP β CD mayor a 600 g/L).

A continuación se muestran los DSF (Figura 2.2), de SDZ con las diferentes CDs.

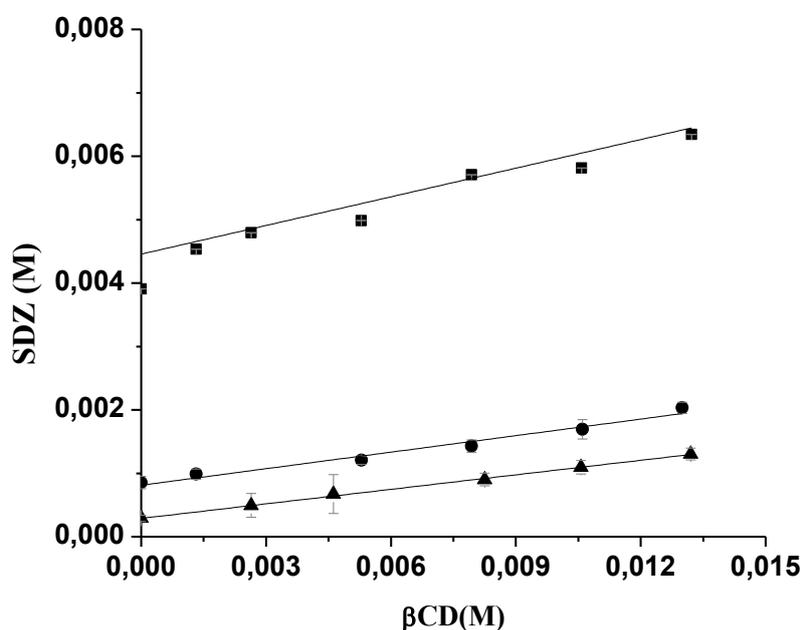


Figura 2.2.A. Diagramas de solubilidad de fases de SDZ:βCD, en agua (▲), y en soluciones reguladoras de pH 2,0 (●) y pH 8,0 (■).

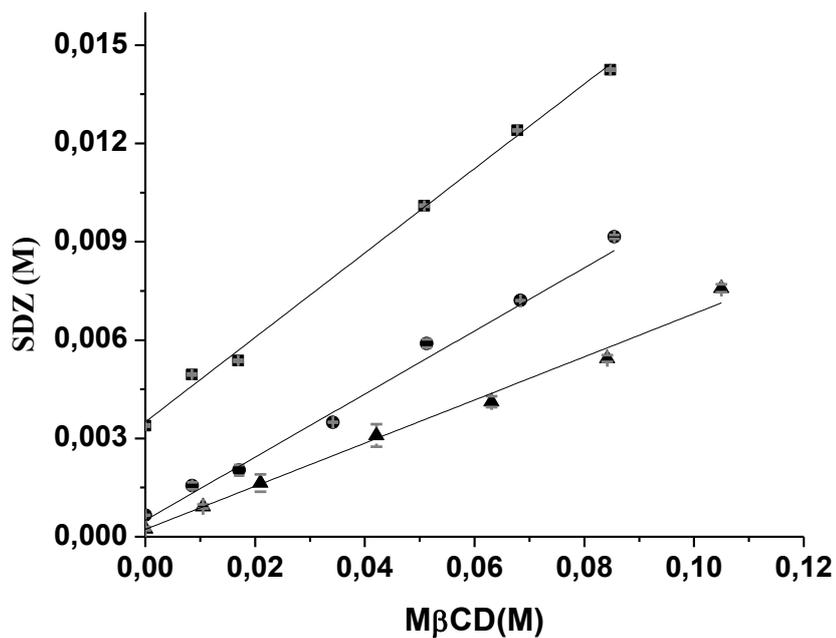


Figura 2.2.B. Diagramas de solubilidad de fases de SDZ:MβCD, en agua (▲), y en soluciones reguladoras de pH 2,0 (●) y pH 8,0 (■).

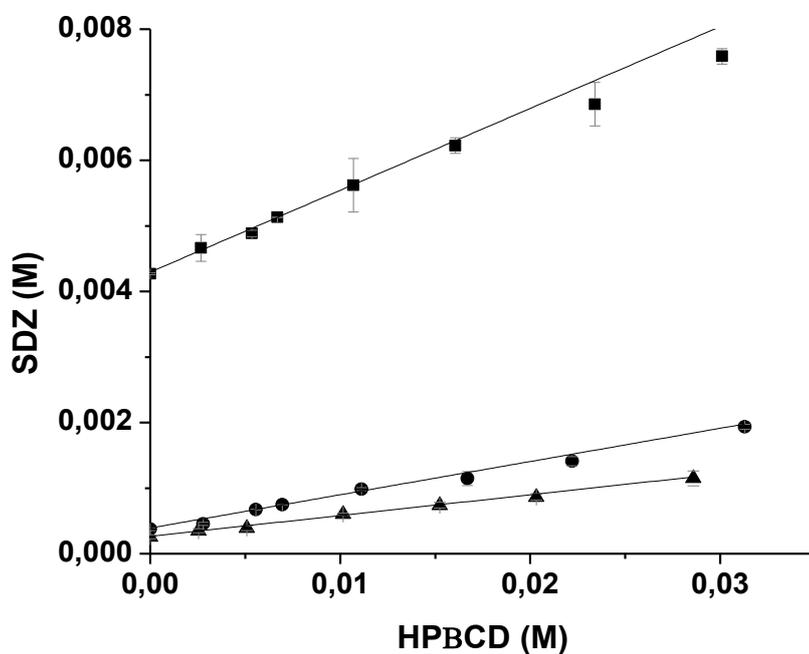


Figura 2.2.C. Diagramas de solubilidad de fases de SDZ:HPβCD, en agua (▲), y en soluciones reguladoras de pH 2,0 (●).y pH 8,0 (■).

Los diagramas de solubilidad de fases, de los diferentes complejos binarios, mostraron curvas de tipo A_L , según el método de Higuchi y Connors, lo que significó que la solubilidad del IFA se incrementó linealmente en función de la concentración de las CDs. Se formaron complejos de inclusión solubles, con una estequiometría 1:1.

A partir de estos gráficos y mediante la Ec. 2.1 se calcularon las K_s . En la Tabla 2.4, se resumen los resultados de los diagramas realizados.

Tabla 2.4. Datos obtenidos de los diagramas de solubilidad de fases entre SDZ, β CD, $M\beta$ CD o $HP\beta$ CD.

Sistema	Solvente	pH final	K_s (M^{-1})	S_0 (mg/mL)	S_{max} (mg/mL)	I
SDZ:βCD	Agua	5,96	282 ± 15	$0,073 \pm 0,009$	$0,33 \pm 0,02$	4
	Buffer pH 2	1,74	$131,7 \pm 0,3$	$0,18 \pm 0,04$	$0,50 \pm 0,02$	3
	Buffer pH 8	7,65	55 ± 2	$0,90 \pm 0,06$	$1,54 \pm 0,03$	2
SDZ:$M\beta$CD	Agua	5,63	243 ± 6	$0,073 \pm 0,009$	$1,90 \pm 0,03$	26
	Buffer pH 2	1,96	149 ± 3	$0,18 \pm 0,04$	$2,29 \pm 0,02$	13
	Buffer pH 8	7,62	44 ± 2	$0,90 \pm 0,06$	$3,566 \pm 0,008$	4
SDZ:$HP\beta$CD	Agua	5,66	123 ± 2	$0,073 \pm 0,009$	$0,288 \pm 0,03$	4
	Buffer pH 2	2,37	137 ± 3	$0,18 \pm 0,04$	$0,485 \pm 0,008$	3
	Buffer pH 8	7,80	$28,2 \pm 0,5$	$0,90 \pm 0,06$	$1,90 \pm 0,03$	2

S_0 es la solubilidad intrínseca, S_{max} solubilidad máxima e I (S_{max}/S_0) el incremento en la solubilidad.

Las K_s observadas fueron mayores cuando SDZ se encontraba como especie neutra, a excepción de lo observado para el complejo formado con la $HP\beta$ CD a pH 2, donde es ligeramente mayor, lo cual favoreció la formación del complejo, ya que las interacciones con las CDs están favorecidas con la especie no iónica del compuesto huésped. En una solución reguladora de pH 8, todos los complejos exhibieron menor valor de K_s , pero mayor solubilidad, lo cual es debido a la combinación del efecto de la formación de complejo con la existencia del IFA como especie ionizada, más soluble en agua.

El uso de $HP\beta$ CD no produjo ventajas con respecto a β CD, aun agregándose una mayor concentración; en cambio, se obtuvo una mejora en la solubilidad acuosa de SDZ cuando se adicionó $M\beta$ CD. Al compararse este último resultado con el obtenido con la β CD, el aumento se puede atribuir al uso de una concentración final mayor de $M\beta$ CD, ya que si se comparan iguales concentraciones de ambas CDs, la β CD es mejor agente solubilizante.

2.3.1.1.2 SDZ:AAs

Los diagramas de solubilidad de fases realizados con SDZ y concentraciones crecientes de los AAs: ARG, LEU, GLI, ASP y GLU, se presentan en el siguiente gráfico (Figura 2.3):

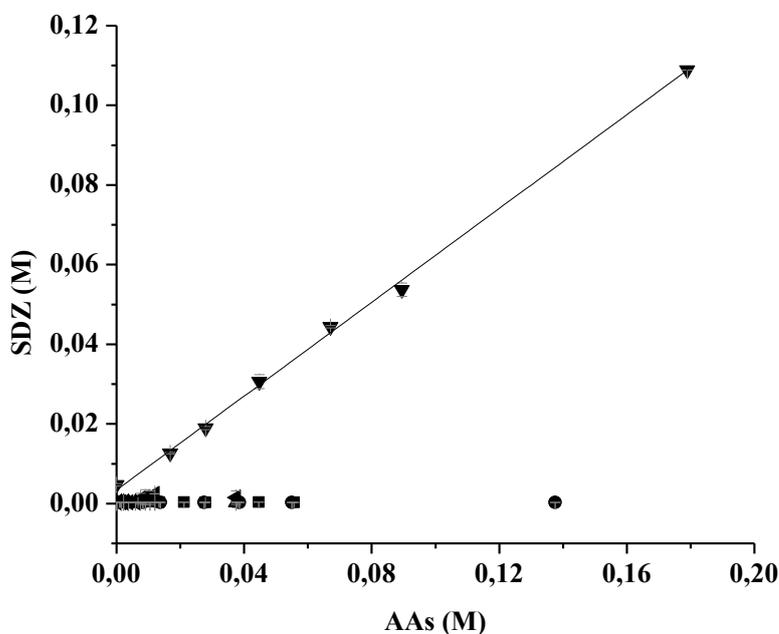


Figura 2.3. Diagramas de solubilidad de fases de SDZ:AAs, donde GLI (■), LEU(●), ASP(▲), ARG(▼), GLU(◄).

En la mayoría de los casos, el agregado de los diferentes AAs, no modificó la concentración de SDZ en solución acuosa (la cual fue semejante a la del IFA libre, aproximadamente 0,074mg/mL), a excepción de lo observado para el sistema formado con ARG. Este comportamiento sugirió que el IFA se encontró en su límite de solubilidad, en el intervalo de concentraciones de AAs estudiado, por lo cual se podría pensar que no se presentó ningún tipo de interacción entre ambos componentes (AAs, SDZ) que origine un aumento en la solubilidad acuosa final de SDZ.

Sin embargo, debido a que en la formación del complejo entre SDZ y ARG, en agua, se observó fluctuación del valor de pH por la presencia de ARG (próximos a un valor de 8), se construyó el diagrama utilizando una solución reguladora de pH 8. Se observó interacción de SDZ con ARG, logrando aumentar la solubilidad a 27,2 mg/mL. Al incrementarse linealmente la solubilidad del IFA en función de la concentración de

ARG, se determinó el valor de K_s , siguiendo la metodología de Higuchi y Connors (Ver Figura 2.3 y Tabla 2.5).

Tabla 2.5. Datos obtenidos del diagrama de solubilidad de fase entre SDZ con ARG.

	Solvente	pH final	K_s (M^{-1})	S_0 (mg/mL)	S_{max} (mg/mL)	I
SDZ:ARG	Buffer pH 8	8,77	395 ± 6	$0,90 \pm 0,06$	$27,2 \pm 0,5$	30

S_0 es la solubilidad intrínseca, S_{max} solubilidad máxima e I (S_{max}/S_0) el incremento en la solubilidad.

Se observó que el valor de K_s fue mayor comparado con el de los complejos binarios obtenido con las diferentes CDs, probablemente debido a la fuerte interacción electrostática de este AA con la SDZ.

2.3.1.2 Análisis termodinámico del complejo obtenido entre SDZ y β CD

Los resultados de los DSF, a diferentes temperaturas, se observan en la Figura 2.4 y Tabla 2.6.

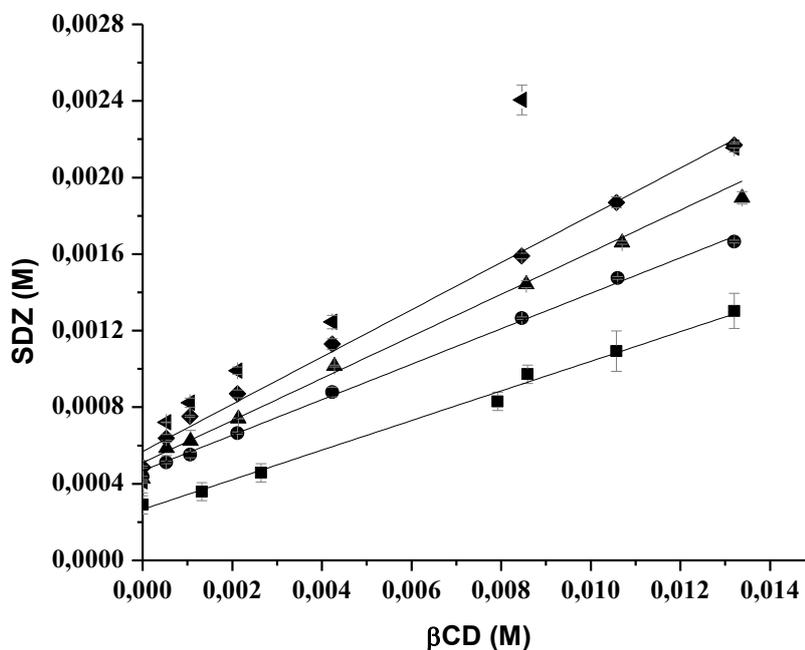


Figura 2.4. Diagramas de solubilidad de fases de SDZ: β CD, a 25°C (■), 30°C (●), 35°C (▲), 40°C (◆) y 45°C (◄).

Tabla 2.6. Datos de K_s para SDZ: β CD a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	K_s (M ⁻¹)
25	282 ± 15
30	225 ± 9
35	237 ± 11
40	241 ± 3
45	-----

En la Tabla 2.6 se observa que el efecto de la temperatura sobre la formación del complejo, no es claro, hubo una ligera disminución en el valor de K_s entre 25 y 30°C, para luego mantenerse prácticamente constante con el aumento de la temperatura. A 45°C no se observó una correlación lineal, por lo cual no pudo obtenerse un valor de K_s .

Se sabe que el aumento de la temperatura produce un incremento de la solubilidad de los compuestos orgánicos utilizados como IFAs.²⁰ Sin embargo, en presencia de CD, la temperatura afecta el equilibrio de formación del complejo [equilibrio dinámico entre las especies libres (SDZ y β CD) y el complejo de inclusión]. En general, el aumento de la temperatura produce un desplazamiento de este equilibrio dinámico hacia las especies libres, lo que implica que los valores de las constantes de formación sean menores, a mayores temperaturas. Sin embargo, en este caso en particular, inicialmente existió una disminución del valor de la constante, como era predecible, para posteriormente mantenerse invariable a temperaturas mayores, pudiéndose atribuir este comportamiento a una fuerte interacción del IFA con la β CD en el complejo. La posibilidad de disponer de valores de K_s a diferentes temperaturas, permite calcular el cambio de entalpía (ΔH) y entropía (ΔS) de un sistema. Sin embargo aquí no se produjo un claro efecto de la temperatura sobre la K_s . Por lo tanto, el análisis de las contribuciones principales a la formación del complejo de inclusión no se pudo realizar.

2.3.1.3 Espectros de ¹H RMN y de 2D ROESY de SDZ:CDs.

2.3.1.3.1 ¹H RMN

Un incremento en la solubilidad de SDZ en presencia de CDs y/o AAs, observado en los diagramas de solubilidad de fases, no puede ser considerado como prueba definitiva para la formación de un complejo, por ello para confirmar este evento, se utilizó la técnica de RMN.

Se analizó la variación de los corrimientos químicos ($\Delta\delta$) de los protones de la SDZ y de las CDs (estructuras químicas con asignación de protones de SDZ y CDs en Figuras 2.5 y 2.6, respectivamente; ver Anexo 3), en los diferentes sistemas, respecto a los compuestos puros, permitiendo así determinar el modo de interacción entre huésped y receptor (ver Tablas 2.8, 2.9 y 2.10 y Figuras 2.7, 2.8 y 2.9).

Cabe destacar que, debido a la conformación de balde que poseen las CDs, estas presentan los protones H3 (sector ancho) y H5 (sector angosto) dentro de la cavidad, mientras que los protones H4 y H2 se encuentran fuera, en contacto con el medio acuoso; los protones H6, del grupo alcohol primario, se ubican en el extremo angosto y los protones H1, en el plano de unión glicosídico.

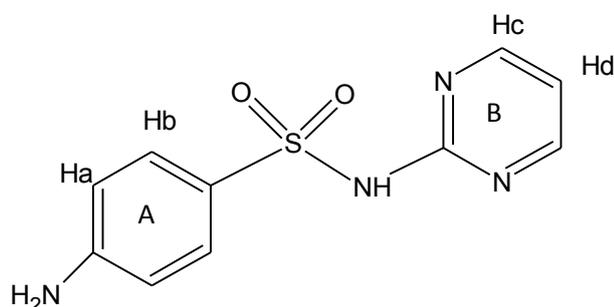


Figura 2.5. Estructura química y asignación de los protones de SDZ.

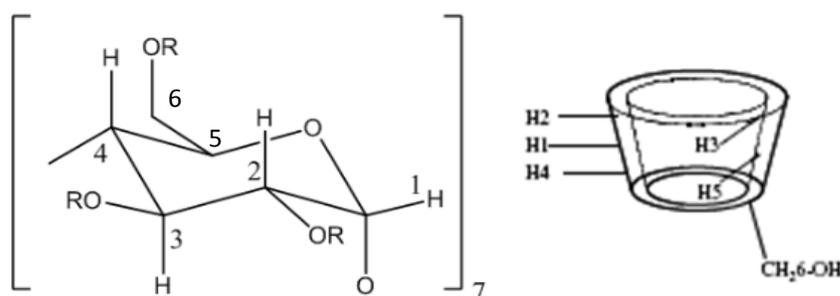


Figura 2.6. Estructura química y asignación de los protones, de β CD R= H, M β CD R= CH₃, HP β CD R= CH₂ CH (OH) CH₃.

A continuación, se presentan los espectros de ¹H-RMN de SDZ libre y del sistema SDZ: β CD (1:1) en D₂O (Figura 2.7, Tabla 2.8).

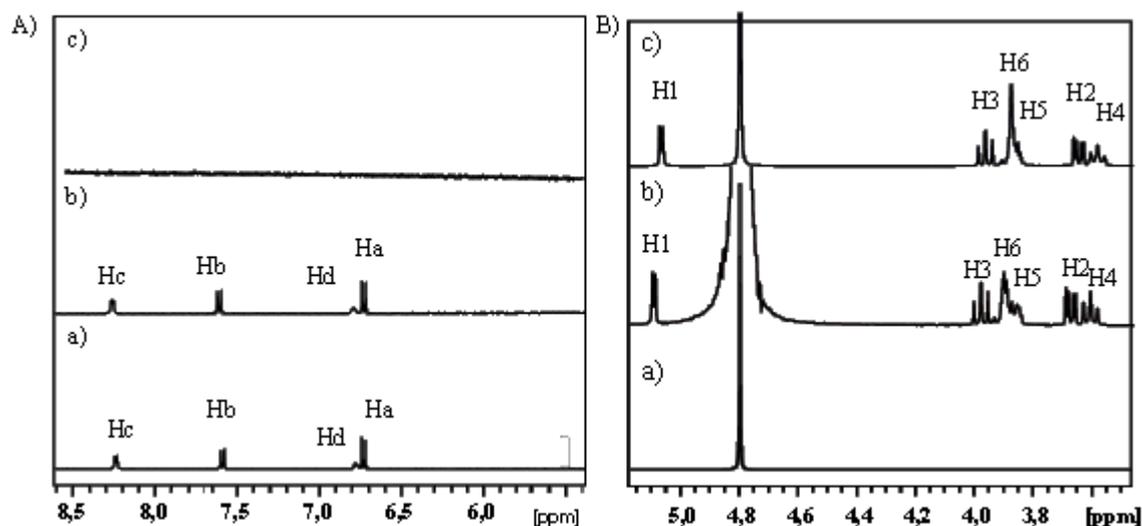


Figura 2.7. Espectro ^1H RMN de A) Corrimientos químicos de los protones de SDZ, en estado libre y acomplejado y B) Corrimientos químicos de los protones de βCD , en estado libre y acomplejado; donde SDZ (a), complejo SDZ: βCD (b) y βCD (c).

Tabla 2.8. A) Corrimientos químicos de los protones de SDZ, en estado libre y acomplejado, B) Corrimientos químicos de los protones de βCD , en estado libre y acomplejado.

A)

SDZ			
Protón	δ_0	δ_c	$\Delta\delta$
Ha	6,7284	6,8287	0,1003
Hb	7,5882	7,7100	0,1218
Hc	8,2308	8,3643	0,1335
Hd	6,7801	6,8900	0,1099

B)

βCD			
Protón	δ_0	δ_c	$\Delta\delta$
H1	5,0681	5,0966	0,0285
H2	3,6472	3,6770	0,0298
H3	3,9650	3,9831	0,0181
H4	3,5828	3,6103	0,0275
H5	3,8539	3,8612	0,0073
H6	3,8770	3,9003	0,0233

El espectro de ^1H RMN del sistema binario SDZ: βCD mostró desplazamientos a campos bajos en las señales de la CD inducidos por el IFA (indicando que, debido a la interacción con la SDZ, los protones se encuentran desprotegidos). Este comportamiento fue atribuido al efecto de anisotropía paramagnética producido por la SDZ en la cavidad de la βCD , como resultado de interacciones débiles (fuerza de van der Waals) con los

átomos de hidrógeno internos, a causa de la inserción de una fracción electronegativa en la cavidad. Todo indicaría que la SDZ ingresa parcialmente a la cavidad de la CD por el sector más ancho (por estar más afectado el H3, con respecto al H5). Aunque, debido al comportamiento de los protones externos (H1, H2 y H4), no se puede omitir la existencia de interacciones con la superficie exterior. Por otra parte, los protones de la SDZ mostraron importantes desplazamientos, lo que indica que la molécula de IFA experimentó una perturbación debido a la interacción con la β CD; estos desplazamientos fueron a campos bajos, evidenciando un efecto desprotector, indicativo de interacciones de tipo van der Waals, o una variación de la polaridad local.

Luego, se obtuvieron los espectros de ^1H RMN de SDZ libre y del sistema SDZ:M β CD en D_2O (Figura 2.8, Tabla 2.9).

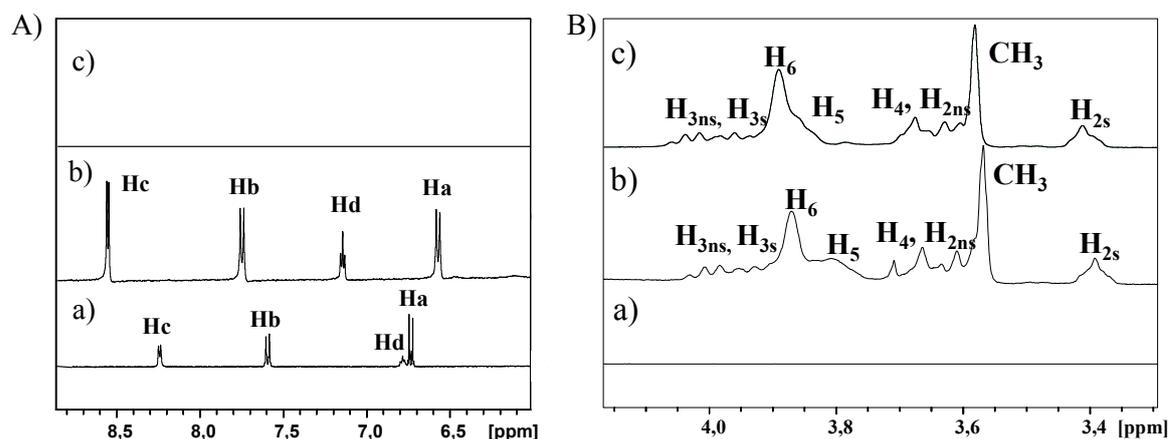


Figura 2.8. Espectro ^1H NMR de A) Corrimientos químicos de los protones de SDZ, en estado libre y acomplejado, B) Corrimientos químicos de los protones de M β CD, en estado libre y acomplejado, donde “s” significa sustituido y “ns” no-sustituido; donde SDZ (a), complejo SDZ:M β CD (b) y M β CD (c).

Se observó que los protones de la cavidad interna de la M β CD presentaron desplazamientos en presencia de SDZ, lo que podría ser indicativo de la inclusión del IFA. Para el sistema SDZ:M β CD se observaron desplazamientos a campos bajos y altos, para el H5 y el H3 de la CD, respectivamente. El desplazamiento del H3 podría ser atribuido a un efecto de anisotropía diamagnético, inducido por la presencia de un grupo

aromático, dentro de la cavidad. Además, se observaron corrimientos de los protones externos, lo cual puede ser atribuido a un arreglo conformacional de la molécula huésped.

Tabla 2.9. A) Corrimientos químicos de los protones de SDZ, en estado libre y acomplexado, B) Corrimientos químicos de los protones M β CD, en estado libre y acomplexado.

A)

SDZ			
Protón	δ_0	δ_c	$\Delta\delta$
<i>Ha</i>	6,7284	6,5713	-0,1571
<i>Hb</i>	7,5882	7,7470	0,1588
<i>Hc</i>	8,2308	8,5522	0,3214
<i>Hd</i>	6,7801	7,1435	0,3634

B)

M β CD							
Protón	δ_0	δ_c	$\Delta\delta$	Protón	δ_0	δ_c	$\Delta\delta$
H1s	5,2815	5,2596	-0,0219	H6	3,8898	3,8706	-0,0192
H1ns	5,0880	5,0749	-0,0131	H5	3,7849	3,8088	0,0239
H3ns	4,0369	4,0085	-0,0284	H2s	3,4111	3,3925	-0,0186
H3s	3,9591	3,9287	-0,0304	CH ₃	3,5806	3,5681	-0,0125
H4- H2ns	superpuestos						

Con respecto a la SDZ, se observaron corrimientos a campos bajos para los Hc, Hb y Hd, probablemente debido a interacciones de tipo van der Waals entre la SDZ y la M β CD, sugiriendo la inserción de la molécula en el interior de la cavidad de la CD; mientras que el Ha posee un desplazamiento a campos altos, lo que podría indicar proximidad a átomos ricos en electrones π , pudiendo sugerirse interacciones con los átomos de oxígeno de la CD.

Se analizaron también los espectros de ¹H-RMN de SDZ libre y del sistema SDZ:HP β CD en D₂O (Figura 2.9, Tabla 2.10).

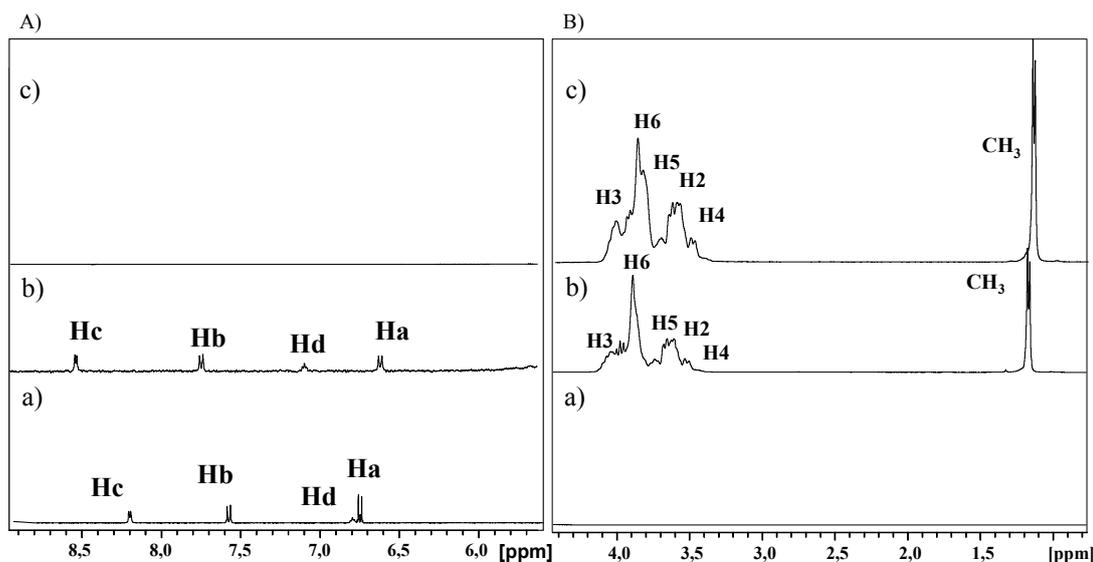


Figura 2.9. Espectro ^1H RMN de A) Corrimientos químicos de los protones de SDZ, en estado libre y acomplejado y B) Corrimientos químicos de los protones HP β CD, en estado libre y acomplejado; donde SDZ (a), complejo SDZ: β CD (b) y HP β CD (c).

Tabla 2.10. A) Corrimientos químicos de los protones de SDZ, en estado libre y acomplejado, B) Corrimientos químicos de los protones HP β CD, en estado libre y acomplejado.

A)

SDZ			
Protón	δ_0	δ_c	$\Delta\delta$
Ha	6,7284	6,6294	-0,099
Hb	7,5882	7,7568	0,1686
Hc	8,2308	8,5469	0,3161
Hd	6,7801	7,1090	0,3289

B)

HP β CD			
Protón	δ_0	δ_c	$\Delta\delta$
H1	5,0551	5,0751	0,0200
H2	3,3256	3,5007	0,1751
H3	3,8457	3,9545	0,1088
H4	3,4516	3,6256	0,1740
H5	3,6174	3,7808	0,1634
H6	3,7551	3,8800	0,1249
CH ₃	1,0254	1,1551	0,1297

El espectro de ^1H RMN del sistema binario SDZ:HP β CD mostró desplazamientos a campos bajos en las señales de la CD inducidos por el IFA (al igual que lo ocurrido con la β CD). Este comportamiento fue atribuido al efecto de anisotropía paramagnética producido por la SDZ en la cavidad de la HP β CD, como resultado de interacciones débiles (fuerza de van der Waals) con los átomos de hidrógeno internos. En este caso, todo indicaría que el IFA podría ingresar a la cavidad de la CD por el sector más angosto o se encontraría profundamente inserto, por estar más afectado el H5, respecto al H3.

Además, se observaron corrimientos de los protones externos a la cavidad, por lo que no se puede omitir, la existencia de interacciones con la superficie exterior.

Debido a que el comportamiento de los corrimientos de los protones de SDZ, en el sistema con HP β CD, es semejante al observado con M β CD, se aplica el mismo análisis de los resultados.

Por último, se observó la variación de los corrimientos químicos ($\Delta\delta$) de los protones de la SDZ y de ARG (estructura química en Figura 2.10 y Anexo 3) en el sistema binario (Tabla 2.11, Figura 2.11).

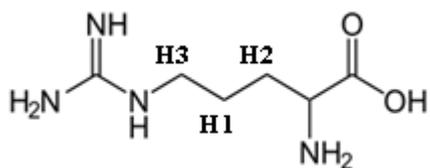


Figura 2.10. Estructura química de ARG.

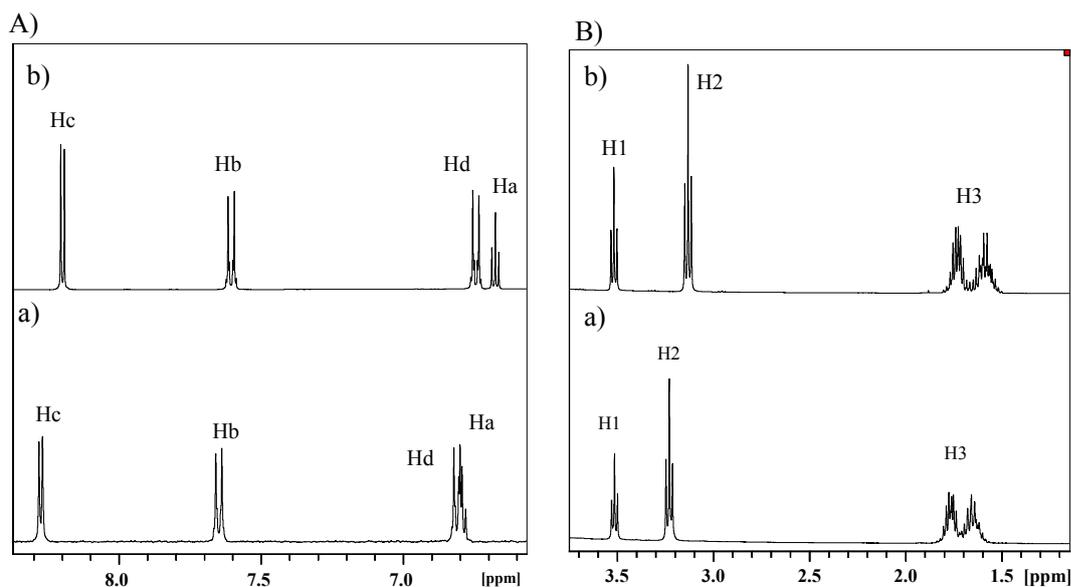


Figura 2.11. Espectros ^1H NMR de A) SDZ pH 9 (a), SDZ:ARG pH 9 (b), B) ARG (a), SDZ:ARG pH 9 (b).

Tabla 2.11. A) Corrimientos químicos de los protones de SDZ, en estado libre y acomplexado, B) Corrimientos químicos de los protones ARG, en estado libre y acomplexado.

A)

SDZ			
Protón	δ_0	δ_c	$\Delta\delta$
Ha	6,7864	6,6760	-0,1104
Hb	7,6482	7,5989	-0,0493
Hc	8,2746	8,1976	-0,0771
Hd	6,8047	6,7446	-0,0601

B)

ARG			
Protón	δ_0	δ_c	$\Delta\delta$
H1	3,5147	3,5175	0,0028
H2	3,2293	3,1321	-0,0972
H3	1,7520	1,6827	-0,0693

Los desplazamientos químicos de SDZ:ARG (Figura 2.11, Tabla 2.11) demostraron que los protones más afectados del AA son, en primera medida, el H2 y luego el H3, que se desplazan a campos altos y el H1, a campos bajos, pero en menor medida. Por otro lado, en el caso de la SDZ, el Ha posee la mayor interacción, luego el Hc, el Hd y por último el Hb, todos estos desplazados a campos altos, lo que sugiere la proximidad a grupos electronegativos.

Al finalizar estos estudios, también se evaluó, a través del método de variación continua por ^1H -RMN, la posible relación estequiométrica CD:AA, pero no se obtuvo ninguna correlación que permita determinarla. Basados en datos bibliográficos, se observó la formación de complejos entre β CD y ciertos AAs con una estequiometría 1:1,²¹ pero con valores de K_s muy bajos, por lo cual se puede concluir que las interacciones de β CD con AAs son muy débiles, acorde a que moléculas hidrofílicas no son fuertemente incluidas en la cavidad de las CDs.²²

2.3.1.3.2 Determinación de K_s para el sistema SDZ: β CD aplicando la ecuación de Scott

Esta ecuación se aplica a datos de RMN obtenidos para complejos que poseen una estequiometría 1:1, empleando mezclas con exceso de agente acomplejante. El valor de la constante se calculó a partir del intercepto del gráfico lineal (Figura 2.12) obtenido al representar $[\beta\text{CD}]_t/\Delta\delta_{\text{obs}}$ versus $[\beta\text{CD}]_t$, sobre la base de los $\Delta\delta$ de Hd de SDZ.

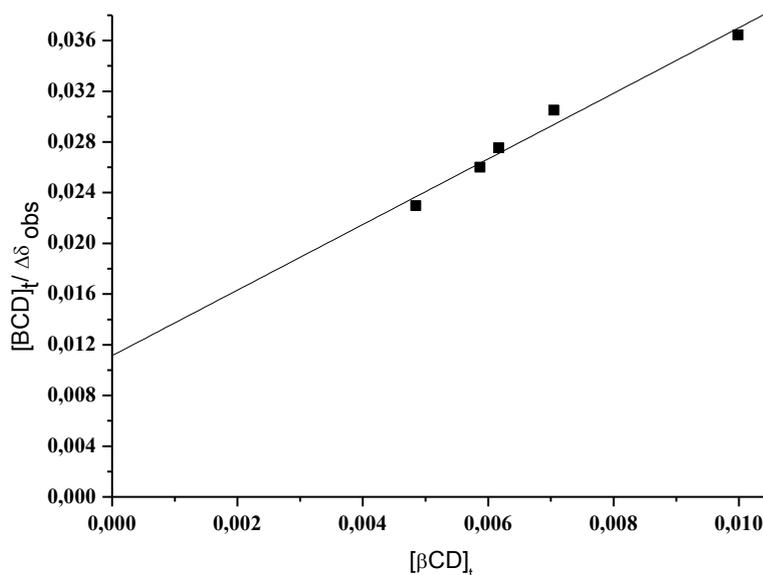


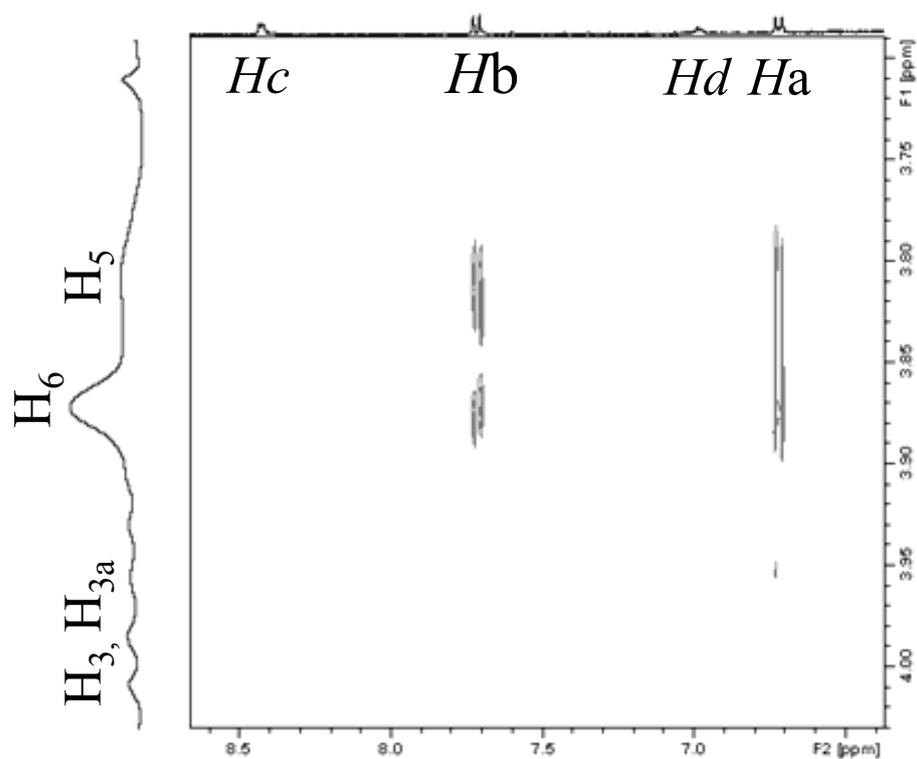
Figura 2.12. Representación gráfica de $[\beta\text{CD}]_t/\Delta\delta_{\text{obs}}$ versus $[\beta\text{CD}]_t$.

El valor calculado de K_s fue de 227 M^{-1} , valor cercano al obtenido por la técnica de diagrama de solubilidad de fases ($282 \pm 15 \text{ M}^{-1}$).

2.3.1.3.3 Estudios de 2D ROESY de los sistemas SDZ: β CD y SDZ: $M\beta$ CD

La información obtenida mediante esta técnica, evidencia la proximidad espacial (distancias menores que 3-4 Å), detectada por entrecruzamiento de picos en un mapa bidimensional, entre los protones del ligando y del huésped, indicando una real inclusión del IFA e informando la porción de la molécula que ingresa en la cavidad de la CD (Figura 2.13).

A)



B)

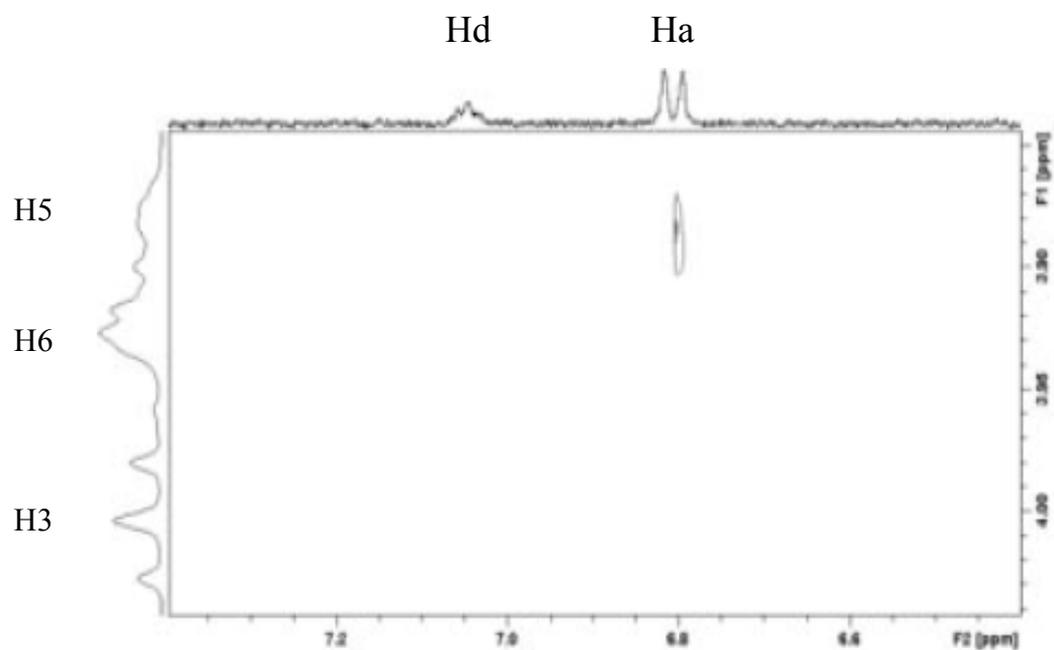


Figura 2.13. 2D ROESY A) SDZ:MβCD, B) SDZ:βCD. Realizados en D₂O a 298 K.

Se observó que la SDZ penetró en la cavidad de ambas CDs, formando el complejo de inclusión, ya que pueden detectarse picos de cruce intermoleculares entre los protones del interior de la cavidad y los protones pertenecientes al anillo aromático A (anillo anilina) del IFA. Con respecto al complejo SDZ:HP β CD,²³ se vió que el Ha del anillo anilina p-sustituido correlacionó con los H3 y H5 de la HP β CD, aparentemente con una fuerza mayor por el H3. Las observaciones de los tres sistemas indicaron que el anillo anilina es incluido en la cavidad de la CD al formarse los respectivos complejos.

Los resultados por ambas técnicas de RMN, mostraron una buena correlación de los datos obtenidos a partir de los complejos SDZ: β CD, SDZ:M β CD y SDZ:HP β CD.²³ Por ¹H-RMN se determinó una perturbación de los protones de SDZ por la presencia de las CDs, y por 2D ROESY, los protones de cada especie involucrados en la interacción, permitiendo de esta manera confirmar la formación de complejos de inclusión entre el IFA y las CDs.

2.3.1.4 Aplicación de DC para la caracterización de complejos con CDs

En la Figura 2.14 se muestra el espectro de DC de SDZ (0,05 mM) y SDZ con diferentes concentraciones de β CD (0,05, 2,6, 5,3, 8 y 12 mM) y solamente el espectro de absorción UV de SDZ pura, debido a que las distintas concentraciones de β CD no lo modifican.

Si bien la β CD no absorbió en el rango de longitudes de onda estudiado, o sea que no presentó DC, a pesar de ser un compuesto quiral,¹³ indujo DC intermolecular por formación del complejo con SDZ (compuesto aquiral que posee grupos cromóforos). El fenómeno ocurrido es conocido como dicroísmo circular inducido (DCI). La aparición de DCI fue una medida de la formación de complejo.

En presencia de la β CD, una solución acuosa conteniendo una molécula huésped aquiral puede pasar a ser quiral, e inducir un efecto Cotton, como el que se observó en este caso. Esto podría ser el resultado de una perturbación por la transición electrónica del IFA, causado por la cavidad asimétrica de la CD luego de la complejación.²⁴

Este efecto Cotton ocurrido, se observa sólo cuando la molécula huésped, o más exactamente la fracción de cromóforo, es incluida en la cavidad, además, cuando es Cotton positivo significa que el momento dipolar eléctrico del IFA coincide con el eje de la CD.¹¹ Es importante señalar que, una asociación del huésped con la superficie exterior de la molécula de CD, puede conducir a una modificación de otras propiedades espectrales, pero no al efecto Cotton.

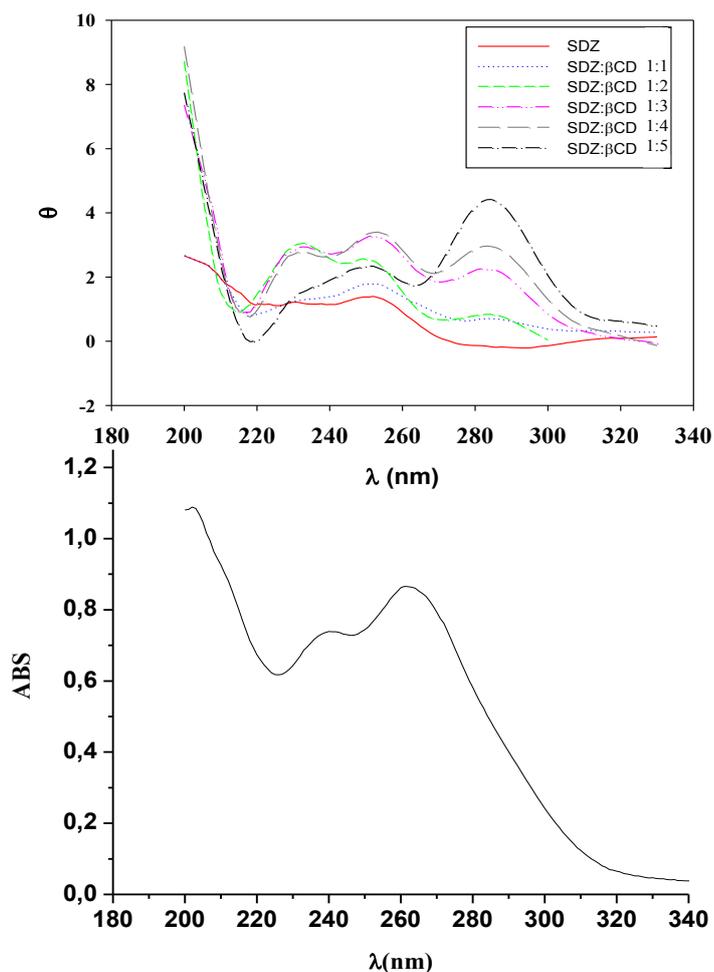


Figura 2.14. Espectros de DC de SDZ y SDZ: β CD y de absorción UV de SDZ.

Cuando la forma del espectro de DCI no cambia con el incremento de cantidades de β CD y muestra puntos isodicroicos, este efecto se puede atribuir a que los complejos formados tienen una estequiometría 1:1 en el rango de concentraciones estudiado.¹³ En este caso, debido a que se observaron puntos isodicroicos solo entre 270-320 nm, no se pudo predecir el número de especies involucradas en la complejación, mediante los espectros de DCI obtenidos.

2.3.1.5 Preparación de una microemulsión y evaluación del uso conjunto de microemulsiones y CDs

Luego de elaborada la microemulsión, se le incorporó el IFA, obteniéndose una solubilidad máxima muy semejante a la lograda por formación de complejos con β CD (ver Figura 2.15).

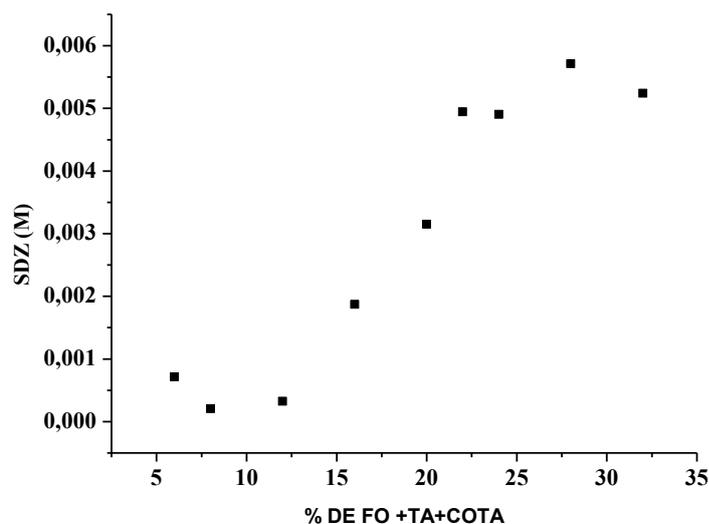


Figura 2.15. Incorporación de SDZ a la fase oleosa de la microemulsión.

Por otro lado, cuando se incorporó la β CD al sistema anterior, los resultados alcanzados indicaron que el agregado de ésta no fue favorable para la solubilidad total de la SDZ. Este evento se puede atribuir a un aumento de la cantidad de IFA en la fase acuosa debido al agregado de la β CD, lo cual, conllevó a una disminución de la incorporación de SDZ en la fase oleosa de la microemulsión, no permitiendo un efecto sinérgico de ambos sistemas sobre la solubilidad.

2.3.2 Sistemas Ternarios

2.3.2.1 Determinación de los DSFs

La selección de la CD utilizada para este tipo de sistemas, se basó en la comparación de los resultados obtenidos a iguales concentraciones de las distintas CDs, además de realizar un balance costo-beneficio, por lo cual se optó por elegir a la β CD, ya que resultó ser un buen agente solubilizante, así como también más económico con respecto a las otras dos CDs.

En una primera parte, se evaluó como influía el cambio de la concentración de AA, en presencia de una concentración constante de β CD y exceso de SDZ, en agua. Se vió, en la mayoría de los casos, que no se presentó una variación en la solubilidad acuosa del IFA por la incorporación del AA, la única excepción fue cuando se utilizó ARG (Tabla 2.12, Figura 2.16).

Tabla 2.12. Datos de los diagramas de solubilidad de fases obtenidos entre ARG y SDZ (a una concentración constante de β CD). Realizado a 25 °C.

Sistema	Solvente	pH final	Ks	S ₀ (mg/mL)	S _{max} (mg/mL)	I
SDZ:βCD:ARG	Agua	8,49	1156 ± 94	0,073 ± 0,009	13,18 ± 0,03	181
SDZ:βCD:ARG	Buffer pH 8	8,47	1096 ± 13	0,90 ± 0,06	13,5 ± 0,5	15
SDZ:βCD:ARG	Buffer pH 6	6,90	----	0,073 ± 0,009	1,300 ± 0,003	18

S₀ es la solubilidad intrínseca, S_{max} solubilidad máxima e I, S_{max}/S₀ el incremento en la solubilidad.

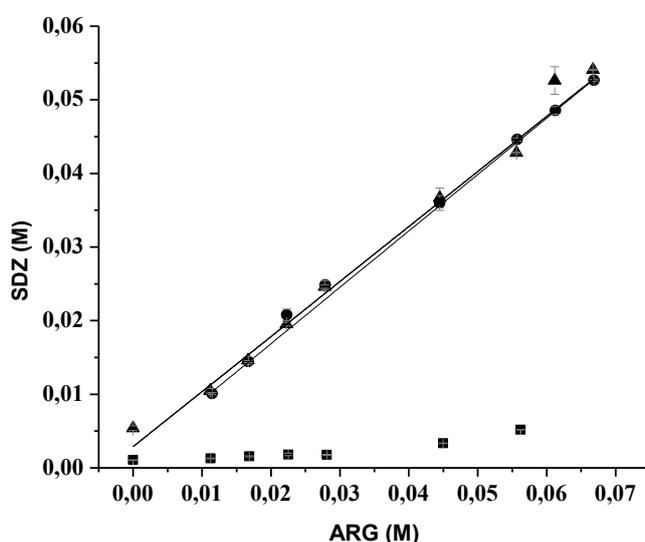


Figura 2.16. Diagramas de solubilidad de fases de SDZ:βCD:ARG, en agua (●) y en distintas soluciones reguladoras de pH 8 (▲) y pH 6(■).

Debido a que en el complejo ternario formado entre SDZ, ARG y β CD, realizado en agua, se observó fluctuación del pH por la presencia de la ARG (valores próximos a 8), al igual que lo sucedido con el sistema binario (SDZ:ARG), por esta razón se realizaron los DSF con soluciones reguladoras de pH 8 y pH 6 (en este último caso para poder compararlo con los complejos binarios SDZ:βCD, al valor de pH obtenido en agua). El pH del punto cero en agua (sin agregado de ARG) fue de 5,74, el cual no se tuvo en cuenta para sacar el pH promedio. Cuando se agregó ARG, como tercer componente del complejo, se obtuvo un gran aumento de solubilidad comparado con el complejo binario SDZ:βCD, así como de la Ks, comparado con SDZ:ARG, como resultado de la potencial

habilidad del AA básico de producir una interacción simultánea entre ambos, la β CD (enlaces hidrógeno) y la SDZ (interacciones electrostáticas y formación de sales).

Cuando se utilizó una solución reguladora de pH 6, el aumento en la solubilidad no fue lineal, por esta razón no se obtuvo un valor de K_s , pudiéndose atribuir este evento, a los cambios de pH (fluctúan entre 6,5 y 7,5) originados por el agregado de ARG al sistema.

Luego, se evaluó como influía el cambio de concentración de β CD, en presencia de una concentración constante de AA y exceso de SDZ, en agua.

Las isothermas de SDZ: β CD:AAs que se obtuvieron fueron lineales y con pendientes menores a 1, a excepción de ARG, en presencia de la β CD (Figura 2.17), por lo que se pudieron calcular los correspondientes valores de K_s de los complejos ternarios (Tabla 2.13). La única excepción fue cuando se usó ASP donde el gráfico no fue lineal.

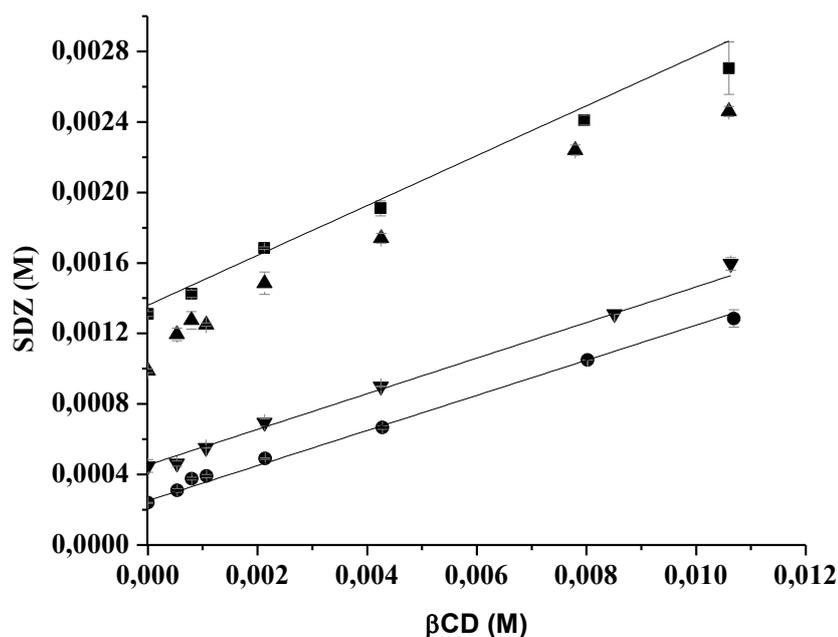


Figura 2.17. Diagramas de solubilidad de fases: SDZ: β CD:ASP (\blacktriangle), SDZ: β CD:GLU (\blacksquare), SDZ: β CD:LEU (\bullet) y SDZ: β CD:GLU (\blacktriangledown). Realizados en agua, a 25 °C.

Tabla 2.13. Datos de los diagramas de solubilidad de fases obtenidos entre SDZ, β CD y los diferentes AAs.

Sistema	Solvente	pH final	Ks	S ₀ (mg/mL)	S _{max} (mg/mL)	I
SDZ:βCD	Agua ^a	5,96	282 ± 15	0,073 ± 0,009	0,33 ± 0,02	4
SDZ:βCD:GLI	Agua	5,78	258,4 ± 0,3	0,073 ± 0,009	0,400 ± 0,009	5
SDZ:βCD:LEU	Agua	6,14	389 ± 7	0,073 ± 0,009	0,32 ± 0,01	4
SDZ:βCD:ASP	Agua	3,19	isoterma	Tipo A _N	0,62 ± 0,01	
SDZ:βCD:GLU	Agua	3,45	122 ± 12	0,073 ± 0,009	0,68 ± 0,04	9

S₀ es la solubilidad intrínseca, S_{max} solubilidad máxima e I, S_{max}/S₀ el incremento en la solubilidad.

^aDato presentado en la sección anterior.

Los valores de Ks obtenidos demostraron que el enlace de SDZ: β CD en presencia de GLU fue relativamente menor comparado con el de ARG, LEU, GLI y el sistema binario SDZ: β CD. Estos valores sugirieron que la presencia de GLU debilita las interacciones entre SDZ y β CD. Sin embargo, fue interesante notar que a pesar del bajo valor de Ks, la solubilidad del IFA, con el agregado de GLU, incrementó su valor de S_{max} (0,678 mg/ml) en presencia de β CD, lo que indica la formación de un complejo soluble. El evento que ocurrió, por la adición de GLU, puede explicarse sobre la base de una mayor solubilización inicial del IFA debido al aumento de la ionización en presencia del AA, con una consecuente disminución de la afinidad por la cavidad apolar de la CD. El mismo razonamiento podría aplicarse para justificar el aumento de solubilidad producido por la presencia de ASP, ya que ambos AAs, GLU y ASP, presentan uno de los grupos ácido carboxílico ionizados al pH de las determinaciones.

Es importante destacar que si bien los complejos formados con IFAs no ionizados son frecuentemente más estables que aquellos con estado ionizado, la solubilidad total alcanzada en el segundo caso generalmente es mayor, como se comentó anteriormente.

El valor de Ks del sistema SDZ: β CD:LEU fue mayor comparado con el de SDZ: β CD (incrementó la eficacia de complejación con respecto a la β CD), pero los valores de S_{max} fueron muy similares a los del sistema binario.

Como se observó, el agregado de los AAs resultó en un incremento de la solubilidad de SDZ. Así, la presencia de β CD y los diferentes AAs, genera un efecto

sinérgico sobre la solubilidad acuosa de SDZ, en comparación a lo observado cuando se adicionaron la CD o los AAs por separado.

La isoterma de SDZ:βCD:ASP presentó una curvatura negativa (A_N , Higuchi y Connors)¹⁷ en el rango de concentraciones de βCD estudiado. El origen de este tipo de diagrama es incierto y tal vez se puede asociar con una alteración de la naturaleza efectiva del solvente en presencia de altas concentraciones de CD, lo que conduce a un cambio en la constante de formación del complejo, otra posibilidad es la auto-asociación de la CD a altas concentraciones, pudiendo afectar el grado de complejación.¹⁷

Por último, para poder comparar los resultados que se obtuvieron con ASP y GLU con respecto al complejo binario (SDZ:βCD) en solución acuosa, se realizaron los diagramas de solubilidad de SDZ:βCD:GLU y SDZ:βCD:ASP en soluciones reguladoras de pH 6, dando en ambos casos una correlación lineal, por lo cual se pudo calcular el valor de K_s (Tabla 2.14).

Tabla 2.14. Diagramas de solubilidad de fases de SDZ:βCD:GLU y SDZ:βCD:ASP en una solución reguladora de pH 6.

Sistema	Solvente	pH	K_s	S_0 (mg/mL)	S_{max} (mg/mL)	I
SDZ:βCD:GLU	Buffer pH 6	5,22	136 ± 25	$0,073 \pm 0,009$	$0,488 \pm 0,02$	7
SDZ:βCD:ASP	Buffer pH 6	5,14	476 ± 24	$0,073 \pm 0,009$	$0,28 \pm 0,01$	4

S_0 es la solubilidad intrínseca, S_{max} solubilidad máxima e I (S_{max}/S_0) el incremento en la solubilidad.

Como en los casos anteriores, se consideró a S_0 como la solubilidad intrínseca del IFA en ausencia de cualquier tipo de agregado.

Con estos resultados se pudo establecer que, a pH 6, la S_{max} del IFA, en presencia de GLU, fue menor en comparación a lo observado a pH 3, debido a que hubo un menor porcentaje de especie ionizada de SDZ, presente en la solución aunque, por otro lado, se obtuvo un aumento en la solubilidad comparado con el complejo binario, SDZ:βCD, en solución acuosa de igual pH. Se observó que, en esta oportunidad, para el complejo SDZ:βCD:ASP fue posible calcular el valor de K_s , la cual mostró un aumento de la estabilidad, aunque no se aumentó la solubilidad de SDZ con respecto al binario (SDZ:βCD).

2.3.2.2 Espectros de 1H RMN y de 2D ROESY de SDZ:CDs:AAs

2.3.2.2.1 1H RMN

Al igual que en los sistemas binarios, la posible inclusión de SDZ y de los AAs, dentro de la cavidad de la β CD, se evaluó analizando los cambios ($\Delta\delta$) en el δ de los protones del complejo, en comparación al δ de SDZ, β CD y AA libres (Figura 2.18, Anexos 3 y 4). Las siguientes tablas presentan los δ de SDZ, AA y β CD y los $\Delta\delta$ debido a la respectiva interacción entre los mismos (Tablas 2.15, 2.16, 2.17, 2.18, 2.19).

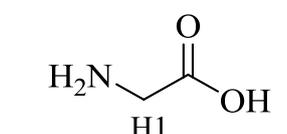
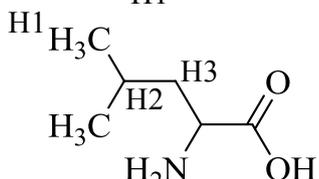
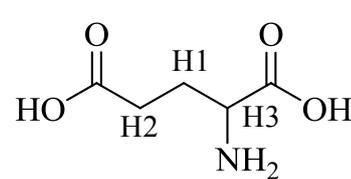
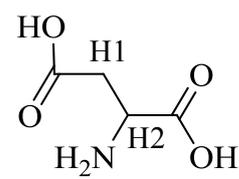
Aminoácido (AA)	Estructura química
Glicina	
Leucina	
Acido glutámico	
Acido aspártico	

Figura 2.18. Estructura química y asignación de protones de los diferentes AAs.

Tabla 2.15. Corrimientos químicos de los protones de SDZ, β CD y GLI en estado libre y acomplejado. Ensayos realizados en D₂O a 298 K.

βCD	δ_o	δ_c	$\Delta\delta$
H1	5,0681	5,0731	0,0050
H2	3,6472	3,6595	0,0123
H3	3,9650	3,9612	-0,0038
H4	3,5828	3,5979	0,0151
H5	3,8539	3,8421	-0,0118
H6	3,8770	3,8810	0,0040
GLI	δ_o	δ_c	$\Delta\delta$
H1	3,6491	3,5617	-0,0874
SDZ	δ_o	δ_c	$\Delta\delta$
Ha	6,7284	6,6499	-0,0785
Hb	7,5882	7,7495	0,1613
Hc	8,2308	8,5260	0,2952
Hd	6,7801	7,1158	0,3357

Tabla 2.16. Corrimientos químicos de los protones de SDZ, β CD y LEU en estado libre y acomplejado. Ensayos realizados en D₂O a 298 K.

BCD	δ_o	δ_c	$\Delta\delta$
H1	5,0681	5,0732	0,0051
H2	3,6472	3,6595	0,0123
H3	3,9650	3,9566	-0,0084
H4	3,5828	3,5859	0,0031
H5	3,8539	3,8267	-0,0272
H6	3,8770	3,8863	0,0093
LEU	δ_o	δ_c	$\Delta\delta$
H1	1,0711	0,9651	-0,106
H2	1,8310	1,7166	-0,1144
H3	1,8310	1,7166	-0,1144
H4	3,8382	3,7354	-0,1028
SDZ	δ_o	δ_c	$\Delta\delta$
Ha	6,7284	6,6518	-0,0766
Hb	7,5882	7,7585	0,1703
Hc	8,2308	8,5474	0,3166
Hd	6,7801	7,1482	0,3681

Para los complejos SDZ: β CD:GLI y SDZ: β CD:LEU, desplazamientos a campos altos se encontraron para H3 y H5, de la β CD. Sumado a esto, los δ correspondientes a los protones localizados en la superficie externa de la β CD (H1, H2 y H4) fueron también

modificados. Para la SDZ, desplazamientos a campos bajos se observaron para Hb, Hc y Hd, mientras que desplazamientos a campos altos se encontraron para los H de GLI y LEU.

Tabla 2.17. Corrimientos químicos de los protones de SDZ, β CD y ARG en estado libre y acomplejado. Ensayos realizados a pH 9, a 298 K.

βCD	δ_o	δ_c	$\Delta\delta$
H1	5,0681	5,0884	0,0203
H2	3,6472	3,6687	0,0215
H3	3,9650	3,9644	-0,0006
H4	3,5828	3,6010	0,0182
H5	3,8539	3,8869	0,0330
H6	3,8770	3,8982	0,0212
ARG	δ_o	δ_c	$\Delta\delta$
H1	1,7520	1,9204	0,1684
H2	3,2293	3,2641	0,0348
H3	3,5147	3,8223	0,3076
SDZ	δ_o	δ_c	$\Delta\delta$
Ha	6,7864	6,7560	-0,0304
Hb	7,6482	7,6993	0,0511
Hc	8,2746	8,3322	0,0576
Hd	6,8047	6,8412	0,0365

Para el complejo SDZ: β CD:ARG, un corrimiento a campos bajos y otro despreciable, se registraron para H5 y H3 de la CD, respectivamente. Sumado a esto, los δ correspondientes a los protones localizados en la superficie externa de la β CD (H1, H2 and H4) fueron también modificados. Desplazamientos a campos bajos se observaron para Hb, Hc y Hd de la SDZ, así como también para los de ARG. Este ensayo se realizó a pH 9 debido a que la presencia de ARG modificaba el pH del medio, a los fines de realizar un análisis comparativo en similares condiciones.

Tabla 2.18. Corrimientos químicos de los protones de SDZ, β CD y GLU en estado libre y acomplejado. Ensayos realizados en D₂O a 298 K.

βCD	δ_0	δ_c	$\Delta\delta$
H1	5,0681	5,0852	0,0171
H2	3,6472	3,6717	0,0245
H3	3,9650	3,9749	0,0099
H4	3,5828	3,5979	0,0151
H5	3,8539	3,8888	0,0349
H6	3,8770	3,8979	0,0209
GLU	δ_0	δ_c	$\Delta\delta$
H1	2,1771	2,1590	-0,0181
H2	2,5861	2,5519	-0,0342
H3	3,8384	3,8186	-0,0198
SDZ	δ_0	δ_c	$\Delta\delta$
Ha	6,7284	6,6560	-0,0724
Hb	7,5882	7,7728	0,1846
Hc	8,2308	8,5650	0,3342
Hd	6,7801	7,1664	0,3863

Tabla 2.19. Corrimientos químicos de los protones de SDZ, β CD y ASP en estado libre y acomplejado. Ensayos realizados en D₂O a 298 K.

βCD	δ_0	δ_c	$\Delta\delta$
H1	5,0681	5,0833	0,0152
H2	3,6472	3,6700	0,0228
H3	3,9650	3,9722	0,0072
H4	3,5828	3,5961	0,0133
H5	3,8539	3,8870	0,0331
H6	3,8770	3,8961	0,0191
ASP	δ_0	δ_c	$\Delta\delta$
H1	3,0207	2,9621	-0,0586
H2	4,0910	4,0430	-0,0480
SDZ	δ_0	δ_c	$\Delta\delta$
Ha	6,7284	6,6576	-0,0708
Hb	7,5882	7,7727	0,1845
Hc	8,2308	8,5636	0,3328
Hd	6,7801	7,1648	0,3847

Para los complejos SDZ: β CD:GLU y SDZ: β CD:ASP se encontraron desplazamientos a campos bajos para H3 y H5 de la CD. También, al igual que en los casos anteriores, los δ correspondientes a los protones localizados en la superficie externa de la β CD (H1, H2 y H4) fueron modificados. Para la SDZ se observaron desplazamientos a campos bajos para Hb, Hc y Hd, mientras que desplazamientos a campos altos se reportaron para los H de GLU y ASP.

Los desplazamientos a campos bajos para H3 y H5 de la β CD, observados en los casos donde estaban presentes GLU y ASP y solo para H5 con ARG, podrían atribuirse a interacciones débiles (fuerza de van der Waals), de los átomos de hidrógeno internos de la cavidad de la β CD, con el IFA o los AAs. Es importante notar que, con respecto al complejo binario SDZ: β CD, donde se observaron desplazamientos a campos bajos mayores para el H3, ahora, los desplazamientos químicos del H5 fueron superiores en comparación al H3. Por otro lado, los corrimientos a campos altos de los H de la cavidad interna de la β CD, observados para los complejos SDZ: β CD:GLI y SDZ: β CD:LEU, podrían ser inducidos por la presencia de un grupo aromático dentro de la cavidad y, al compararlos nuevamente con el complejo binario (SDZ: β CD), se detectó un cambio en la dirección del corrimiento, y asimismo el H5 fue el más afectado.

Debido a que en todos los casos estudiados se comprobó que los protones del interior de la cavidad de la β CD (H3 y H5), presentaron desplazamientos en sus corrimientos químicos en presencia del IFA, se podría sugerir la formación de complejos de inclusión, con el agregado de todos los AAs. Así, los desplazamientos de los H de la cavidad interna de la β CD, podrían ser explicados suponiendo que el agua es reemplazada por la parte de la molécula que ingresa en la cavidad. Por otro lado, los desplazamientos de los protones localizados en la superficie externa de la β CD (H1, H2 y H4), podrían ser debidos probablemente, a algún tipo de cambio conformacional de la molécula huésped o a un efecto producido por los AAs.

Siguiendo con el análisis para SDZ, los corrimientos a campos bajos podrían ser atribuidos a interacciones por fuerzas de van der Waals entre SDZ, β CD y los diferentes AAs, sugiriendo la posible inserción del IFA en la cavidad de la β CD. En todos los casos se observó un desplazamiento del Ha de la SDZ a campos altos, distinto a lo ocurrido con el complejo binario (SDZ: β CD), este evento sugiere la proximidad de grupos electronegativos.

Los distintos desplazamientos observados para los AAs podrían sugerir la participación de estos en la interacción entre la β CD y la SDZ y por lo tanto, un posible rol en la formación de los complejos multicomponentes.

En cuanto a los espectros del IFA, la tendencia general de los cambios en desplazamientos químicos, no es una simple explicación en términos de inclusión o no-inclusión. Los cambios en los corrimientos químicos deben ser considerados como el resultado de la combinación de las interacciones entre el huésped y receptor y un promedio en el tiempo de los cambios conformacionales de las moléculas incluidas.

2.3.2.2.2 Estudios de 2D ROESY de los sistemas ternarios

En las siguientes figuras (Figuras 2.19, 2.20, 2.21, 2.22, 2.23) se muestran los ROESY de los complejos ternarios:

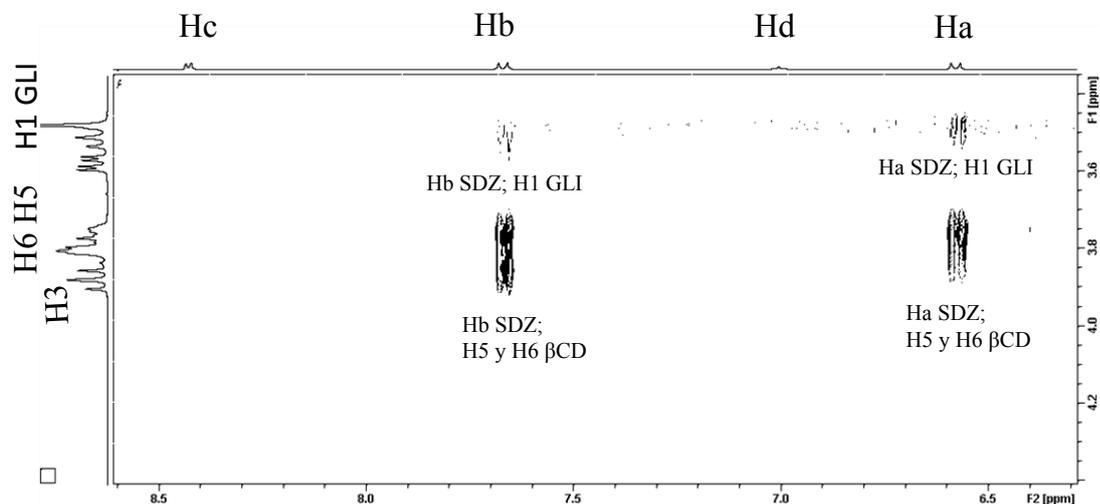


Figura 2.19. 2D ROESY de SDZ:βCD:GLI.

Para el sistema ternario SDZ:βCD:GLI (Figura 2.19) se observó que el Ha de la SDZ se correlacionó con los protones H5 y H6 de la βCD y el Hb (SDZ), con H5, H6 y H3, indicando la formación de complejos de inclusión, donde el anillo A de la SDZ se insertó de manera profunda en la cavidad hidrofóbica de la βCD. Además, el H1 de la GLI se correlacionó con el Ha y, de manera más débil, con el Hb de la SDZ.

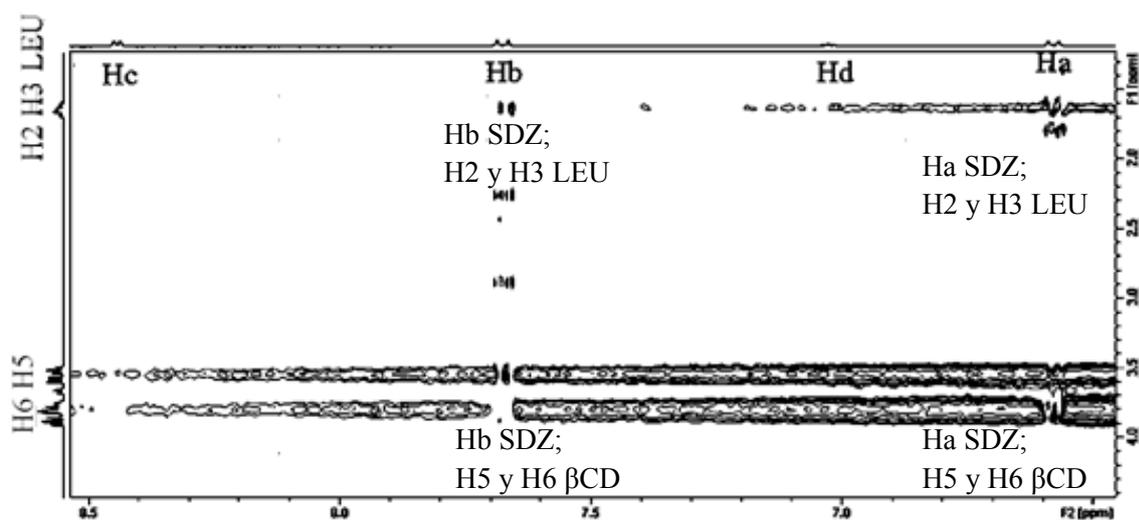


Figura 2.20.A. 2D ROESY de SDZ:βCD:LEU.

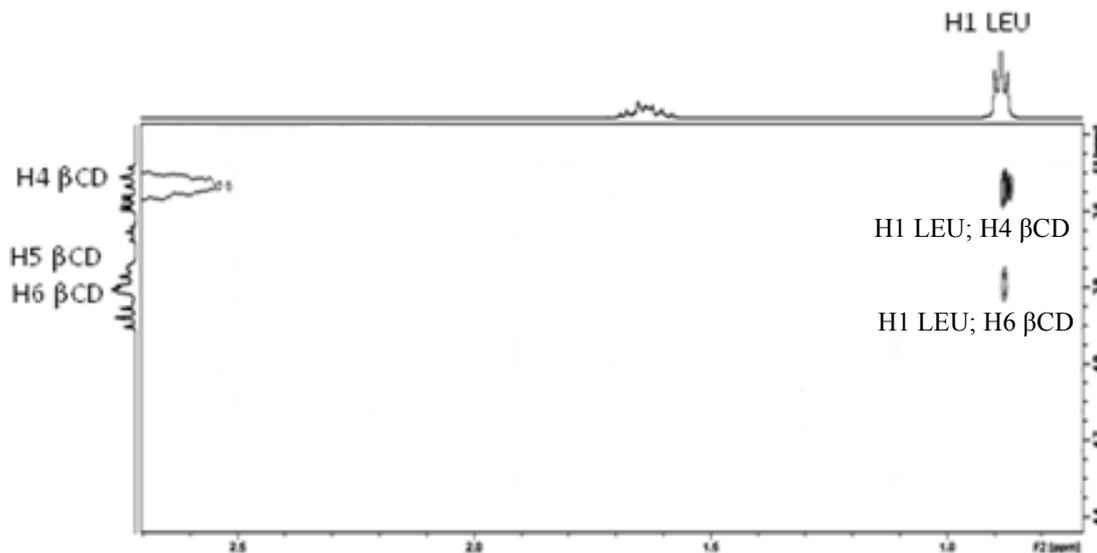


Figura 2.20.B. 2D ROESY de SDZ:βCD:LEU.

En el caso de SDZ:βCD:LEU (Figura 2.20), si bien las señales son débiles, se vió que el Ha de la SDZ presenta picos de cruce con los H5 y H6 de la βCD y con H2 y H3 de la LEU, al igual que el Hb, lo que indicaría la formación de un complejo, donde el anillo A de la SDZ está inserto de manera profunda, en la cavidad de la CD (interacción con el sector angosto) y que la LEU interaccionaría con la SDZ. Por otro lado, el H1 de LEU correlaciona con los H4 y H6 de la βCD, los cuales están ubicados en el sector externo de la CD, suponiendo que parte de la LEU está fuera de la cavidad.

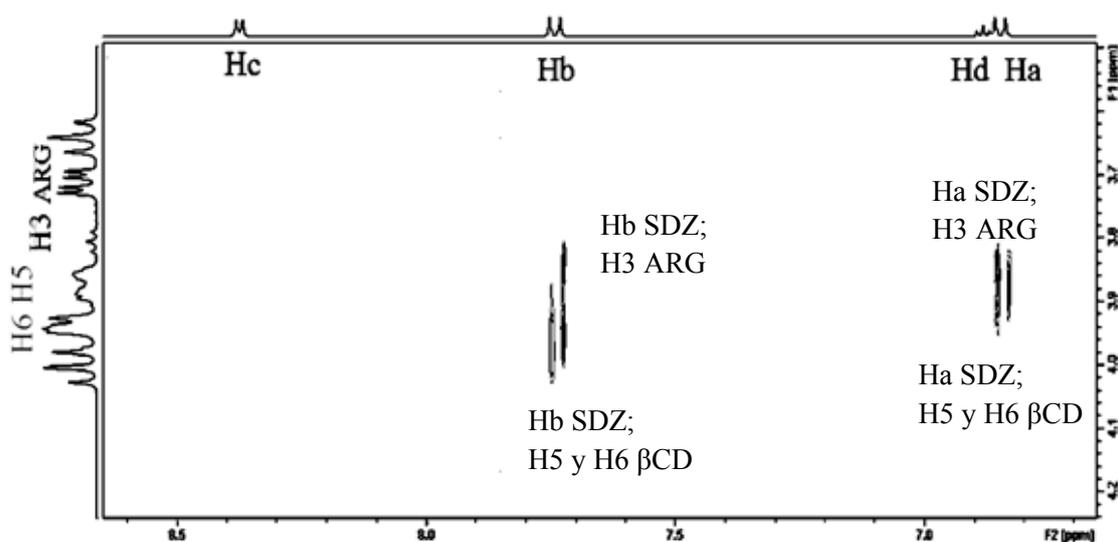


Figura 2.21. 2D ROESY de SDZ:βCD:ARG.

En el caso de SDZ: β CD:ARG (Figura 2.21) se observó que los Ha y Hb de SDZ se correlacionaron con los protones H5 y H6 de la β CD y H3 de ARG, indicando la formación de un complejo de inclusión, donde el anillo A de la SDZ se inserta dentro de la cavidad de la β CD y que la ARG interacciona con la SDZ.

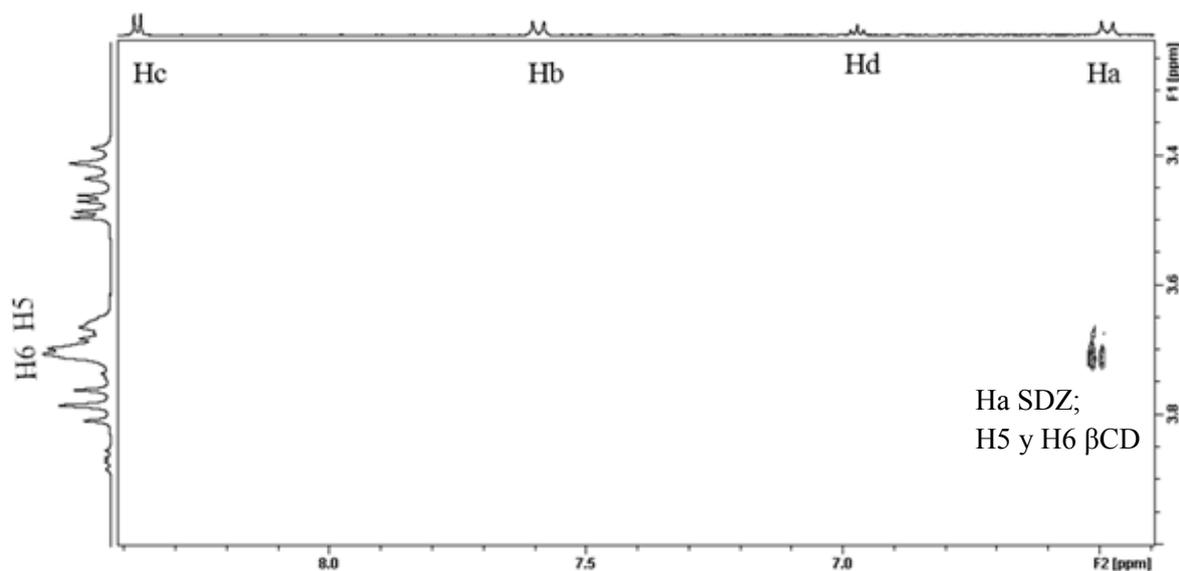


Figura 2.22. 2D ROESY de SDZ: β CD:ASP.

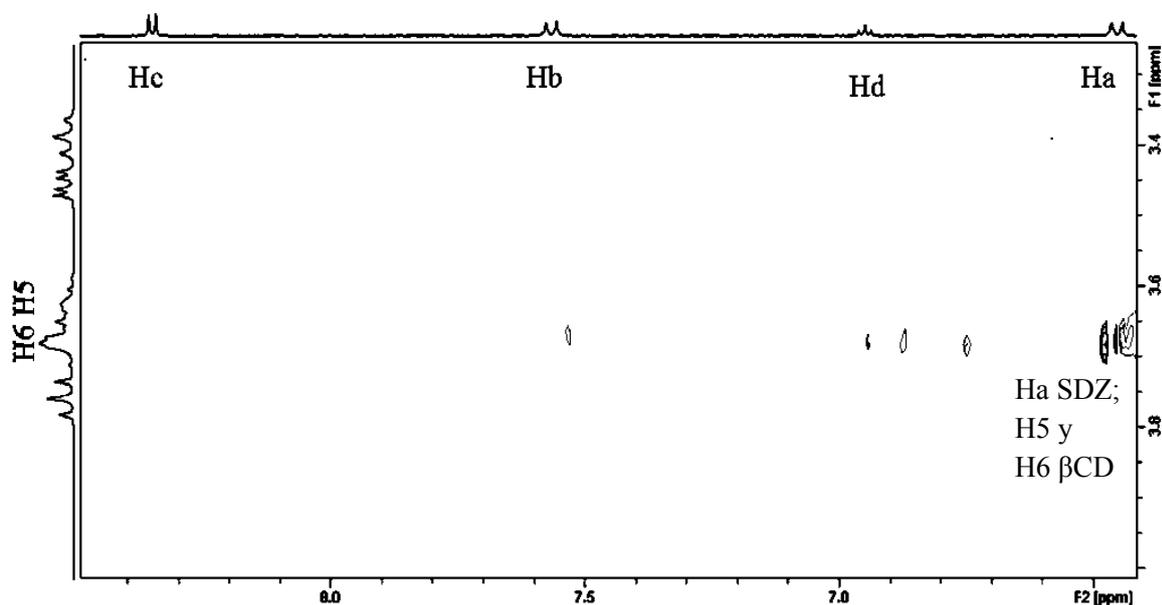


Figura 2.23. 2D ROESY de SDZ: β CD:GLU.

En los casos de SDZ: β CD:GLU y SDZ: β CD:ASP (Figuras 2.22 y 2.23) se observó que el Ha de SDZ correlacionó con los protones H5 y H6 de β CD, indicando la formación

de un complejo de inclusión, donde el anillo aromático A de la SDZ se inserta dentro de la cavidad de la β CD. No se observó interacción del IFA con GLU y ASP.

Se evaluaron también, por la técnica de 2D ROESY, los sistemas de SDZ con los AAs, pero no presentaron correlaciones, sólo la hubo cuando se agregó β CD como tercer componente.

2.4 Conclusión

Las interacciones entre el IFA y las CDs, propuestas para justificar la formación de complejos, fueron los enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y la liberación del agua desde la cavidad de la CD. Por lo tanto, en la formación de los respectivos complejos, se establecieron enlaces no covalentes, los cuales afectaron significativamente la solubilidad de SDZ.

Los valores de K_s fueron obtenidos por diferentes metodologías, entre ellas, DSF y ^1H RMN. La información sobre la estructura supramolecular en solución, por otro lado, fue obtenida por RMN (ROESY) o DC, preferentemente en combinación con métodos computacionales (ver Capítulo 2, Parte 3). Todas las técnicas en su conjunto permitieron obtener datos confiables y comparables frente a la formación de complejos de inclusión con CDs.

A través de los resultados obtenidos se puede concluir que se obtuvo una mayor solubilización cuando se combinó el efecto de la formación de complejo con la existencia del IFA como especie ionizada. Cuando las K_s fueron evaluadas mediante la realización de los DSF, se pudo determinar la formación de complejos binarios solubles con las tres CDs (β CD, HP β CD y M β CD) y con el aminoácido ARG, como también complejos ternarios solubles, con β CD y los diferentes AAs.

Los análisis de ^1H -RMN y ROESY otorgaron información relevante sobre las especies involucradas en las interacciones. El valor de la K_s obtenida, para el sistema SDZ: β CD a través de la ecuación de Scott, fue cercano al obtenido por la técnica de DSF.

La aparición de DC indicó la formación de complejos solubles entre SDZ: β CD.

Debido a todo ello, podría decirse que la selección de un contraión adecuado, así como de la CD correcta, es una estrategia poderosa para reformular IFAs genéricos de manera tal que le aseguren un desempeño comparable con aquellos productos de última generación.

2.5 Referencias bibliográficas

- 1) Stober H, DeWitte W. Sulfadiazine. En: Florey K, editor. Analytical profiles of drug substances, New York: Academic Press, 1982, p. 523-51.
- 2) Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 645–666.
- 3) Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Basic science and product development. *J Pharm Pharmac* 2010; 62: 1607-1621.
- 4) Rocha de Freitas M, Araújo Rolim L, Felts de La Roca Soares M, Rolim-Neto PJ, Muniz de Albuquerque M, Lamartine Soares-Sobrinho J. Inclusion complex of methyl- β -cyclodextrin and olanzapine as potential drug delivery system for schizophrenia. *Carbohyd Polym* 2012; 89: 1095– 100.
- 5) Serafini MR, Menezes PP, Costa LP, Lima CM, Quintans LJ, Cardoso, JC. Interaction of p-cymene with β -cyclodextrin. *J Therm Anal Calorim*, en prensa 2012.
- 6) Valero M, Carrillo C, Rodriguez LJ. Ternary naproxen: β -cyclodextrin:polyethylene glycol complex formation. *Int J Pharm* 2003; 265:141–9.
- 7) Banchemo M, Manna L. The use of lysine to enhance the supercritical complexation of ketoprofen and cyclodextrins. *J Supercrit Fluid* 2012; 67: 76– 83.
- 8) Loftsson T, Matthíasson K, and Másson M. The effects of organic salts on the cyclodextrin solubilization of drugs. *Int J Pharm*. 2003; 262:101-7.
- 9) Mura P, Maestrelli F, Cirri M. Ternary systems of naproxen with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and aminoacids. *Int J Pharm* 2003; 260: 293-302.
- 10) Redenti E, Szente L, and Szejtli J. Cyclodextrins in oligonucleotide delivery. *J Pharm Sci* 2001; 90: 979-86.
- 11) Fromming KH, Szejtli J. Cyclodextrins in pharmacy. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1994; pp. 58-60.
- 12) Ribeiro L, Carvalho RA, Ferreira DC, Veiga FJB. Multicomponent complex formation between vinpocetine, cyclodextrins, tartaric acid and water-soluble polymers monitored by NMR and solubility studies. *Eur J Pharm Sci* 2005; 24: 1-13.
- 13) Dodziuk H. Cyclodextrin and their complexes. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.; 2006; pp. 289-297.

- 14) Djekic L, Primorac M, Filipic S, Agbab D. Investigation of surfactant/cosurfactant synergism impact on ibuprofen solubilization capacity and drug release characteristics of nonionic microemulsions. *Int J Pharm* 2012; 433: 25– 33.
- 15) Dalmora ME, Dalmora SL, Oliveira AG. Inclusion complex of piroxicam with β -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. *In vitro* drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. *Int J Pharm* 2001; 222:45–55.
- 16) Fanun M. Microemulsions as delivery systems. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2012; 17: 306-313.
- 17) Higuchi T, Connors K, Phase solubility techniques. In: Reilly C, Editor, *Advances in analytical chemistry and instrumentation*, New York: Wiley Interscience; (1965), pp. 117–212.
- 18) Farmacopea Argentina 8^a Edición; 2010. Validación de métodos analíticos; pp.406.
- 19) International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2(R1). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*; 2005.
- 20) Martin Del Valle EM. Cyclodextrin and their uses: a review. *Process Biochem* 2004; 39: 1033-46
- 21) Barra M, Hoyos de Rossi R. Catalysis by β -cyclodextrin in the reaction of *p*-nitrophenyl acetate with α -amino acids. *Can J Chem* 1991; 69: 1124-30.
- 22) Tabushi I, Kuroda Y, Mizutani T. Artificial Receptors for Amino Acids in Water. Local Environmental Effect on Polar Recognition by 6A-Amino-6B-carboxy- and 6B-Amino-6A-carboxy- β -cyclodextrins. *J Am Chem Soc* 1986; 108: 4514-18.
- 23) Gaspar de Araujo MV, Barbosa Vieira EK, Lazaro GS, Souza Conegero L, Almeida LE, Barreto LS, Bezerra da Costa N, Gimenez IF. Sulfadiazine/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host–guest system: Characterization, phase-solubility and molecular modeling. *Bioorgan Med Chem* 2008; 16: 5788–94.
- 24) Ventura CA, Puglisi G, Zappala M, Mazzone G. A physico-chemical study on the interaction between papaverine and natural and modified β -cyclodextrins. *Int J Pharm* 1998; 160:163-72.

PARTE

2

ESTUDIOS DE COMPLEJOS BINARIOS Y TERNARIOS EN ESTADO SÓLIDO



Parte 2

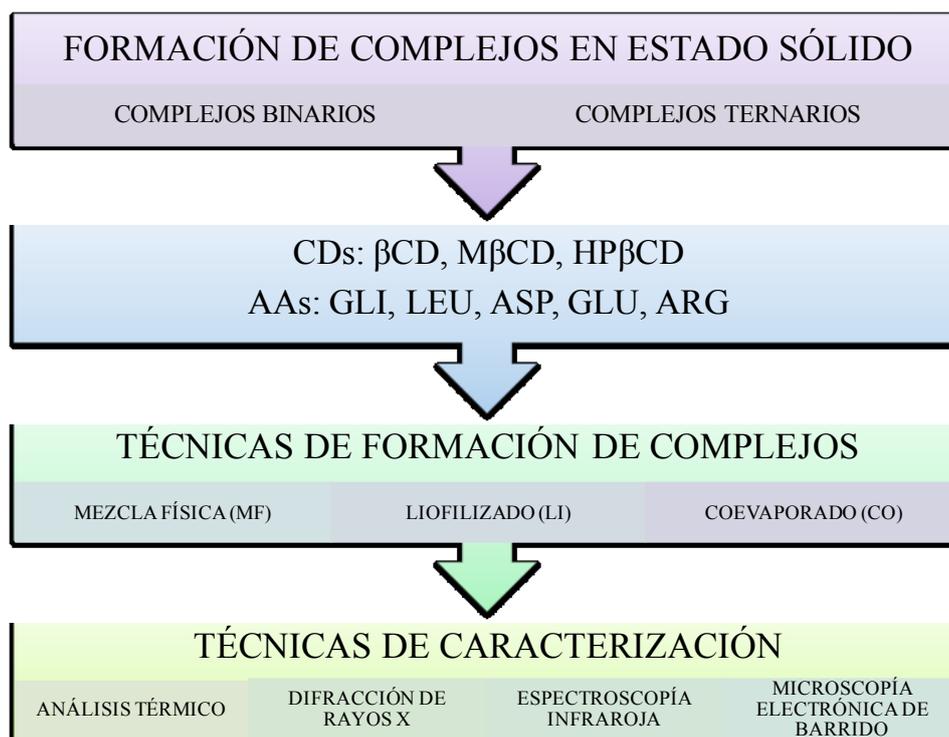
Estudios de los complejos binarios y ternarios en estado sólido

2.1 Introducción

En la Parte 1, del actual capítulo, se comparó la factibilidad de la complejación en solución acuosa de la SDZ con las CDs y/o los AAs, demostrando que, debido a la formación de complejos, se logró un aumento de la solubilidad acuosa del IFA.

La principal vía de administración de los IFAs es a través de formas de dosificación sólidas, las cuales son formuladas y procesadas a partir de polvos.^{1A} Además, muchos compuestos sólidos existen en diferentes formas, tales como amorfas, cristalinas o solvatadas, afectando de esta manera su solubilidad, velocidad de disolución, estabilidad y biodisponibilidad. De estas formas sólidas, la amorfa es, a los fines de su utilización como IFA, la más importante, debido a que posee mayor velocidad de disolución y por lo tanto, mejor biodisponibilidad. No obstante, los compuestos amorfos se transforman fácilmente a sólidos cristalinos cuando son manipulados en el proceso productivo, o durante el almacenamiento; por esto es necesario controlar los procesos de cristalización y las transiciones polimórficas. Se vió que las CDs son capaces de incrementar la estabilidad física de IFAs, aún cuando se producen los procesos anteriormente mencionados (transiciones polimórficas o de cristalización).^{2A}

En el presente trabajo de tesis, para la obtención de los sistemas sólidos, se utilizaron diferentes técnicas de formación, tales como la simple mezcla física (MF), liofilizado (LI), coevaporado (CO) y para el caso particular de SDZ:βCD, se incorporó la técnica de secado por spray (Spray Drying, SD). La caracterización de los sistemas sólidos se realizó mediante los métodos de análisis térmico [calorimetría diferencial de barrido (*DSC*, abreviatura en inglés), análisis termogravimétrico (ATG) y su derivada (DTG)], espectroscopía infrarrojo (IR), difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de barrido (SEM, abreviatura en inglés) (Esquema 2.1).



Esquema 2.1. Resumen de las técnicas que se utilizaron para la realización y caracterización de los complejos en estado sólido.

El efecto de la interacción en el estado sólido, en los sistemas binarios y ternarios conteniendo SDZ, también se evaluó y comparó en términos de propiedades de disolución *in vitro*, ya que la velocidad de disolución *in vitro* de un IFA es una herramienta importante para el desarrollo de formulaciones y control de sólidos farmacéuticos, debido a que esta propiedad nos permite determinar la liberación *in vitro* de un IFA desde una forma posológica sólida.^{1B,3,4}

Los diferentes métodos de caracterización fueron seleccionados, debido a que, en su conjunto, permiten verificar la existencia en estado sólido, de interacciones entre los componentes de los sistemas elaborados,⁵ como es el caso particular de este proyecto, entre la SDZ, las CDs y/o los AAs.

Los métodos de análisis térmico, permiten obtener información sobre propiedades y transformaciones físicas y/o químicas de una muestra cuando es sometida a variaciones de temperatura en una atmósfera específica. Estos métodos son comúnmente utilizados para monitorear procesos endotérmicos (fusión, evaporación, sublimación, desolvatación, transición de fase sólido-sólido, degradación química), como así también procesos exotérmicos (cristalización y descomposición oxidativa).^{1C} Además, son considerados métodos de rutina para realizar una investigación rápida de manera cualitativa.⁶

En el caso del DSC, la muestra a investigar es gradualmente calentada/enfriada a una cierta velocidad y los eventos causados, por los cambios de temperatura (transición de fase, fusión, descomposición, etc), son registrados como calores de absorción o liberación. Representa una técnica de elección, gracias a su habilidad de proveer información detallada referida a propiedades físicas y energéticas de una sustancia.^{2B,7,8} El ATG es una medida de la pérdida de peso, inducida térmicamente, de un material en función de la temperatura suministrada. Se aplica a estudios que involucran tanto pérdida como ganancia de masa, en procesos de desolvatación y descomposición de compuestos. El ATG es un complemento del análisis de DSC y colabora en la asignación de los eventos térmicos.

Por su parte, las ciclodextrinas (CDs) se comercializan como hidratos con diferentes contenidos de agua, dependiendo de los procedimientos de preparación y almacenamiento. Por ello, el ATG y el DSC, representan también una herramienta de elección, para la caracterización fisicoquímica del estado sólido de estos compuestos en términos de energías de liberación de agua.⁶

Por otro lado, la espectroscopía IR observa las vibraciones de enlace y proporciona evidencia de los grupos funcionales presentes,⁹ se utiliza para evaluar la interacción entre las CDs y el IFA en el estado sólido, debido a que la complejación del huésped produce cambios o corrimientos en el espectro de absorción, por lo cual se pueden investigar los grupos funcionales de los IFAs, involucrados en la complejación.^{8,10}

En el caso de la DRX se utiliza para la identificación y el análisis cuantitativo de fases cristalinas (cada sustancia cristalina produce siempre un diagrama de difracción característico), es un método de alta sensibilidad para evaluar pequeñas diferencias en las estructuras cristalinas, por lo tanto, permite detectar la formación de complejos.¹¹

Sumado a lo anterior, el SEM proporciona imágenes y datos físico-químicos de la superficie de cuerpos, generalmente opacos a los electrones, por medio de un delgadísimo haz de electrones que recorre dicha superficie, así como de detectores que traducen las señales que de ella emanan, transformándolas en corrientes eléctricas. Es usado frecuentemente para estudiar la morfología de partículas de interés farmacéutico; la información obtenida es visual y descriptiva.^{1D}

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 *Materiales*

SDZ (Parafarm, Argentina); β CD, HP β CD y M β CD fueron una donación de Roquette (agente Ferromet S.A en Argentina). L-Leucina y L-Arginina (SIGMA); Acido L-Aspártico y Acido L (+)-Glutámico (Anedra) y Glicina (Todo Droga). Los experimentos fueron realizados con reactivos y solventes grado analítico. El agua que se usó en estos estudios, se obtuvo mediante un sistema de purificación Milli-Q (Millipore® Bedford, USA).

2.2.2 *Equipamiento*

- Balanza analítica: Voyager Ohaus modelo Explorer E01140.
- Baño ultrasónico: Ultrasonic LC-30H Elma (Alemania).
- Liofilizador: Freeze Dye 4.5 Labconco corp., Kansas City, MI.
- Secador por spray: Büchi Mini Spray Dryer B-290.
- Calorímetro Diferencial de barrido: DSC TA 2920.
- Analizador Termogravimétrico: TG TA 2950.
- Difractómetro de Rayos X: Philips PW 1710 base
- Espectrofotómetro IR: Nicolet 5 SXC FT-IR.
- Microscopio electrónico de barrido: LEO Model EVO 40XVP.
- Aparato de disolución: Hanson SR11 6 Flask Dissolution Test Station, Hanson Research Corporation, Chatsworth, USA.
- Espectrofotómetro UV-VIS (Shimadzu UV-Mini 1240 spectrophotometer).

2.2.3 *Preparación de los sistemas binarios y ternarios en estado sólido (SDZ:CDs, SDZ:CDs:AAs)*

Los sistemas sólidos se prepararon utilizando relaciones equimolares de SDZ con CD (β CD, M β CD o HP β CD) (1:1) y/o AAs (1:1:1), conforme a los diagramas de solubilidad de fase obtenidos, utilizando diferentes técnicas, las cuales se detallan a continuación:

- **Mezcla física (MF):** se realizó por simple mezcla en seco, de los correspondientes componentes, utilizando un mortero de ágata, hasta obtener un sólido homogéneo a temperatura ambiente.

- **Liofilizado (LI):** Cantidades apropiadas de cada uno de los componentes se suspendieron en agua destilada, agitando en un baño ultrasónico a $25,0 \pm 0,1$ °C; luego que el sistema se disolvió completamente, la solución obtenida se filtró a través de membranas de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore[®], USA). Los filtrados fueron congelados a -40°C por 24 h, antes de que el proceso de liofilizado fuera iniciado.
- **Co-evaporado (CO):** cada sistema se preparó disolviendo y mezclando cantidades equimolares de los correspondientes componentes en etanol y agua, en una relación 1:1. El solvente se extrajo al vacío luego de un tratamiento de agitación ultrasónica por 1h.
- **Secado por Spray (SD):** Cantidades equimolares de SDZ y βCD se disolvieron en agua, la solución obtenida fue agitada por ultrasonido por 1h. Luego de que la disolución se completó, fue secada por aspersión siguiendo las condiciones que se detallan a continuación: temperatura de entrada 119°C , temperatura de salida $38-40^\circ\text{C}$, velocidad de flujo de la solución 120 mL/h , velocidad de flujo de aire $36-38 \text{ m}^3/\text{h}$, presión de aire $0,07 \text{ bar}$.

2.2.4 Caracterización de los sistemas binarios y ternarios

Con el fin de verificar la existencia de una posible interacción entre la SDZ, las CDs y/o los AAs, cada muestra obtenida, las cuales se presentaron como polvos blancos, se analizó por diferentes técnicas, las cuales se detallan a continuación.

2.2.4.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El comportamiento térmico se estudió por calentamiento de 1-3 mg de muestra en cápsulas de aluminio herméticas con una perforación en su superficie (*pinhole*, término en inglés, Imagen 2.1) en un rango de temperatura comprendido entre 25 y 350°C , con una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ y bajo atmósfera de nitrógeno.



Imagen 2.1. Cápsula de aluminio hermética con una perforación en su superficie (*pinhole*).

2.2.4.2 *Análisis Termogravimétrico (ATG)*

Las muestras se estudiaron utilizando las mismas condiciones que las usadas en la obtención de las curvas de DSC. Los datos se procesaron usando el software TA Instruments Universal Analysis 2000.

2.2.4.3 *Difracción de Rayos X (DRX)*

Con la finalidad de determinar el grado de cristalinidad de los complejos formados a partir de SDZ, se obtuvieron los patrones de difracción de Rayos X, a temperatura ambiente, con monocromador de grafito, utilizando un ánodo de Cu con radiación $K\alpha$ ($\lambda=1,5418\text{\AA}$), 40KV, 40mA y tamaño de paso de $0,02^\circ$. Los difractogramas se registraron desde 5° a 50° (2θ). El procesamiento de los datos experimentales se efectuó con Origin y/o Expert Viewer (pertenece al paquete de programas del difractómetro). Los ensayos se realizaron en CRIBABB-CONICET, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.

2.2.4.4 *Espectroscopía infrarrojo mediante el método de transformada de Fourier (FT-IR)*

Los espectros FT-IR de los compuestos puros y de los sistemas binarios y ternarios, obtenidos por los diferentes procedimientos, fueron medidos en discos de bromuro de potasio. Los espectros de FT-IR de los complejos fueron comparados con los de sus correspondientes materiales puros.

2.2.4.5 *Microscopía electrónica de barrido (SEM)*

Las estructuras morfológicas microscópicas de los materiales puros y de los sistemas obtenidos se investigaron y fotografiaron usando un microscopio electrónico de barrido. Las muestras se fijaron a trozos de cobre con cintas adhesivas de doble faz de aluminio y luego, se hicieron eléctricamente conductoras por recubrimiento con oro, usando un recubridor PELCO Modelo 3. La magnificación seleccionada fue suficientemente capaz de apreciar en detalle la morfología de las muestras bajo estudio. Los ensayos se realizaron en CRIBABB-CONICET, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.

2.2.5 Estudios de disolución de los sistemas binarios y ternarios

La velocidad de disolución de SDZ pura y de los sistemas SDZ:βCD y SDZ:βCD:GLI se estudió por el método de paletas según las especificaciones de la USP 32,¹² a $37,0 \pm 0,5$ °C y con 75 r/min.

Se adicionaron 42 mg de SDZ o sus cantidades equivalentes de SDZ:βCD o SDZ:βCD:GLI, a 250 mL de solución de ácido clorhídrico 0,1M. Luego, a diferentes intervalos de tiempo, se tomaron alícuotas de 2 mL. Las muestras extraídas se reemplazaron por volúmenes equivalentes de medio de disolución fresco mantenido a la misma temperatura. Las soluciones obtenidas se determinaron espectrofotométricamente a 243 nm.

La evaluación de los perfiles de disolución de SDZ se realizó mediante el cálculo del factor de similitud (f_2),¹³ considerándose al IFA libre como referencia y se lo comparó con la cantidad de IFA liberado a partir de los sistemas, a diferentes intervalos de tiempo. El factor de similitud (f_2) (Ecuación 2.1) se utiliza como una medida de la similitud considerando el porcentaje (%) de disolución entre dos curvas, y se calcula como:

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^R (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \right\} \times 100 \quad (\text{Ec.2.1})$$

Donde, R_t y T_t son los valores promedio de los porcentajes de disolución a cada tiempo y n es el número de puntos (tiempo) del perfil de disolución.

2.3 Resultados y Discusión

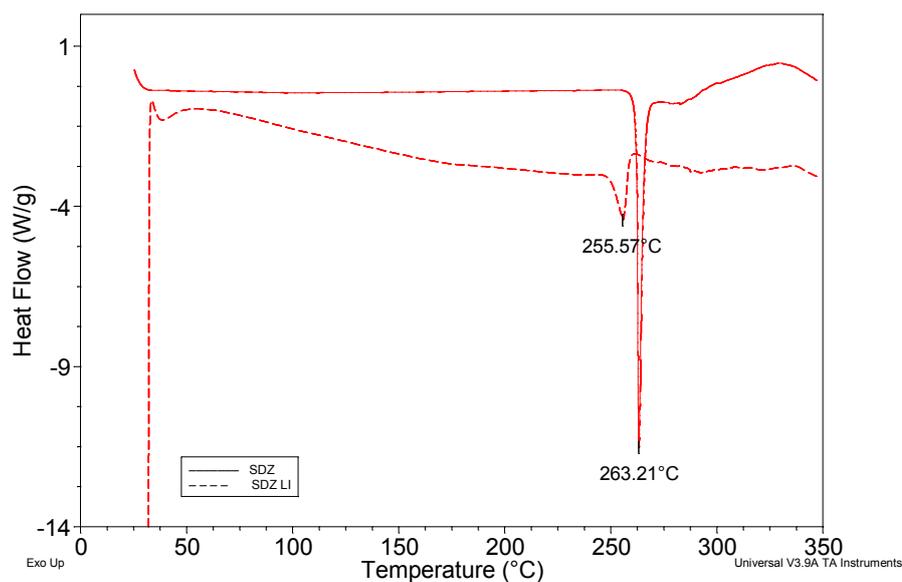
2.3.1 Sistemas binarios

Se eligió el sistema SDZ:βCD para evaluar 4 técnicas diferentes (MF, LI, CO, SD) de obtención de los complejos en estado sólido, acorde a lo concluido en la parte 1 de este capítulo, donde se explicó que la βCD resultó ser un buen agente solubilizante, a la vez que más económica, con respecto a las otras dos CDs. Para los sistemas SDZ:HPβCD y SDZ:MβCD se utilizaron solo las técnicas de MF y LI.

2.3.1.1 Análisis térmicos

Las curvas de DSC, ATG y DTG de los compuestos puros, SDZ, βCD, MβCD e HPβCD, se muestran en las Figuras 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4, respectivamente.

A)



B)

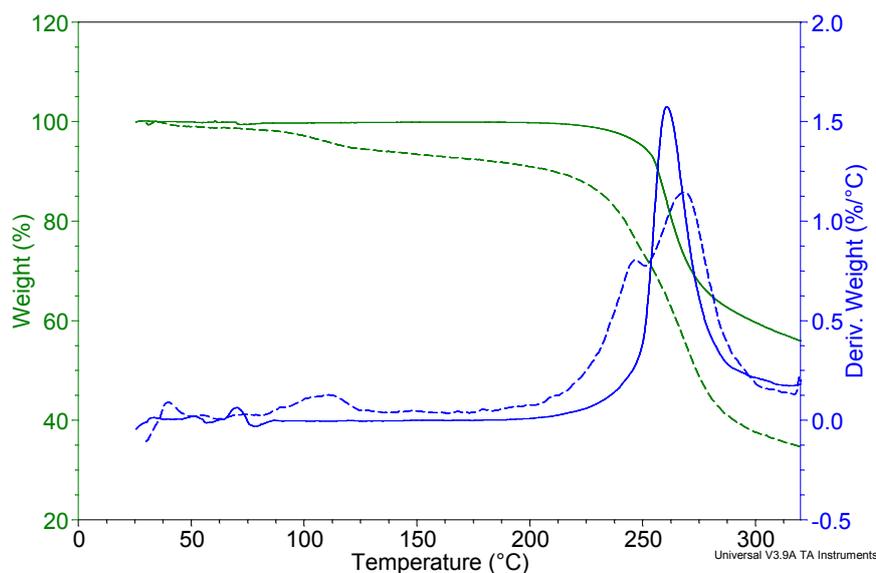


Figura 2.1. Curva de A) DSC (—), B) ATG (—) y DTG (—) de SDZ (—) y SDZ LI (----).

Analizando la curva de DSC de SDZ (Figura 2.1A), se observó que funde con descomposición,¹⁴ ya que presentó una endoterma aguda de fusión a 263,21°C (con una entalpía de fusión (ΔH) de 164,4 J/g), típica de un compuesto cristalino anhidro, seguida de un evento exotérmico atribuido a la descomposición del IFA, lo cual coincidió con una pérdida de masa en la curva de ATG (a temperaturas mayores de 251°C) (Fig. 2.1B).^{14,15}

Algunos autores^{16,17} citaron que el proceso de liofilizado de un IFA, no incluido en una CD, debería conducir a una dispersión amorfa. Debido a que este proceso produce el mismo comportamiento térmico (ausencia del pico de fusión) que la inclusión en la cavidad de CDs, los datos de DSC no podrían confirmar la formación de un complejo de inclusión sino que dicho proceso debería ser corroborado por otras técnicas. Para la verificación de este postulado, se realizaron los análisis térmicos del IFA puro luego de liofilizarlo (SDZ LI) (Figura 2.1), donde se observó que el evento endotérmico, atribuido a la fusión de SDZ, no desaparece con el proceso realizado, sino que se presentó levemente desplazado a menores temperaturas (255,57°C). Analizando las curvas de ATG y de DTG de SDZ LI se observó una leve pérdida de masa a temperaturas bajas (aproximadamente 100°C) y luego a 268,5 °C, la máxima pérdida de peso.

A continuación, se presentan las curvas DSC, ATG y DTG de las CDs (Figuras 2.2, 2.3 y 2.4).

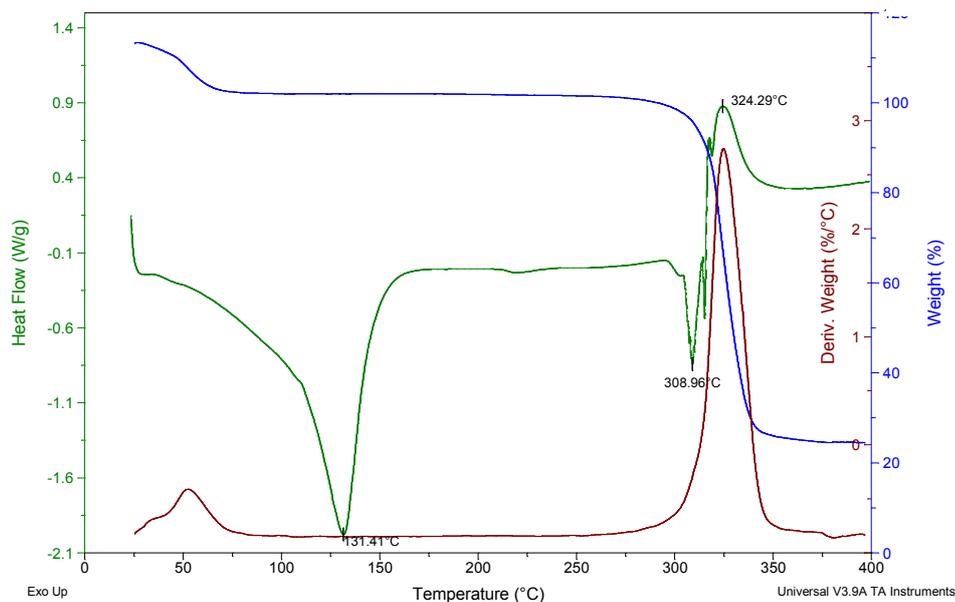


Figura 2.2. Curva de DSC (—), ATG (—) y DTG (—) de β CD.

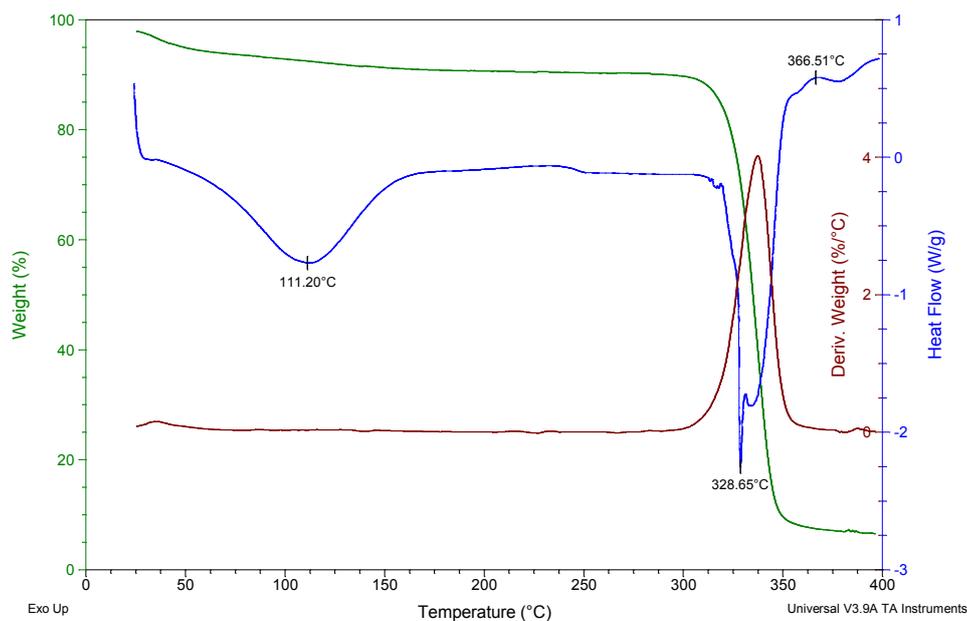


Figura 2.3. Curva de DSC (—), ATG (—) y DTG (—) de M β CD.

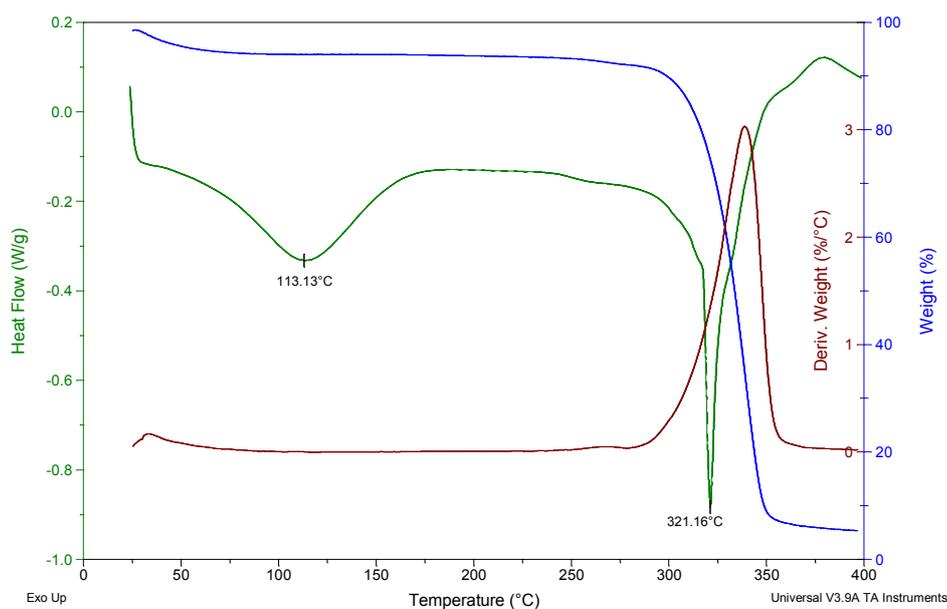


Figura 2.4. Curva de DSC (—), ATG (—) y DTG (—) de HP β CD.

Analizando, de manera general los perfiles termoanalíticos de las CDs, estos se pueden dividir en tres partes:⁶

- 1) Pérdida de agua (deshidratación) desde temperatura ambiente hasta aproximadamente 150°C, dependiendo de las condiciones del experimento.

- 2) Degradación térmica (acompañada por oxidación por efecto del aire), comenzando a 250°C, en estado sólido, continuando en estado líquido luego de la fusión, la cual ocurre aproximadamente a 300°C.
- 3) Ignición por encima de los 300°C.

Analizando específicamente los perfiles térmicos de las CDs (Figuras 2.2, 2.3 y 2.4), estos presentaron un evento endotérmico típico, atribuible a la deshidratación térmica, a temperaturas entre 25°C y 150°C (exhibiendo un máximo a 131,41°C para la β CD; 111,20°C para la $M\beta$ CD y 113,13°C para la $HP\beta$ CD), luego a temperaturas superiores (300°C) presentaron endo-exotermas de degradación, evidenciadas también por la pérdida de masa en el ATG.

A continuación, se detallan las curvas de DSC, ATG y DTG de los sistemas binarios SDZ: β CD, SDZ: $M\beta$ CD, SDZ: $HP\beta$ CD que se obtuvieron por las distintas técnicas, y se muestran en las Figuras 2.5, 2.6 y 2.7, respectivamente.

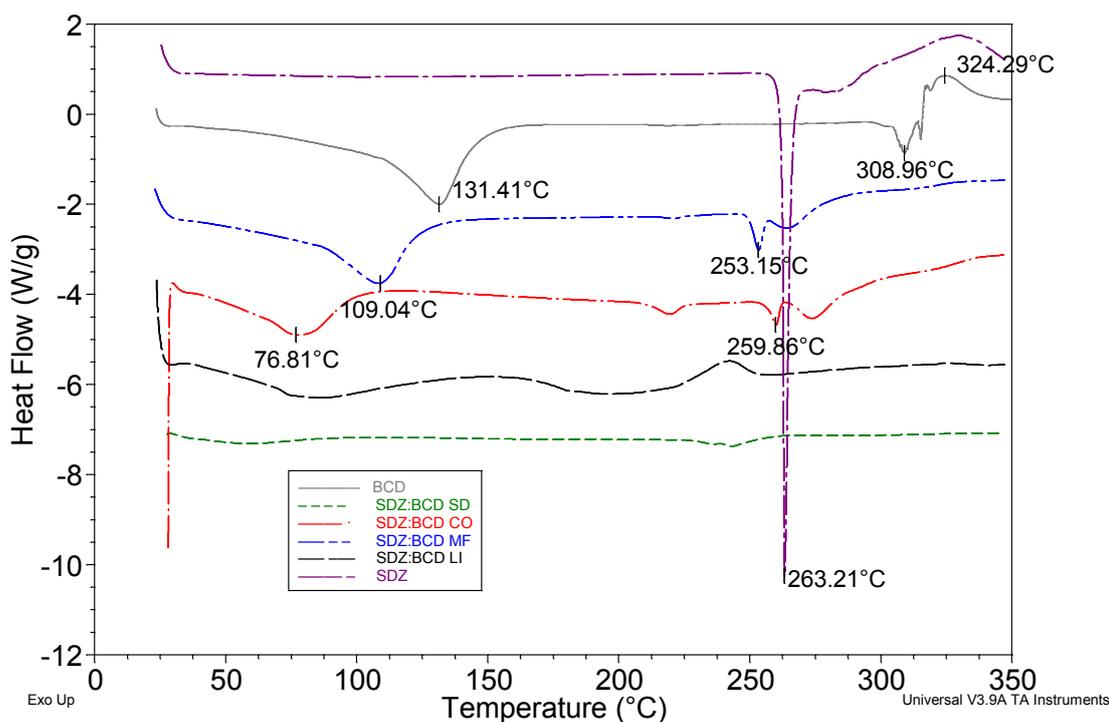


Figura 2.5.A. Análisis térmico, DSC, de SDZ, β CD y los sistemas SDZ: β CD.

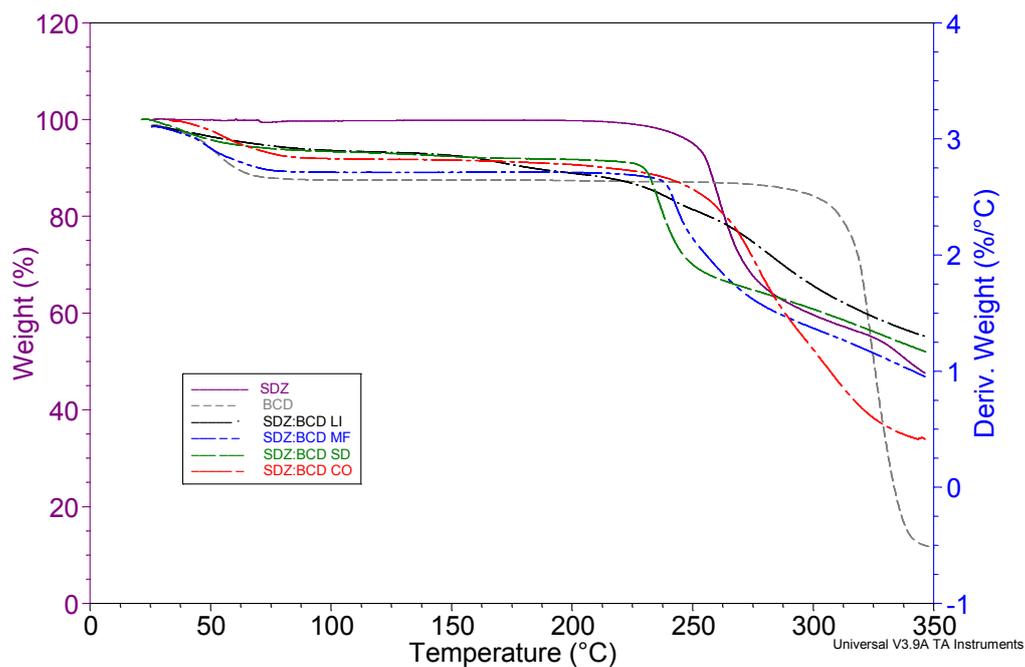


Figura 2.5.B. Análisis térmico, ATG, de SDZ, β CD y los sistemas SDZ: β CD.

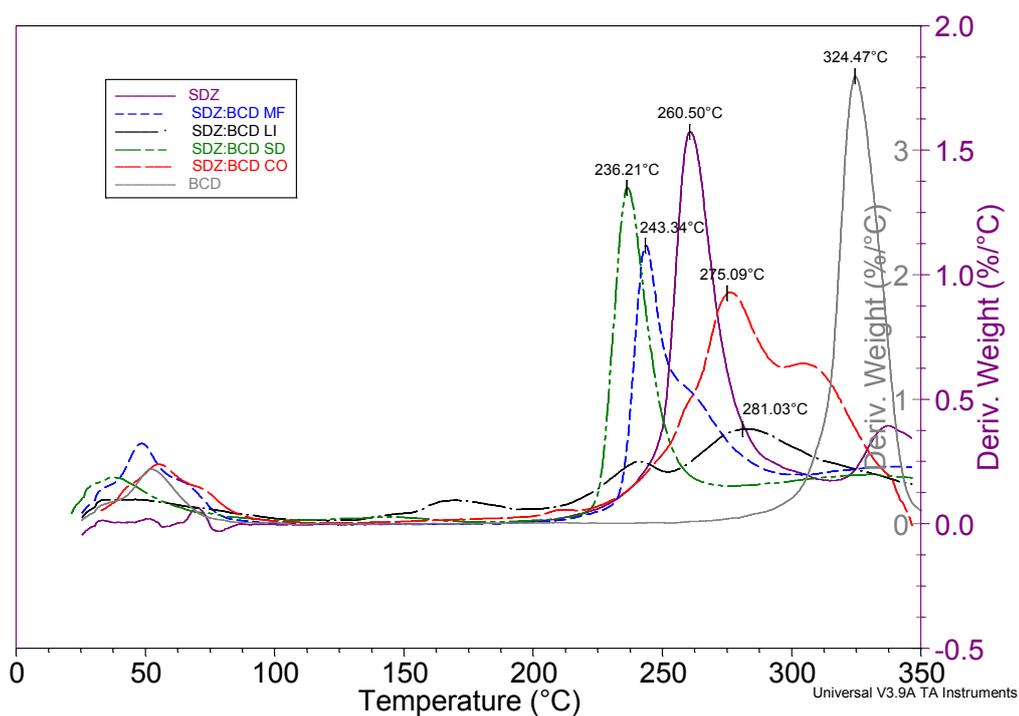


Figura 2.5.C. Análisis térmico, DTG, de SDZ, β CD y los sistemas SDZ: β CD.

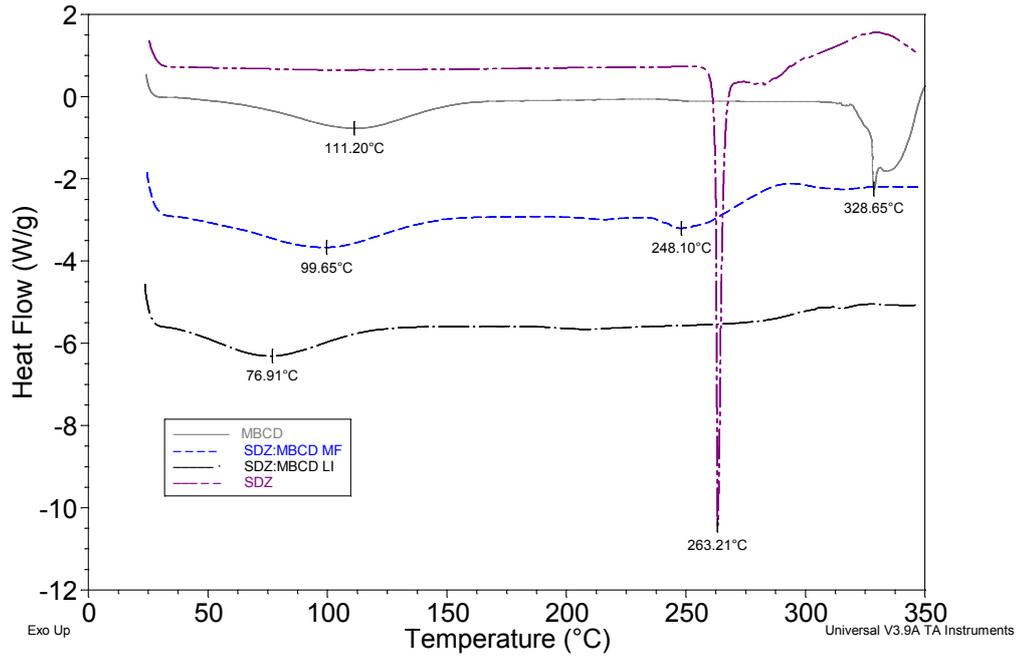


Figura 2.6.A. Análisis térmico, DSC, de SDZ, MβCD y los sistemas SDZ:MβCD.

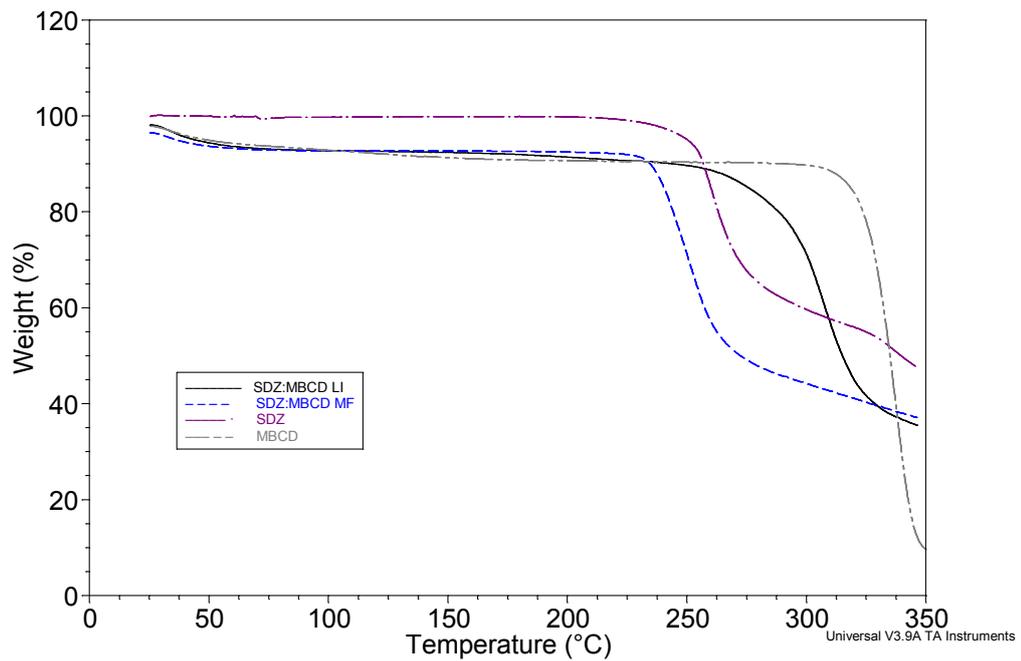


Figura 2.6.B. Análisis térmico, ATG, de SDZ, MβCD y los sistemas SDZ:MβCD.

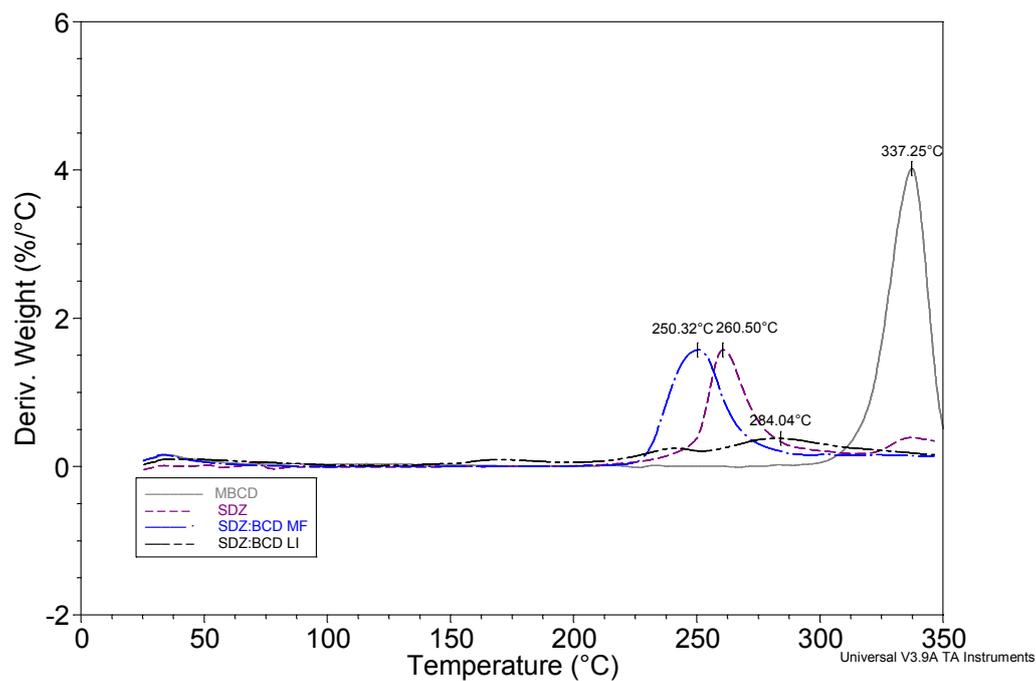


Figura 2.6.C. Análisis térmico, DTG, de SDZ, MβCD y los sistemas SDZ:MβCD.

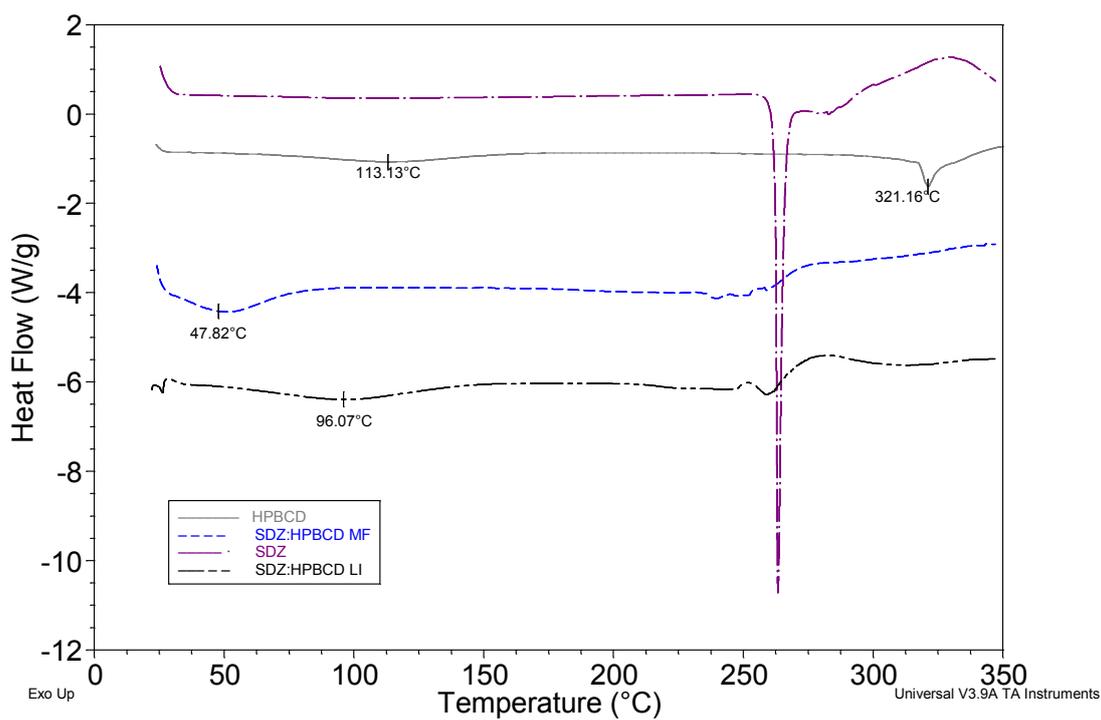


Figura 2.7.A. Análisis térmico, DSC, de SDZ, HPβCD y los sistemas SDZ:HPβCD.

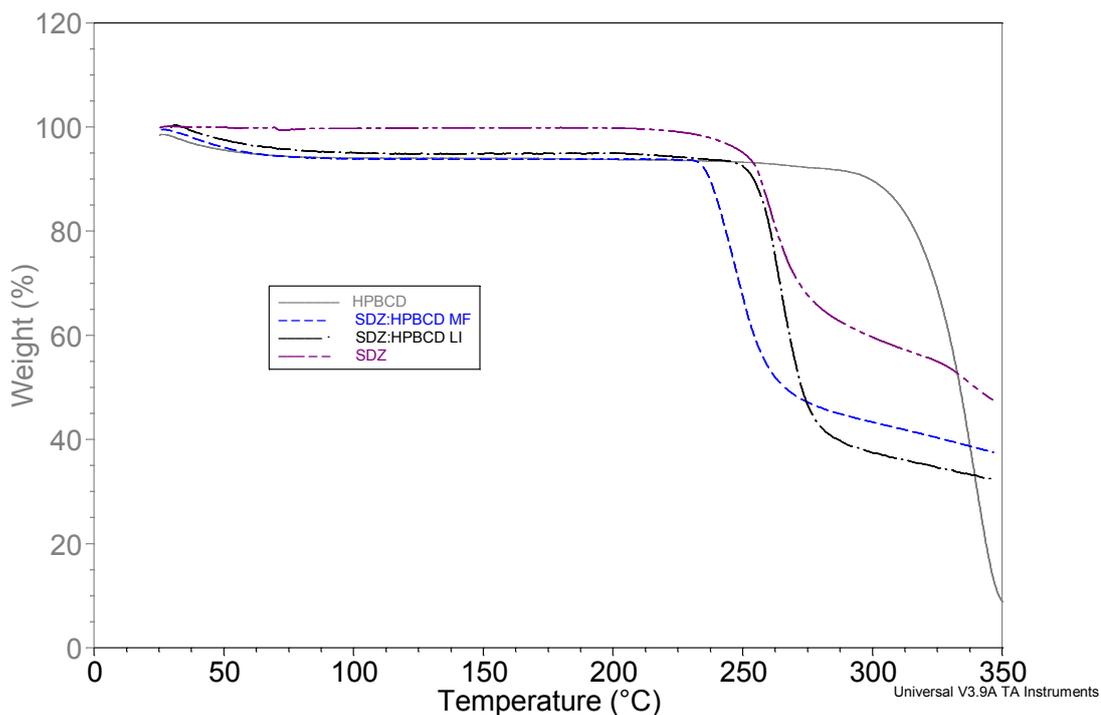


Figura 2.7.B. Análisis térmico, ATG, de SDZ, HP β CD y los sistemas SDZ:HP β CD.

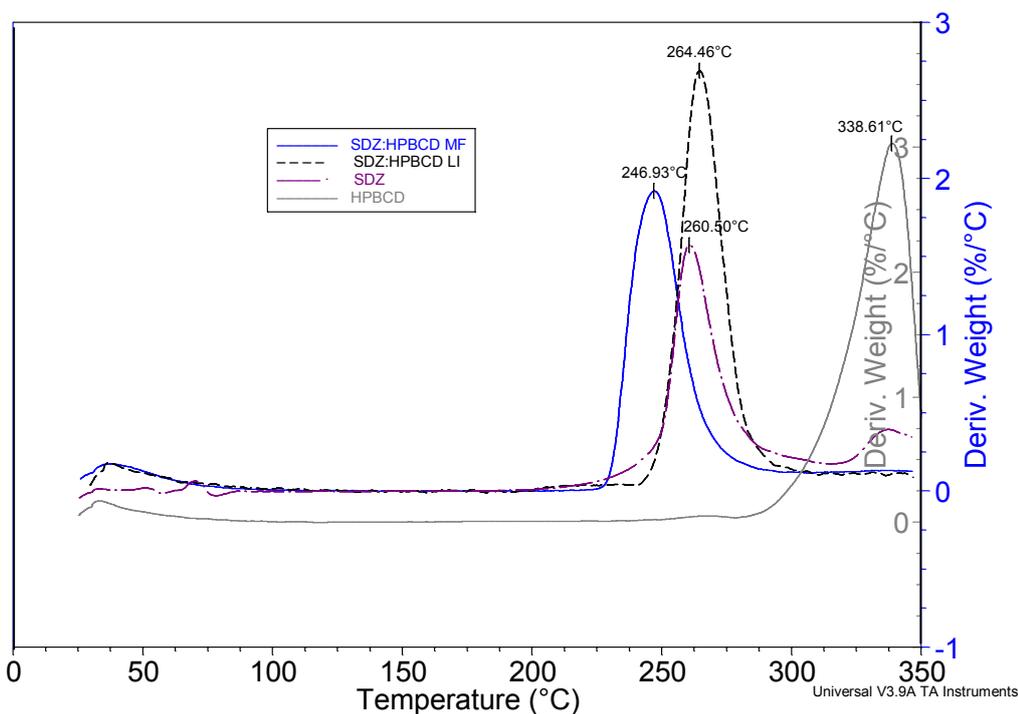


Figura 2.7.C. Análisis térmico, DTG, de SDZ, HP β CD y los sistemas SDZ:HP β CD.

Cuando se analizaron los perfiles térmicos de las MF de los sistemas SDZ: β CD y SDZ:M β CD [Figuras 2.5 y 2.6 (línea azul), respectivamente], se vió que fueron similares a los de los compuestos individuales superpuestos, esto indicó que con la aplicación de

este método no se obtuvo una interacción entre los componentes, ya que el IFA se mantuvo básicamente en su forma cristalina original. Una excepción a este comportamiento fue el sistema SDZ:HP β CD [Figura 2.7 (línea azul)] en el cual, no se observó el evento endotérmico correspondiente al punto de fusión de la SDZ. Se presentaron, en todos los casos, un evento endotérmico correspondiente a la deshidratación de las CDs (β CD pico máximo a 109,04°C; M β CD a 99,65°C y HP β CD a 47,82°C), un evento endotérmico atribuible al punto de fusión de la SDZ (253,15°C para el sistema con β CD y 248,10°C con M β CD) y luego descomposición, que se corroboró por pérdida de masa en el ATG.

En los perfiles térmicos de los tres sistemas obtenidos por la técnica de LI, no se observó el evento endotérmico correspondiente al punto de fusión de la SDZ; además presentaron un evento endotérmico, atribuible a la deshidratación de las CDs, a menor temperatura con respecto a los correspondientes compuestos puros y las MFs, a excepción de SDZ:HP β CD MF (para el sistema con β CD a 85,18°C, con M β CD a 76,91°C y con HP β CD a 96,07°C). Esto pudo deberse a una interacción débil de las moléculas de agua con las CDs, como consecuencia de la interacción con la SDZ. La mayor pérdida de masa obtenida, por observación de la curva de DTG, fue para SDZ pura a una temperatura de 260,50°C, mientras que para SDZ: β CD a 284,04°C, para SDZ:M β CD a 307,18°C y para SDZ:HP β CD a 264,46°C. Estos eventos pueden ser consecuencia de la formación de un nuevo compuesto, que da como resultado un aumento de la estabilidad térmica del IFA debido a la interacción con las CDs.

En base a los resultados obtenidos, se pudo sugerir la formación de un complejo de inclusión y/o una nueva fase amorfa, ya que analizando las curvas obtenidas por DSC, se observó la desaparición de la endoterma de fusión de SDZ.

Cuando se analizó la curva obtenida por DSC para el sistema SDZ: β CD SD (Figura 2.5A), se observó la desaparición de los eventos característicos de SDZ, lo que nos indicó que no se produjo la fusión de la misma, comportamiento que pudo atribuirse, como se comentó anteriormente, a la formación de un nuevo complejo de inclusión y/o una fase amorfa. En el sistema obtenido por CO, la curva de DSC (Figura 2.5A) presentó el pico de fusión de SDZ levemente desplazado, a una temperatura de 259,86°C y el evento de deshidratación térmica a menor temperatura (76,81°C) con respecto a la β CD, indicando una débil interacción del IFA con la β CD en este tipo de sistema.

2.3.1.2 Difracción de Rayos X

Los difractogramas de Rayos X de los complejos binarios, obtenidos con las diferentes CDs, se muestran en las Figuras 2.8, 2.9 y 2.10.

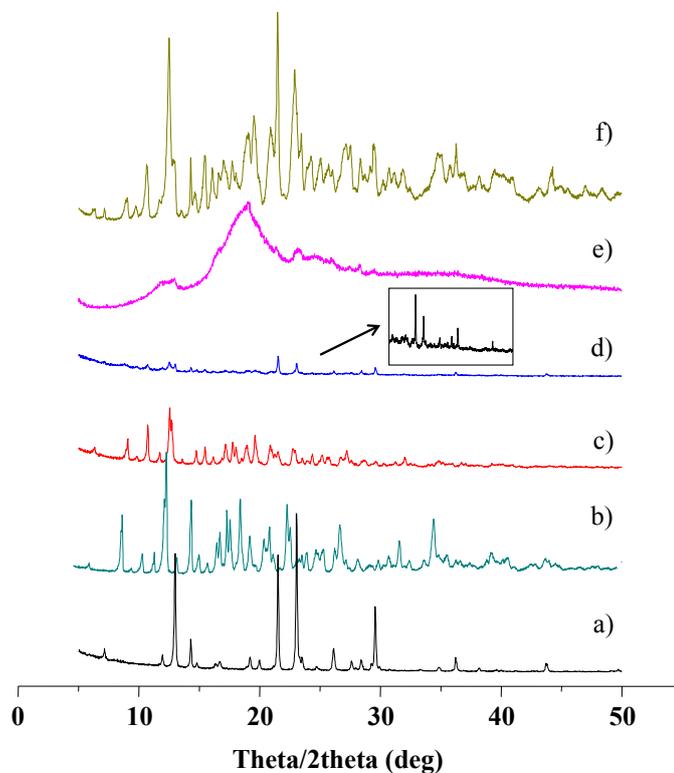


Figura 2.8. Patrones de difracción de Rayos X donde, a) SDZ, b) β CD, c) SDZ: β CD MF, d) SDZ: β CD LI, e) SDZ: β CD SD y f) SDZ: β CD CO.

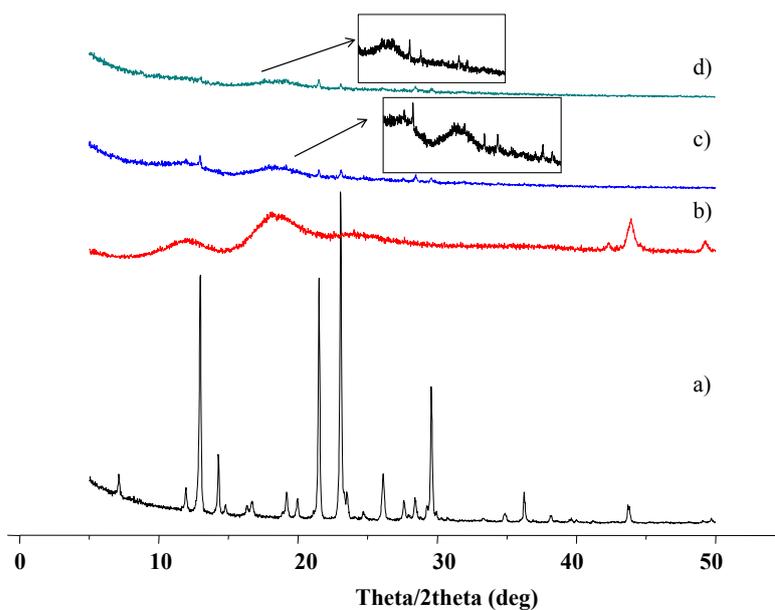


Figura 2.9. Patrones de difracción de Rayos X donde, a) SDZ, b) M β CD, c) M β CD:SDZ MF y d) M β CD:SDZ LI.

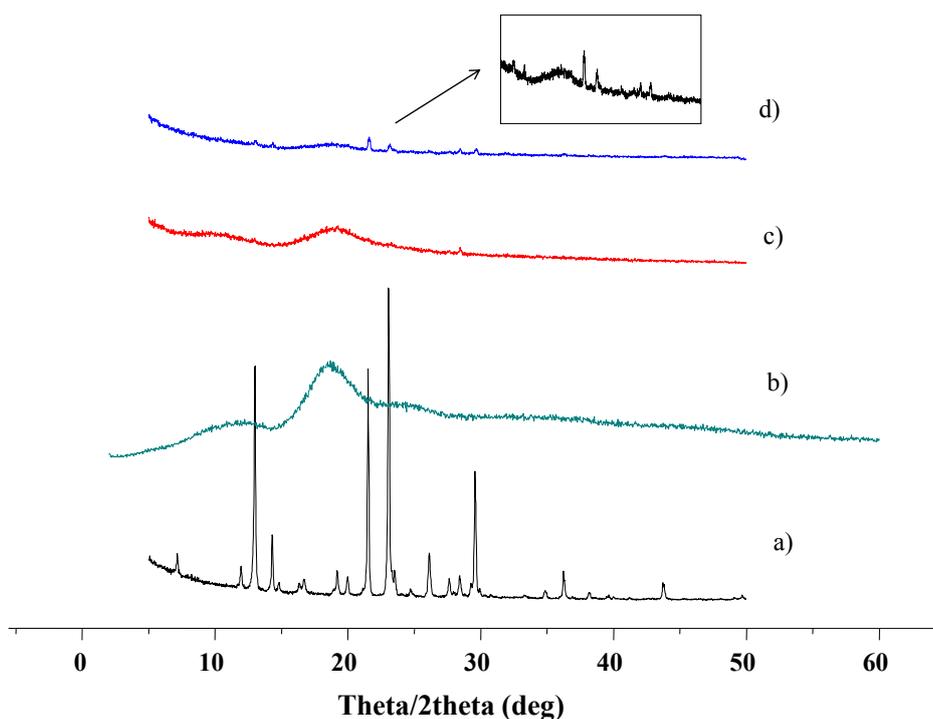


Figura 2.10. Patrones de difracción de Rayos X donde, a) SDZ, b) HP β CD, c) HP β CD:SDZ MF y d) HP β CD:SDZ LI.

El difractograma de SDZ (Figuras 2.8a, 2.9a, 2.10a) exhibió una serie de picos intensos y agudos, en los siguientes ángulos de difracción (2θ): 7,2; 11,9; 13,0; 14,3; 16,7; 19,2; 21,5; 23,0; 23,5; 26,1; 29,5; 36,2 y 43,7°, lo que demostró la naturaleza cristalina del IFA.²

Por su parte, en el patrón de difracción de la β CD (Figura 2.8b) se observó una serie de picos de difracción, los cuales son indicativos de su carácter cristalino, a los siguientes ángulos de difracción (2θ): 9,0; 10,9; 12,5; 12,7; 14,7; 17,7; 19,8; 22,7; 24,5; 27,0; 32,0 y 34,8°, los cuales son coincidentes con datos de literatura.⁸

Para el sistema SDZ: β CD preparado por MF y CO (Figuras 2.8c y 2.8f, respectivamente), se observó la presencia de los picos característicos de SDZ y β CD en los difractogramas, aunque con una diferencia en la intensidad (evidenciada por la altura de los picos) comparado con los compuestos puros, probablemente, debido a la diferencia en la composición (se comparan las sustancias puras SDZ y β CD, con respecto a los sistemas obtenidos por MF y CO, donde están presentes los dos componentes con patrones de difracción diferentes).

Por el contrario, cuando el sistema SDZ: β CD se preparó por la técnica de LI (Figura 2.8d), se observó una disminución del grado de cristalinidad, a pesar de que algunos picos

de SDZ fueron detectados. Finalmente, una total amorfización se observó para el sistema preparado por SD (Figura 2.8e).

La desaparición de algunos picos de SDZ podría indicar la existencia de una nueva fase sólida, con un menor grado de cristalinidad comparado con los componentes puros.

El patrón de difracción de M β CD (Figura 2.9b) reveló que es una sustancia amorfa. En el caso del sistema SDZ:M β CD preparado por MF y LI, fue posible observar una disminución en el grado de cristalinidad del IFA, debido en parte, al estado amorfo que presenta la M β CD.

El difractograma que se obtuvo para HP β CD (Figura 2.10b) reveló, al igual que para M β CD, que es una sustancia amorfa. Analizando los patrones de difracción de los sistemas SDZ:HP β CD (Figuras 2.10 c y d), se observó una disminución en el grado de cristalinidad, con ambos métodos (LI y MF), pudiéndose atribuir a la estructura amorfa de la HP β CD y a los procesos realizados, evidenciado también por la ausencia de algunos picos característicos de SDZ. Estos resultados podrían indicar que SDZ ya no estaría presente como un material cristalino cuando interactúa con esta CD, existiendo ahora en estado amorfo.

Los resultados obtenidos por DSC y por DRX, revelaron la producción de un estado de baja cristalinidad en los sistemas SDZ:CDs preparados por LI (en el caso particular de la β CD también por la técnica de SD, y de la HP β CD por MF); como consecuencia de la interacción huésped-receptor, indicando así, la posible formación de un complejo de inclusión en estado sólido.⁸

2.3.1.3 Espectroscopía IR (FT-IR)

La porción intermedia del espectro, entre 1300 y 909 cm^{-1} , se denomina generalmente “huella digital”. El modelo de absorción en esta región es frecuentemente complejo y resulta único para cada especie molecular. Esta porción del espectro es de suma utilidad cuando se examina con referencia a otras regiones.

Los espectros FT-IR de los componentes puros y de los diferentes sistemas se muestran en las Figuras 2.11, 2.12 y 2.13 (gráficos ampliados, ver Anexo 5).

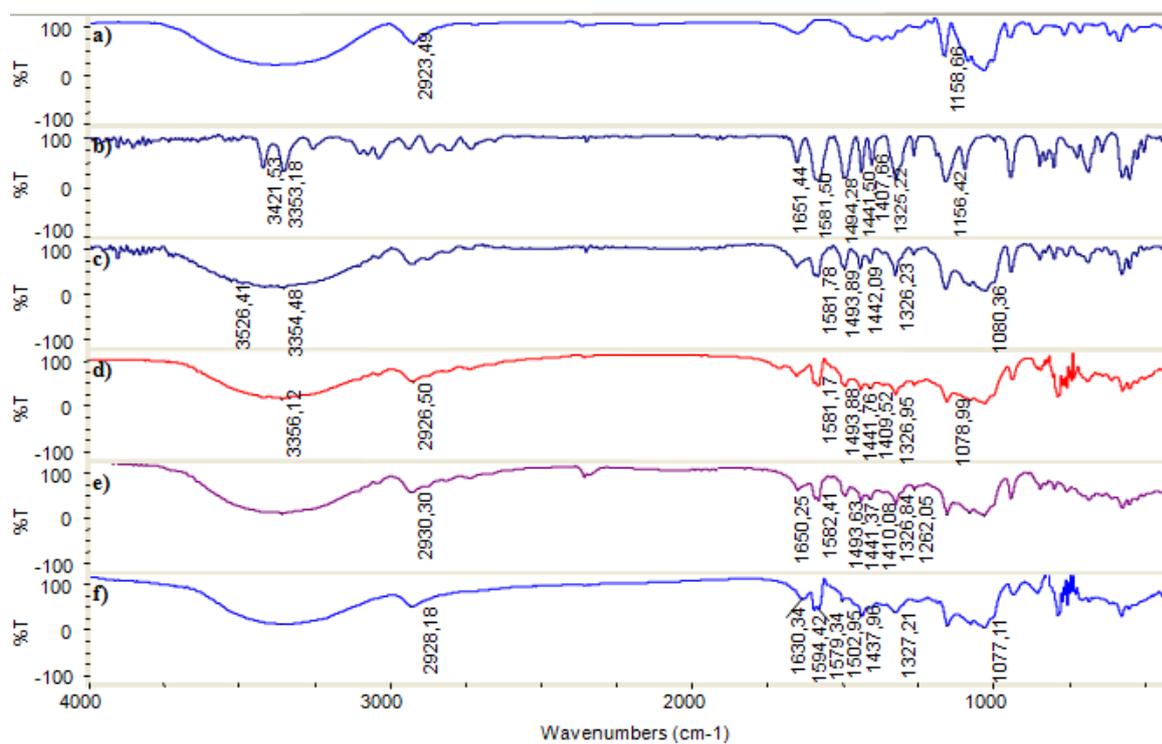


Figura 2.11. Espectro IR donde a) β CD, b) SDZ, c) SDZ: β CD MF, d) SDZ: β CD CO, e) SDZ: β CD LI, f) SDZ: β CD SD.

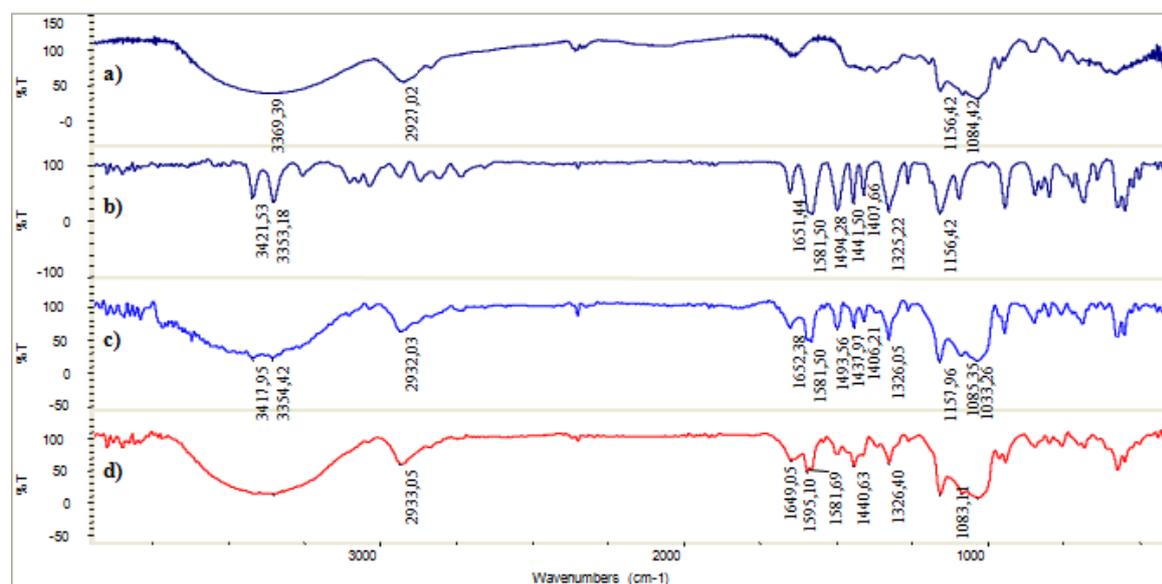


Figura 2.12. Espectro IR donde a) M β CD, b) SDZ, c) SDZ:M β CD MF, d) SDZ:M β CD LI.

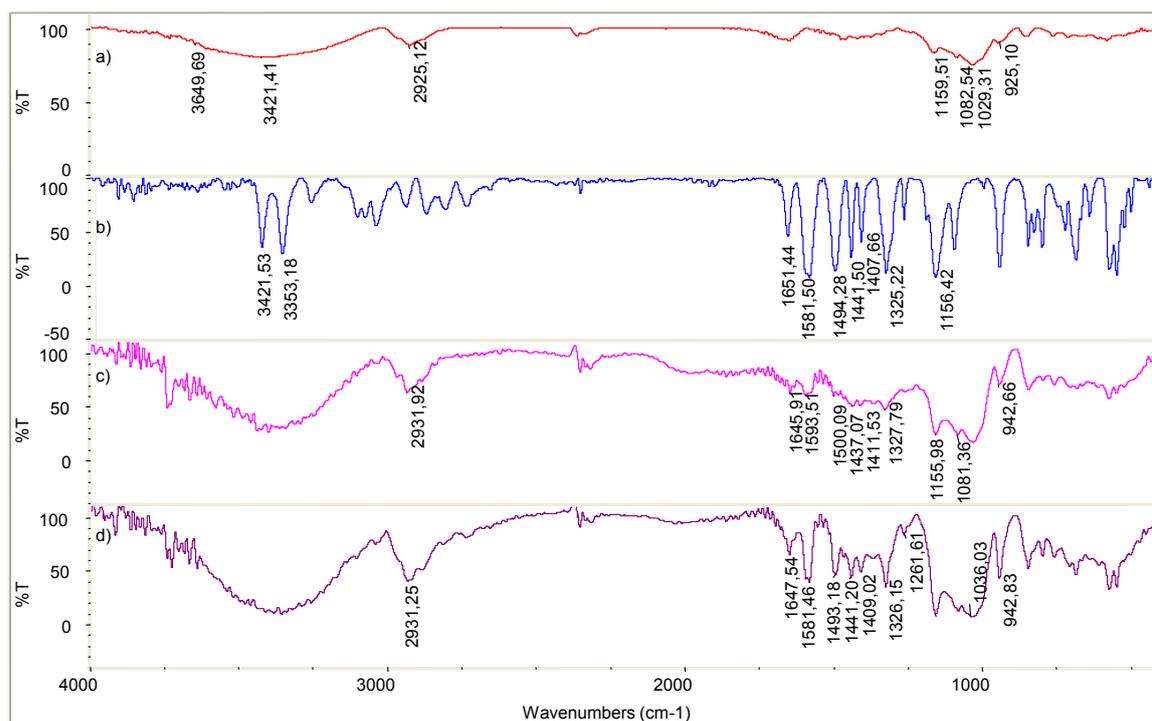


Figura 2.13. Espectro IR donde a) HPβCD, b) SDZ, c) SDZ:HPβCD MF, d) SDZ:HPβCD LI.

Se observó, en los espectros de FT-IR, que la SDZ (Figuras 2.11, 2.12 y 2.13) presentó bandas características a 3421,53 y 3353,18 cm⁻¹ debido a la tensión simétrica del -NH; entre 1581,50, 1494,29, 1441,50 y 1407,66 cm⁻¹, correspondientes a las vibraciones del esqueleto del anillo aromático A (ver imagen SDZ, Anexo 3), a 1651,44 cm⁻¹ por deformación del grupo -NH₂; a 1325,22 cm⁻¹ y a 1156,42 cm⁻¹ por la tensión asimétrica, y simétrica del -SO₂, respectivamente.¹⁴ Mientras que las CDs se caracterizan por poseer bandas intensas de absorción entre 3500 y 3300 cm⁻¹, asociadas a los grupos -OH de la macromolécula, las vibraciones de los grupos -CH y -CH₂ aparecen en la región 2800–2950 cm⁻¹, como así también las bandas entre 1160 y 1030 cm⁻¹ se atribuyen a las vibraciones de estiramiento de los grupos -OH primarios y secundarios.¹⁸ La región espectral de 4000 a 3000 cm⁻¹ es difícil de analizar para las CDs y los sistemas en donde están presentes, debido a los grupos -OH primarios/secundarios de las CDs y a las moléculas de agua.¹⁹

Cuando se analizaron los espectros de todos los sistemas, se vió que en ningún caso hubo aparición de nuevas bandas, esto indicó que no se produjeron nuevos enlaces químicos por interacción entre los componentes.

Las bandas presentes en los sistemas obtenidos por la técnica de MF con β CD y M β CD, mostraron la superposición de las señales (aunque levemente desplazadas), correspondientes a los componentes individuales, sugiriendo la ausencia de interacciones. En el caso de los sistemas elaborados entre SDZ y β CD por LI y CO, se observaron modificaciones de las diferentes bandas pero de manera leve, en cambio, para el caso de SDZ:M β CD LI y SDZ: β CD SD, se observó un mayor desplazamiento y además, una disminución de la intensidad de las bandas, con respecto a los demás sistemas. Por esta razón, se puede concluir que se observó una modificación de los espectros cuando se los comparó con el IFA puro, reducción de la intensidad, ensanchamiento en el sistema utilizando M β CD, por la técnica de LI, de la banda correspondiente al $-\text{NH}_2$, y desdoblamiento de la banda a $1581,22 \text{ cm}^{-1}$ (atribuida a las vibraciones del anillo aromático A de la SDZ), lo que podría indicar restricción de las vibraciones debido a la inclusión de estos grupos funcionales del huésped, dentro de la cavidad de las CDs.

Para SDZ:HP β CD, se observó una modificación de los espectros al compararlos con SDZ pura, tanto en los sistemas preparados por simple MF, como por LI, en las señales a $1580, 1490, 1440$ y 1410 cm^{-1} , correspondientes a las vibraciones del esqueleto del anillo A y a 1650 cm^{-1} a la deformación de $-\text{NH}_2$ que, como se dijo anteriormente, podría indicar restricción de las vibraciones del anillo aromático A del huésped, dentro de la cavidad de las CDs y del grupo $-\text{NH}_2$. Estos resultados concuerdan con lo concluido a partir de la técnica de 2D ROESY, reportado en la Parte 1 del actual capítulo.

La formación de complejos puede ser demostrada por espectroscopia IR sólo en algunos casos, este método es de uso limitado en la investigación de complejos de inclusión con CDs. Las bandas características de las CDs, que representan la mayor parte del complejo, son escasamente influenciadas por la formación de complejos. Las bandas debidas a la parte incluida de la molécula huésped generalmente se desplazan o sus intensidades se alteran, pero, puesto que la masa de la molécula huésped no excede de 5-15% de la masa del complejo, estas alteraciones son generalmente ocultas por el espectro de la CD.¹¹

2.3.1.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las microfotografías obtenidas a partir del IFA puro y de los diferentes sistemas, podrían confirmar la obtención de un nuevo material.²⁰

Las microfotografías representativas de los componentes puros y de sus sistemas elaborados por las diferentes técnicas se muestran en la Figura 2.14.

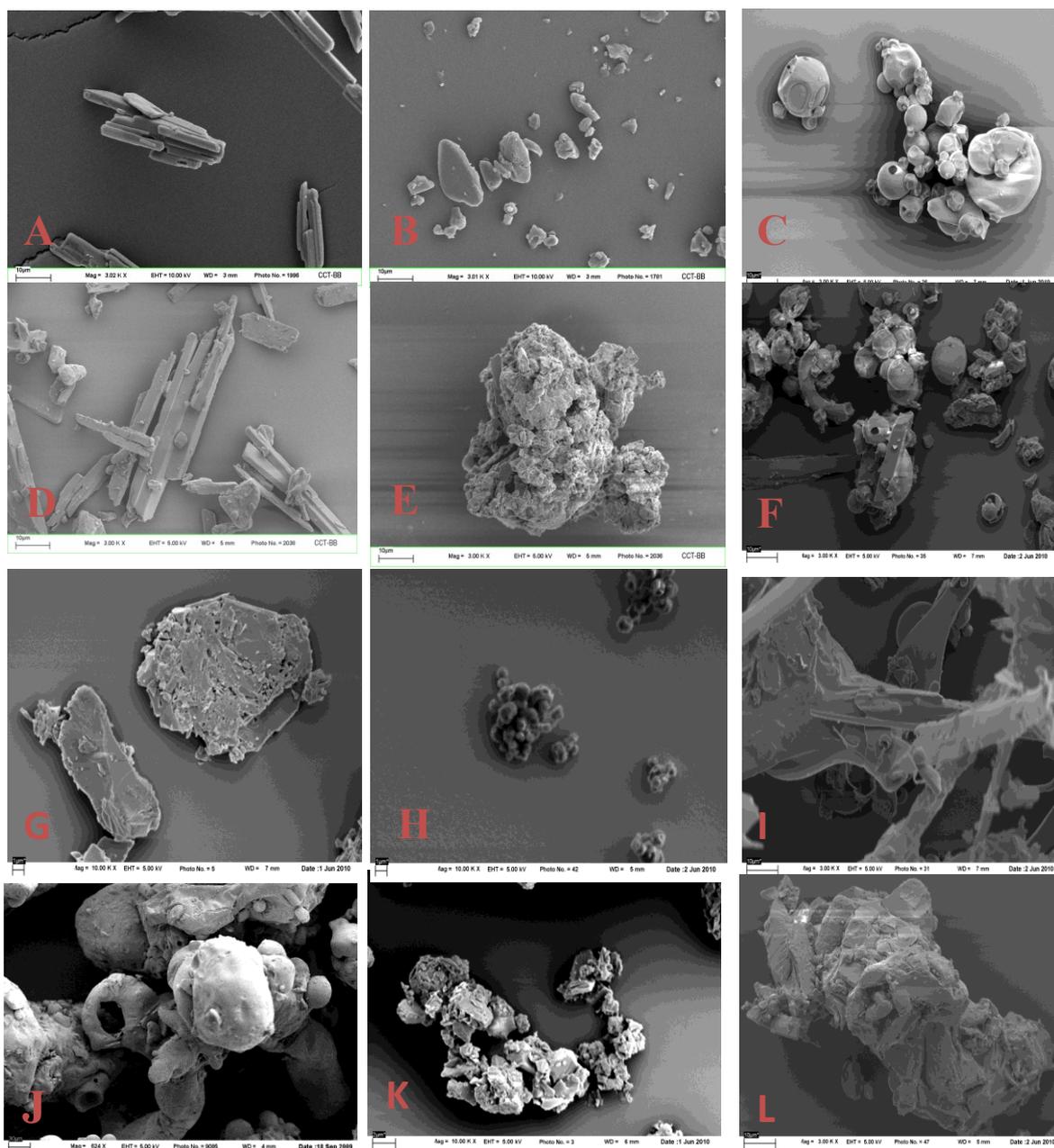


Figura 2.14. Microfotografías SEM de SDZ, 3000X (A); β CD, 3000X (B); M β CD, 3000X (C); SDZ: β CD MF, 3000X (D); SDZ: β CD LI, 3000X (E); SDZ:M β CD MF, 3000X (F); SDZ: β CD CO, 10000X (G); SDZ: β CD SD, 10000X (H); SDZ:M β CD LI, 3000X (I); HP β CD, 624X (J); SDZ:HP β CD MF, 10000X (K); SDZ:HP β CD LI, 5000X (L).

Cuando se analizaron las microfotografías obtenidas por SEM, para los diferentes materiales puros, se observó que la β CD (Figura 2.14B) se presenta como partículas con forma de paralelogramo, mientras que la SDZ (Figura 2.14A) como cristales rectangulares de tamaños irregulares, la M β CD (Figura 2.14C) como partículas esféricas

con características amorfas y por último, la evaluación morfológica de HP β CD (Figura 2.14J) reveló la presencia de partículas esféricas huecas de diferentes tamaños.

Se realizó también, la microfotografía de la SDZ LI, para visualizar su estructura (Figura 2.15), la misma se presentó, al igual que la SDZ sin procesar, como cristales rectangulares de tamaños irregulares.

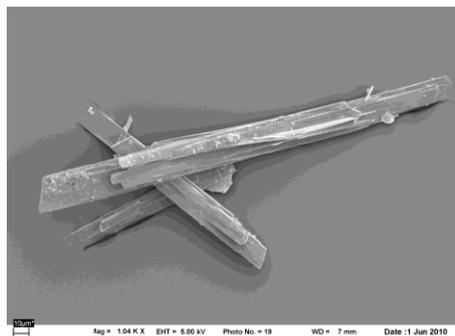


Figura 2.15. Microfotografía de SDZ tras el proceso de liofilizado.

En los sistemas SDZ: β CD y SDZ:M β CD MF (Figuras 2.14D y 2.14F, respectivamente) se detectó la presencia del principio activo embebido con las CDs, con una morfología semejante a la de los compuestos tomados por separado, revelando una no interacción entre ambas especies. Por su parte, en las microfotografías de los sistemas SDZ: β CD y SDZ:M β CD obtenidos por LI (Figuras 2.14E y 2.14I, respectivamente), se observaron cambios en la morfología de las partículas y en la homogeneidad de los productos obtenidos, mostrando una clara diferencia con el estado cristalino de los componentes puros, pudiéndose así plantear una interacción en el estado sólido.

En el complejo de SDZ: β CD obtenido por SD (Figura 2.14H), la morfología original de los compuestos desapareció, no fue posible diferenciar los mismos, ya que el sistema se presentó como agregados amorfos y homogéneos de partículas esféricas, el cual es un aspecto típico atribuido a este tipo de sistemas.^{8,21} En el sistema SDZ: β CD obtenido por CO (Figura 2.14G, Anexo 5), se observaron partículas de β CD y SDZ, con una morfología semejante a los compuestos individuales, pero además, se presentaron partículas cuya morfología no se correspondía con ambas especies, pudiéndose pensar que hubo una interacción incompleta entre los componentes.

En las microfotografías de los sistemas con la HP β CD (Figuras 2.14K y 2.14L), se observó un cambio de morfología de las partículas de los complejos formados, tanto por MF como por LI, revelando una interacción entre SDZ e HP β CD en el estado sólido de ambos sistemas.

Las microfotografías de SEM nos permiten concluir que los cambios notables de tamaño y aspecto de las partículas, observados en la morfología de los complejos SDZ: β CD obtenidos por SD y LI, como también para los sistemas SDZ:M β CD LI y SDZ:HP β CD LI y MF, podrían ser indicativos de la formación de una nueva fase sólida.

2.3.2 Sistemas Ternarios

Para la formación de los sistemas ternarios, en estado sólido, se utilizaron las técnicas de MF, LI y CO, que al igual que los sistemas binarios, se presentaron como polvos blancos, eligiendo solamente a la β CD para su formación; esta decisión se basó en lo expresado a lo largo de ambas partes de este capítulo.

En el desarrollo de esta sección, se optó por presentar solo figuras representativas de los complejos ternarios, eligiendo al sistema SDZ: β CD:GLI; las demás, correspondientes a la caracterización del resto de los sistemas, se presentan en el Anexo 5.

2.3.2.1 Análisis Térmico

Las curvas de DSC, ATG y DTG de SDZ, β CD, GLI y sus sistemas ternarios producidos por MF, CO y LI, se observan en la Figura 2.16. Las curvas térmicas de SDZ y β CD fueron analizadas previamente (ver ítem 2.3.1.1).

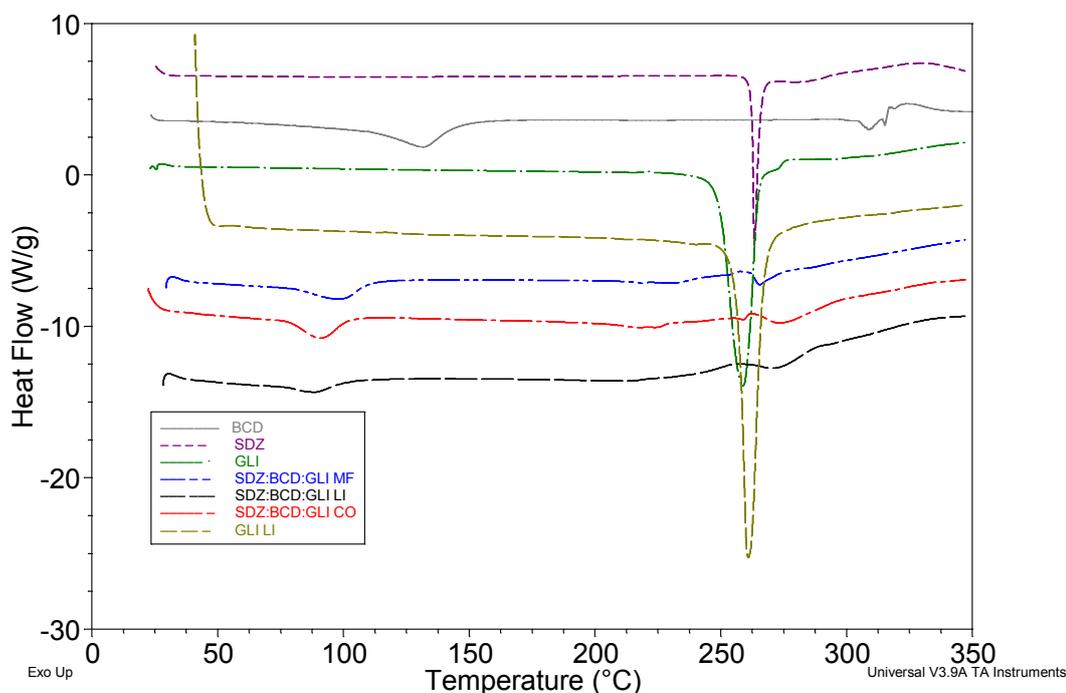


Figura 2.16.A. Análisis térmico, DSC, de SDZ, β CD y los sistemas ternarios SDZ: β CD:GLI preparados con las distintas técnicas.

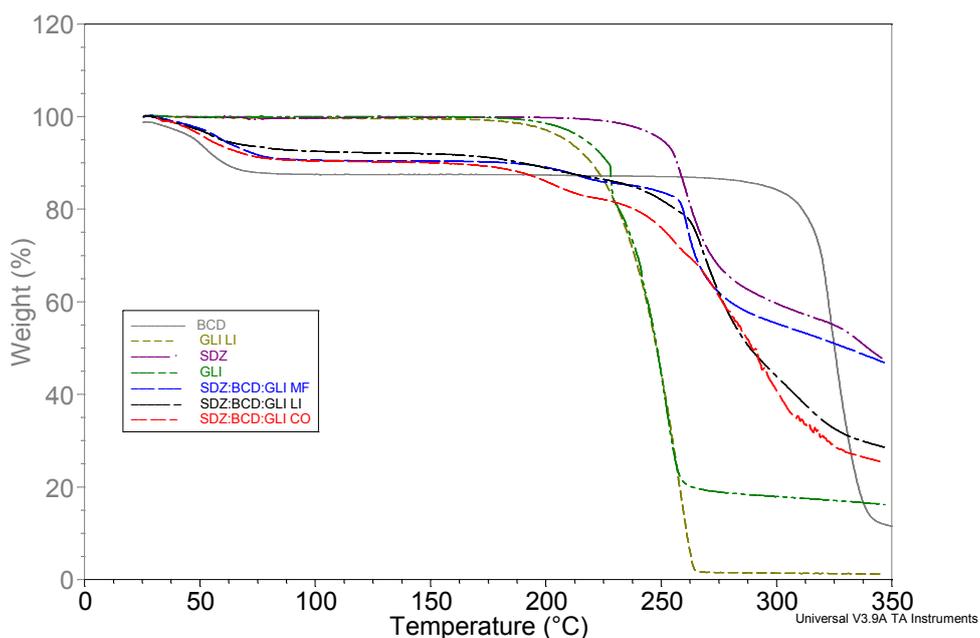


Figura 2.16.B. Análisis térmico, ATG, de SDZ, β CD y los sistemas ternarios SDZ: β CD:GLI preparados con las distintas técnicas.

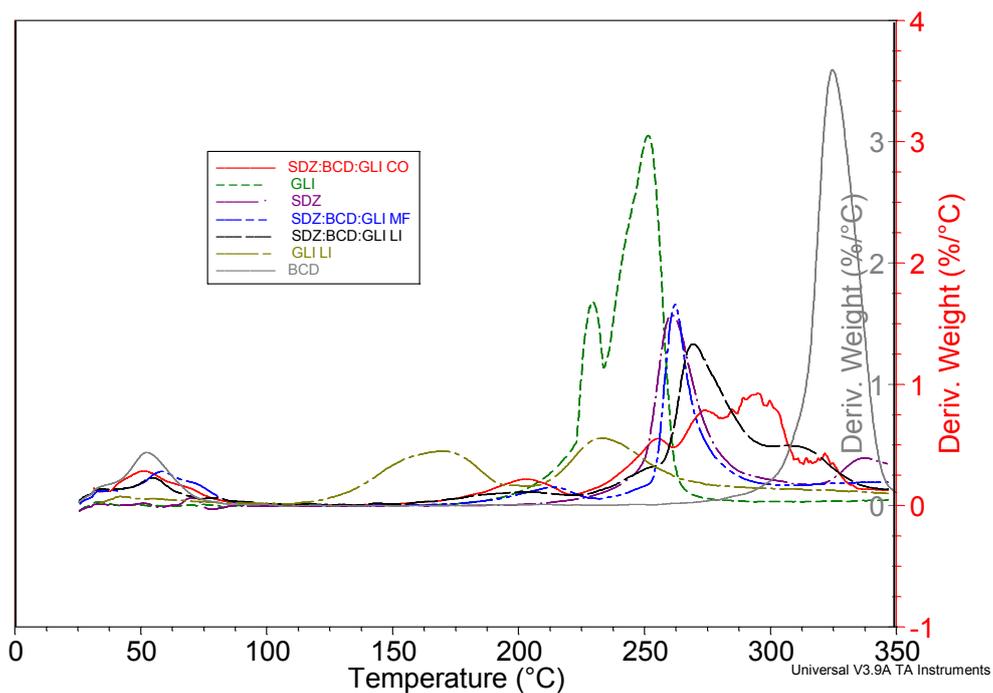


Figura 2.16.C. Análisis térmico, DTG, de SDZ, β CD y los sistemas ternarios SDZ: β CD:GLI preparados con las distintas técnicas.

Analizando la curva de DSC de la GLI, se observó un evento endotérmico a 258,57°C (935,95 J/g), atribuible a la fusión de la misma, seguido de un evento exotérmico asignable a la descomposición térmica, evento que se corroboró analizando la curva de ATG, la cual presentó una pérdida de masa a similar temperatura. Con respecto a

los demás AAs, se presenta una tabla a continuación (Tabla 2.1), con el resumen de los eventos endo/exotérmicos ocurridos a las temperaturas de estudio, analizando los DSC, ATG y DTG de los mismos en su conjunto.

Cuando se analizaron las curvas de DSC, ATG Y DGT de los sistemas SDZ: β CD:AAs elaborados por simple MF, se observaron los eventos térmicos que se encontraron para los compuestos puros, lo que podría indicar que solo contienen las especies libres, por lo tanto no hubo formación de complejos; a excepción del sistema SDZ: β CD:ARG MF, en el que fue imperceptible la visualización del evento endotérmico atribuible a la fusión del IFA.

Por otro lado, en las curvas de DSC, de los productos elaborados por CO entre la SDZ, la β CD y los AAs: ARG, GLI, ASP y LEU desapareció el punto de fusión de SDZ. Se presentó además, el pico endotérmico atribuible a la deshidratación de la β CD a menores temperaturas, comparado con la CD pura, pudiendo asignarse este hecho a una débil interacción de las moléculas de agua con la β CD debido a una mejor integración de la misma con la SDZ y/o los AAs. Para el sistema SDZ: β CD:GLU obtenido por CO, se observó en la curva de DSC, un evento endotérmico correspondiente al punto de fusión de GLU, lo que podría atribuirse a un exceso de este en este sistema.

Debido a que por DTG se observa un desplazamiento a mayores temperaturas del pico donde se produce la mayor degradación de los sistemas obtenidos por CO y LI (incluido el sistema SDZ: β CD:ARG MF), con respecto a SDZ, se pudo sugerir que hay un aumento en la estabilidad térmica del IFA por la interacción con la CD y los AAs.

Por otro lado, en las curvas de DSC se observó la desaparición del evento endotérmico, atribuible a la fusión de SDZ en todos los sistemas obtenidos por LI, lo que sugirió la formación de verdaderos complejos de inclusión ternarios por este método.

Tabla 2.1. Datos de las temperaturas (T) correspondientes a los distintos eventos endo/exotérmicos de los compuestos puros y los sistemas ternarios obtenidos de las curvas de DSC, ATG y DTG (Anexo 5, presentación de las Figuras).

Compuesto o Sistema	Curvas DSC		Curvas ATG/DTG
	T (°C) (fusión)	T (°C) deshidratación	T (DTG)(°C)
SDZ	263,21	-----	260,5
βCD	-----	131,41	52,42/ 324,29
GLI	258,57		251,68
GLI LI	260,81		208,78/243,30
SDZ:BCD:GLI MF	265,48	97,54	58,39/231,76/262,16
SDZ:BCD:GLI CO	-----	90,87	51,02/201,80/295,19
SDZ:BCD:GLI LI	-----	87,79	54,67/201,80/268,70
LEU	290,41 (967,7 J/g)	----	251,08
LEU LI	285,03 (484,6 J/g)	-----	250,29
SDZ:BCD:LEU MF	266,04	78,88	62,17/214,69/260,84
SDZ:BCD:LEU CO	-----	88,52	59,17/210,81/273,73
SDZ:BCD:LEU LI	-----	67,23	55,39/203,52/272,96
GLU	208,23	-----	198,86/260,77
GLU LI	208,04		168,40/233,63
SDZ:BCD:GLU MF	212,34/260,81	77,04	66,15/218,46/256,81
SDZ:BCD:GLU CO	211,52	99,51	77,63/208,19/285,38
SDZ:BCD:GLU LI	-----	68,25	67,30/317
ASP	260,42		249,84
ASP LI	256,61 (864,7 J/g)		256,20/313,93
SDZ:BCD:ASP MF	254,85	73,97	65,49/263,24
SDZ:BCD:ASP CO	-----	85,59	57,10/296,23
SDZ:BCD:ASP LI		79,20	53,51/313,87
ARG	220,19		264
ARG LI	238,47 (384 J/g)		242,67
SDZ:BCD:ARG MF	-----	80,41	53,44/303,03
SDZ:BCD:ARG CO	-----	81,54	67,53/294,44
SDZ:BCD:ARG LI	-----	86,19	64,30/321,15

A los eventos endotérmicos ocurridos a una temperatura distinta (ver Anexo 5), con respecto al punto de fusión de SDZ, se los puede atribuir a una parte del IFA no incluida o a un comienzo de descomposición de la nueva entidad.

2.3.2.2 Difracción de Rayos X

Los difractogramas de Rayos X para la SDZ, β CD, GLI y los sistemas ternarios se observan en la Figura 2.17.

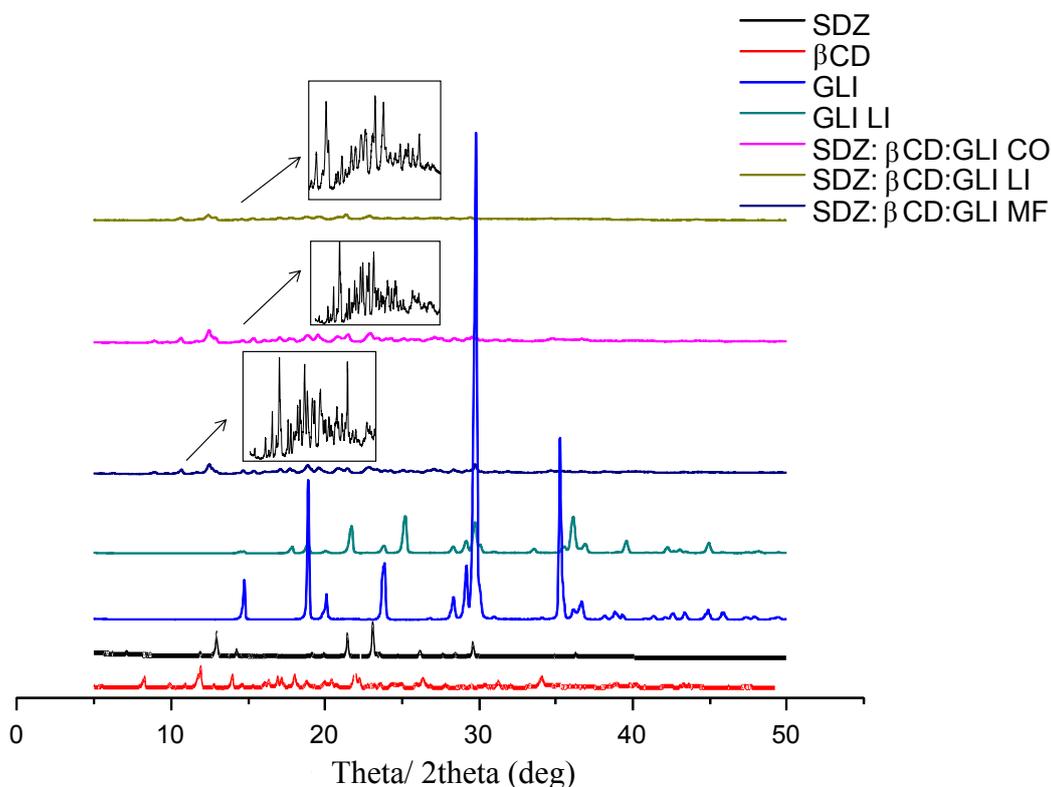


Figura 2.17. Patrones de difracción de Rayos X de β CD; SDZ y los sistemas SDZ: β CD:GLI.

El difractograma de SDZ exhibió una serie de picos agudos e intensos, donde se demostró la naturaleza cristalina del IFA, como así también de la β CD (tal como fueron analizados en la sección 2.3.1.2, complejos binarios).

Los diferentes AAs, antes y después del proceso de liofilizado, presentaron picos a distintos ángulos de difracción (2θ), lo que sugirió que los mismos se presentan como materiales cristalinos aún luego de ser liofilizados.

Fue posible observar la presencia de los picos de SDZ, β CD y de los AAs en los difractogramas para los sistemas SDZ: β CD:AAs formados por MF, aunque con una menor intensidad debido a la dilución de los materiales puros.

En todos los casos, los productos obtenidos por el proceso de LI y CO fueron cristalinos, algunos, como en el caso de ARG y GLU, con una disminución en el grado de cristalinidad comparado con los compuestos puros y con la aparición de un halo cuando se realizó el proceso de LI. Esto puede deberse a que los AAs puros presentan un patrón de cristalinidad diferente al obtenido luego del proceso de LI, aunque mantienen su naturaleza cristalina, como es el caso de la GLI, la cual es uno de los excipientes más comúnmente usados en formulaciones liofilizadas inyectables, en parte por sus propiedades favorables para el LI, ya que cristaliza durante el proceso. No obstante, el estado físico de glicina tiene un efecto sorprendente sobre su comportamiento durante el LI, los cambios aparentemente sutiles en las condiciones de formulación o liofilización pueden tener un impacto significativo sobre el estado físico y la aceptabilidad farmacéutica del sólido resultante.²²

Tanto los resultados obtenidos por DSC, como los de DRX (los cuales revelaron la producción de un estado distinto de cristalinidad), para los sistemas formados por SDZ, β CD y los diferentes AAs fueron producidos por el método de LI, indican la formación de una nueva fase sólida, como consecuencia de las interacciones de la molécula huésped, los AAs y el receptor (β CD).

2.3.2.3 Espectroscopía IR (FT-IR)

La variación en la forma, el corrimiento y/o la intensidad de las bandas de absorción en el IR del huésped o la CD, puede proporcionar información para verificar la formación de complejos de inclusión.^{23,24} Se examinó y comparó a la SDZ pura, la β CD y los AAs con los correspondientes sistemas ternarios elaborados por MF, CO y LI (Figura 2.18). Las bandas características de SDZ se mencionaron con anterioridad (Sección 2.3.1.3). Los AAs, en general, presentan una banda característica entre 3400-2000 cm^{-1} , generalmente intensa, ancha y muy estructurada correspondiente a las vibraciones de tensión del $-\text{NH}$ y $-\text{OH}$, así como entre 1660-1590 cm^{-1} y 1550-1480 cm^{-1} otras debidas a vibraciones de deformación asimétrica y simétrica del NH_3^+ , respectivamente; por último, presentan una banda entre 1760-1595 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de tensión asimétrica del $-\text{COO}^-$.²⁵

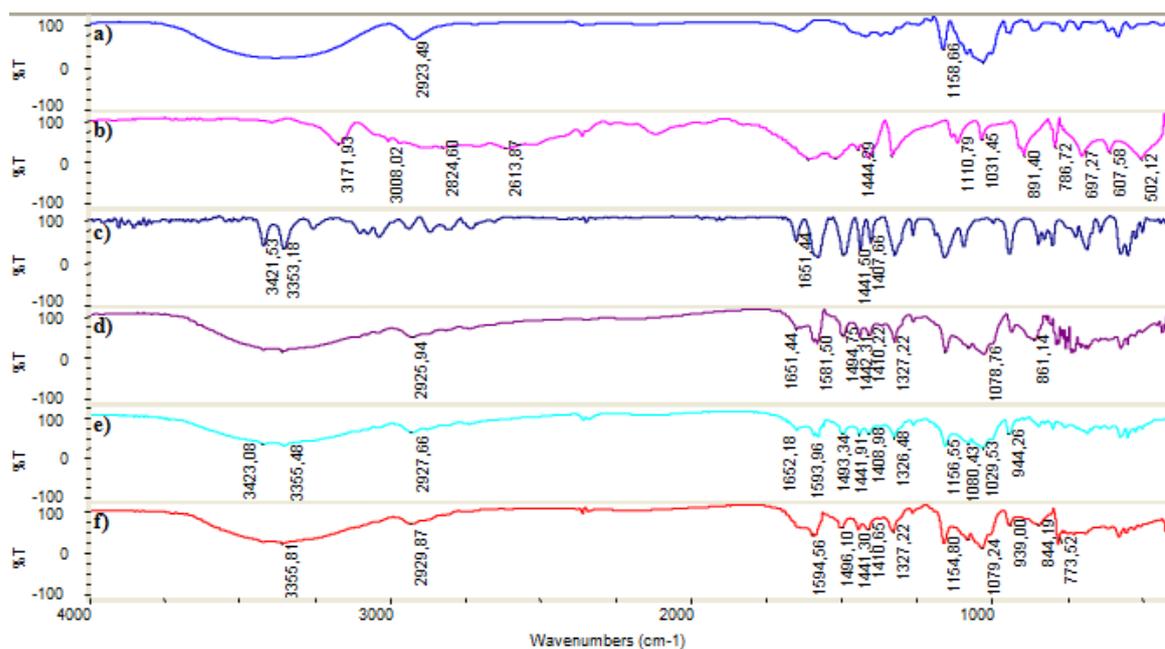


Figura 2.18. Espectro IR donde a) β CD, b) GLI, c) SDZ, d) SDZ: β CD.GLI MF, e) SDZ: β CD:GLI CO y f) SDZ: β CD:GLI LI.

Cuando se analizaron los espectros FT-IR se observó, para los sistemas elaborados por MF, un espectro similar a los de los compuestos individuales superpuestos, como también ocurrió en el caso de los sistemas SDZ: β CD:GLU y SDZ: β CD:ASP obtenidos por CO.

Analizando los espectros IR de SDZ en el sistema con β CD y GLI, se observó un desdoblamiento del pico a 1580 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones del esqueleto del anillo aromático A de SDZ, para los sistemas formados por LI y CO, como así también disminución de la intensidad y pérdida de algunos picos característicos (como es el caso del atribuido a las vibraciones del $-\text{NH}_2$), al igual que para los sistemas SDZ: β CD:ARG elaborados por MF, CO y LI; para SDZ: β CD:LEU elaborados por CO y LI y para SDZ: β CD:GLU y SDZ: β CD:ASP por LI únicamente. Esto podría indicar una restricción de las vibraciones del anillo aromático y del grupo- NH_2 de SDZ dentro de la cavidad de la β CD. Los cambios en las bandas características de SDZ, producidos en los sistemas anteriormente nombrados, podrían confirmar la formación de un complejo en estado sólido.

2.3.2.4 Microscopía electrónica de barrido

En la Figura 2.19, se muestran las microfotografías de SDZ, β CD, GLI y los diferentes complejos ternarios obtenidos por LI; MF y CO (Demás sistemas, Anexo 5).

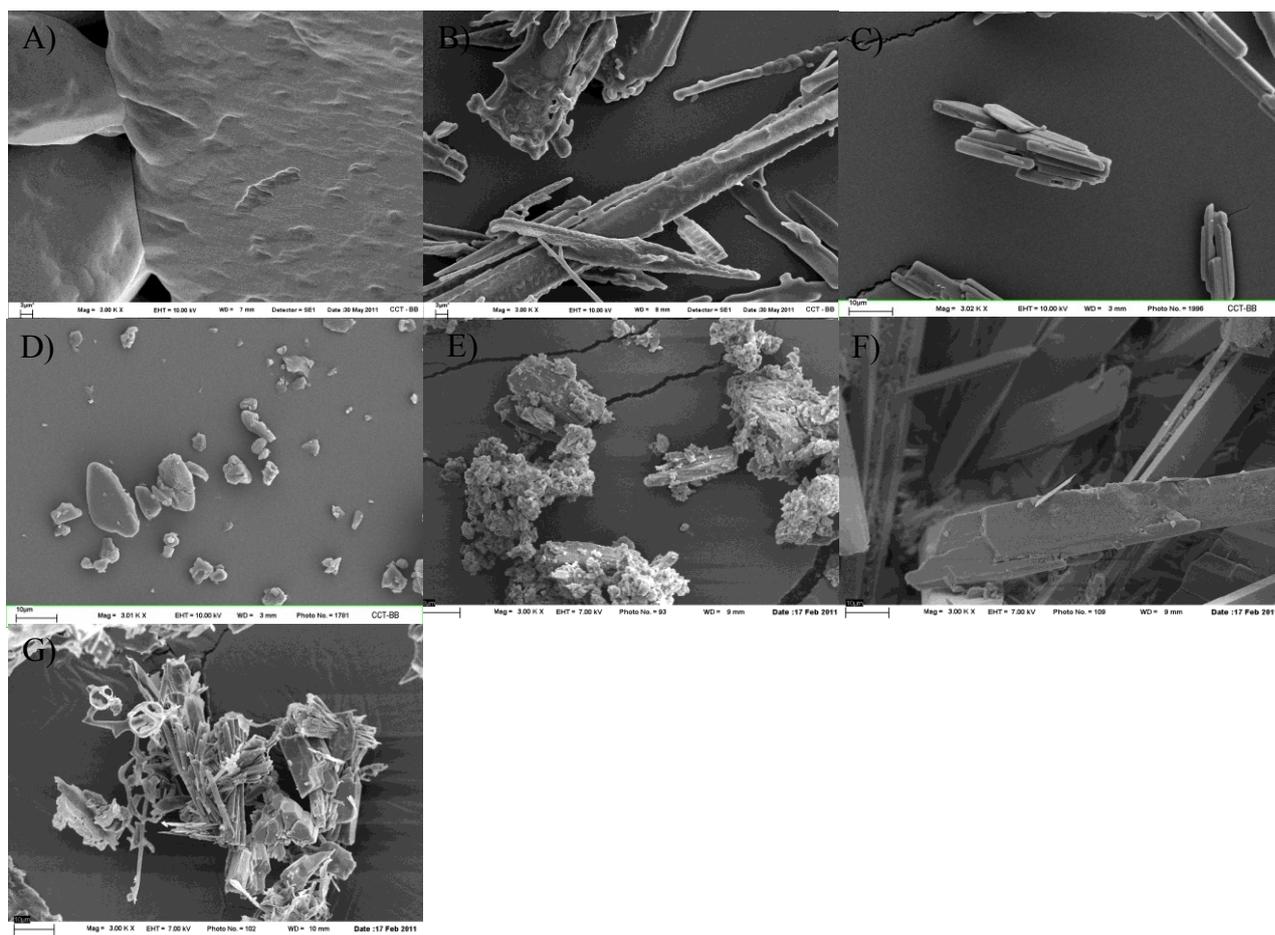


Figura 2.19. Microfotografías SEM de GLI, 3000X (A); GLI LI, 3000X (B); SDZ, 3000X (C); β CD, 3000X (D); SDZ: β CD:GLI MF, 3000X (E); SDZ: β CD:GLI CO, 3000X (F); SDZ: β CD:GLI LI, 3000X (G).

Aunque la técnica de SEM es inadecuada, para concluir de manera absoluta sobre la formación de un complejo, las microfotografías obtenidas sustentan la idea de la obtención de un nuevo componente.²⁰

Las MF de los sistemas SDZ: β CD:AAs, se mostraron como partículas de β CD, con cristales de SDZ y los respectivos AAs, con una morfología comparable a los compuestos puros. En contraste, se observaron cambios en la morfología cuando los sistemas con β CD y todos los AAs, fueron obtenidos por LI, donde fue imposible distinguir a los componentes individuales, demostrando una aparente interacción en el estado sólido, lo que podría ser indicativo de una nueva fase sólida. Finalmente, las microfotografías de los sistemas preparados por CO, presentaron las partículas de los componentes puros mezclados, así como también diferentes morfologías, lo cual puede ser atribuido a la formación de una nueva fase. En conclusión, el cambio drástico en la forma de las

partículas cuando se elaboran por la técnica de LI, podría ser indicativo de la presencia de una nueva fase sólida como una consecuencia de la formación de un complejo de inclusión entre SDZ, β CD y AAs.

2.3.3 Estudios de Disolución

La velocidad de disolución se testeó de manera de obtener una completa caracterización de los complejos entre el IFA, la β CD y los AAs, así como también, determinar como influyen los nuevos sistemas obtenidos sobre la capacidad de disolverse del IFA en un medio determinado. En las Figuras 2.20 y 2.21 se muestran, los perfiles de disolución de SDZ comparándolos con los sistemas SDZ: β CD (1:1) preparados por MF y LI y el correspondiente sistema SDZ: β CD:GLI (1:1:1) obtenido por las mismas metodologías (MF y LI), respectivamente. Debido a que la elección de estos sistemas se basó en la posible producción a escala industrial, se optó por el proceso de LI, ya que es el más utilizado por la industria en la actualidad, y por la β CD, por ser la más económica de las CDs. Por otro lado, se trabajó con los polvos de los componentes, para evitar acciones mecánicas sobre los mismos, que puedan llevar a modificaciones en el estado sólido; por ello, si bien los tiempos de disolución obtenidos fueron bajos, igual permitieron realizar una comparación de las pendientes obtenidas.

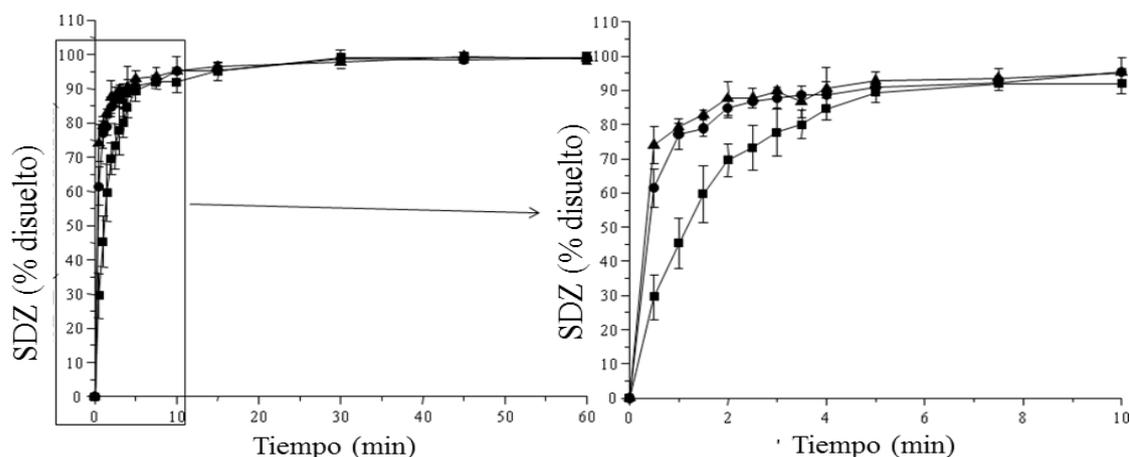


Figura 2.20. Perfiles de velocidad de disolución de SDZ (■), SDZ: β CD MF (●) y SDZ: β CD LI (▲).

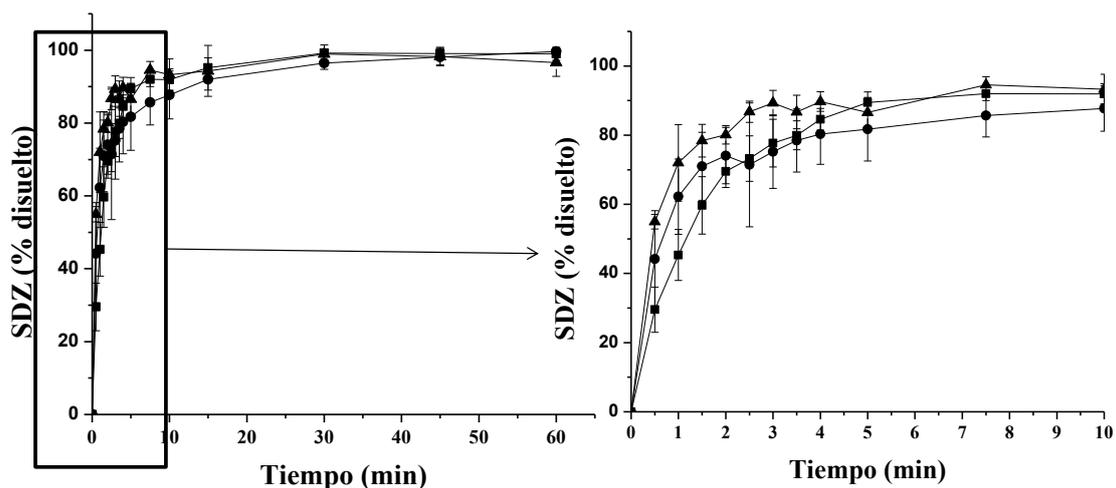


Figura 2.21. Perfiles de velocidad de disolución de SDZ (■), SDZ:βCD:GLI MF (●) y SDZ:βCD:GLI LI (▲).

Como se evidencia en las Figuras 2.20 y 2.21, los sistemas binarios y ternarios exhibieron una velocidad de disolución mayor con respecto al fármaco libre.

Para analizar los datos de equivalencia en la disolución, se usó un modelo independiente basado en el cálculo del factor de similitud (f_2). Las curvas obtenidas pueden considerarse equivalentes si el valor de f_2 es cercano a 100, por lo tanto, valores mayores que 50 (50-100) pueden asegurar que dos curvas son similares. En este caso, los valores obtenidos fueron de 34,49% y 28,82% para los productos SDZ:βCD obtenidos con MF y LI, respectivamente, comparados con SDZ pura.

Para los sistemas ternarios SDZ:βCD:GLI, los valores fueron 50,55% y 36,88%, para los productos obtenidos por MF y LI, respectivamente.

Estos resultados indican que las curvas de los sistemas no son similares con respecto a la del IFA solo, implicando que la presencia de la βCD causa un aumento en la velocidad de disolución de SDZ, a excepción del sistema obtenido entre SDZ, βCD y GLI por simple mezcla física (el cual al tener un valor de f_2 igual a 50, puede considerarse similar al perfil obtenido para la SDZ sola).

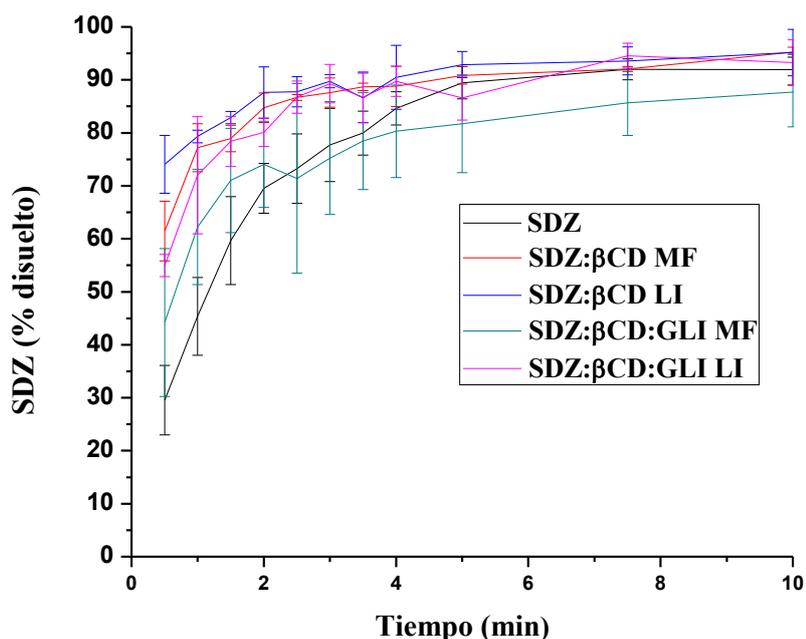


Figura 2.22. Perfiles de velocidad de disolución de los compuestos puros y de los sistemas binarios y ternarios superpuestos.

El aumento en la velocidad de disolución obtenido para los complejos preparados por LI, podría ser explicado por el incremento de la solubilidad de SDZ debido a la complejación, así como a la disminución del grado de cristalinidad del IFA como consecuencia de las interacciones con la CD y el AA, lo cual fue confirmado por DSC y DRX.

El incremento en la velocidad de disolución de SDZ, cuando el sistema binario fue preparado por MF, podría ser atribuido al efecto hidrofílico de la β CD, lo cual podría reducir la tensión interfacial entre el fármaco poco soluble y el medio de disolución, o por un proceso de inclusión *in situ*, lo cual incrementó el contacto entre el IFA y la CD.

Acorde a lo sugerido por otros autores,²⁶⁻²⁹ una disminución en el grado de cristalinidad y un aumento en la solubilidad del IFA podrían ser considerados factores determinantes en el incremento de la velocidad de disolución producida por complejación con CDs; es por ello que se podría suponer que el complejo binario presentó un leve aumento en la velocidad de disolución, comparado con el complejo ternario, producidos ambos por la técnica de LI, debido a que el complejo binario presenta una disminución en el grado de cristalinidad.

2.4 **Conclusión**

El análisis simultáneo del comportamiento de la complejación utilizando diferentes técnicas de caracterización en estado sólido, obviamente presenta muchas ventajas. Así, por ejemplo, con la ayuda del DSC se puede obtener información directa sobre la estabilidad térmica/transiciones de fase de los complejos con CDs. Luego también, el uso combinado de DSC con métodos espectroscópicos y cristalográficos nos provee evidencia experimental definitiva de la estructura sólida de los complejos formados. Por ello, la caracterización de los sistemas sólidos se realizó por los siguientes procedimientos DSC, ATG, DTG; FT-IR; SEM y DRX.

Se evaluaron 4 técnicas para la obtención de los complejos entre SDZ y β CD, las cuales fueron MF, LI, CO y SD; los demás sistemas se realizaron por MF; LI y CO.

Debido a que los resultados obtenidos para los sistemas elaborados por la simple mezcla física son similares a los de los compuestos individuales superpuestos, están indicando que los mismos sólo contienen a las especies libres. Cuando los sistemas son preparados por la técnica de CO, se podría pensar que se forman complejos pero de manera incompleta. En cambio, cuando los sistemas son elaborados por la técnica de LI y de SD (para el caso particular de SDZ: β CD), se podría concluir que se forman verdaderos complejos en estado sólido.

Por último, los estudios de disolución nos brindaron evidencia del aumento en la velocidad de disolución de SDZ cuando la misma se encuentra acomplejada.

2.5 **Referencias bibliográficas**

- 1) Brittain HG. Physical Characterization of Pharmaceutical Solids. En: Swarbrick J, editor. Drug and the Pharmaceutical sciences. Vol. 70. North Carolina: Inc. Wilmington; 1995; 1A pp. 2, 1B pp. 350, 1C pp. 240, 1D pp. 140.
- 2) Dodziuk H. Cyclodextrin and their complexes. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.; 2006; 2A pp. 396, 2B pp.199-202.
- 3) Banakar, UV. Dissolution testing devices. Pharmaceutical dissolution testing. New York: Marcel Dekker; 1992; pp 53-105.
- 4) Hanson R, Gray V. Handbook of dissolution testing. 3 ed. Dissolution Technologies; 2004.

- 5) Ventura CA, Puglisi G, Zappala M, Mazzone G. A physico-chemical study on the interaction between papaverine and natural and modified β -cyclodextrins. *Int J Pharm* 1998; 160: 163-72.
- 6) Giordano F, Novak C, Moyano JR. Thermal analysis of cyclodextrin and their inclusion compounds. *Thermochim Acta* 2001; 380: 123-51.
- 7) Clas SD, Dalton CR, Hancock BC. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Pharm Sci Technolo Today* 1999; 2(8):311-20.
- 8) Figueiras A, Carvalho RA, Ribeiro L., Torres-Labandeira JJ, Veiga FJB. Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified β -cyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 67:531–39.
- 9) Wade LG. *Química Organica*. 2nd. ed. México: Prentice-Hall Hispanoamericana S.A; 1993; pp. 480.
- 10) Garnero C, Zoppi A, Genovese D, Longhi M. Studies on trimethoprim:hydroxypropyl- β -cyclodextrin: aggregate and complex formation. *Carbohydr Res* 2010; 345:2550–556.
- 11) Frömming KH, Szejtli J. Topics in inclusion science. Cyclodextrin in Pharmacy. Capítulo 5. Preparation and Characterization of Cyclodextrin Complexes. Volumen 5. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1994; pp. 94-97
- 12) USP XXX (2007). United States Pharmacopeial Convention. USA, Rockville.
- 13) US Department of Health and Human Services, FDA, CDER. Guidance for Industry. Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms; 1997.
- 14) Stober H, DeWitte W. Sulfadiazine. En: Florey K, editor. *Analytical profiles of drug substances*, New York: Academic Press; 1982. pp. 523-51.
- 15) Gaspar de Araujo MV, Barbosa Vieira EK, Silva Lazaro G, Souza Conegero L, Almeida L E, Silva Barreto L, Bezerra da Costa N, Gimenez IF. Sulfadiazine/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host–guest system: Characterization, phase-solubility and molecular modeling. *Bioorgan & Med Chem* 2008; 16:5788–94.
- 16) Vandelli M, Salvioli G, Mucci A, Panini R, Malmusi L, Forni F. 2-Hidroxypropyl- β -cyclodextrin complexation with ursodeoxycholic acid. *Int J Pharm* 1995; 118: 77-83.

- 17) Villaverde J, Morillo E, Pérez Martínez J, Ginés J, Maqueda C. Preparation and characterization of inclusion complex of norflurazon and β -cyclodextrin to improve herbicide formulations. *J Agr Food Chem* 2004; 52:864-69.
- 18) Arias MJ, Moyano JR, Gine's JM. Investigation of the triamterene- β -cyclodextrin system prepared by co-grinding. *Int J Pharm* 1997; 153: 181-9
- 19) Salústio PJ, Feio G, Figueirinhas J, Pinto JF, Cabral Marques HM. The influence of the preparation methods on the inclusion of model drugs in a β -cyclodextrin cavity. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 71:377-86.
- 20) Buchi Naidu N, Chowdary KPR, Murthy KVR, Satyanarayana V, Hayman AR, Becket G. Physicochemical characterization and dissolution properties of meloxicam-cyclodextrin binary systems. *J Pharmaceut Biomed* 2004; 35:75-86.
- 21) Sinha VR, Anitha R, Ghosh S, Nanda A, Kumria R. Complexation of celecoxib with β -cyclodextrin: Characterization of the Interaction in Solution and in Solid State. *J Pharm Sci* 2005; 94: 676-87.
- 22) Chongprasert S, Knopp SA, Nail SL. Characterization of Frozen Solutions of Glycine. *J Pharm Sci* 2001; 90 (11): 1720-28.
- 23) Ge X, Huang Z, Tian S, Huang Y, Zeng C. Complexation of carbendazim with hydroxypropyl- β -cyclodextrin to improve solubility and fungicidal activity. *Carbohydr Polym* 2012; 89:208-12.
- 24) Tit B, Fulias A, Bandur G, Marian E, Tit D. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. *J Pharmaceut Biomed* 2011; 56:221-27.
- 25) Pretsch E, Bühlmann P, Affloter C, Herrera A, Martínez R. Determinación estructural de compuestos orgánicos. España: Masson, SA; 2005; pp. 309.
- 26) Uekama K, Hirayama F. Improvement of drug properties by cyclodextrin. *The Practice of Medicinal Chemistry (Third Edition)* 2008; pp 813-840.
- 27) Szejtli J. Medicinal application of cyclodextrins. *Med Res Rev* 1994; 14(3):353-86.
- 28) Latrofa A, Trapani G, Franco M, Serra M, Muggironi M, Fanizzi FP, Cutrignelli A, Liso G. Complexation of phenytoin with some hydrophilic cyclodextrins: effect on aqueous solubility, dissolution rate, and anticonvulsant activity in mice. *Eur J Pharm Biopharm* 2001; 52:65-73.

- 29) Trapani G, Latrofa A, Franco M, Pantaleo MR, Sanna E, Massa F, Tuveri F, Liso G. Complexation of Zolpidem with 2-Hydroxypropyl- β -, Methyl- β -, and 2-Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin: Effect on Aqueous Solubility, Dissolution Rate, and Ataxic Activity in Rat. *J Pharm Sci* 2000; 89(11): 1443-51.

PARTE

3

MODELADO MOLECULAR DE β CD Y SUS COMPLEJOS



Parte 3

Modelado Molecular de β CD y sus complejos

2.1 Introducción

Los cálculos de mecánica molecular son usados para obtener información teórica en cuanto a la estructura más probable de un complejo, explicar la forma en que puede transcurrir una reacción y determinar la estructura óptima y energías más bajas, que pueden lograrse a través de la formación de un complejo.¹ Por ello, en primer lugar se pretende obtener la conformación inicial de las moléculas del ligando (L) y del receptor (R) para lo que se realiza una búsqueda conformacional sistemática (obteniendo la conformación de mínima energía), la cual por otro lado, se puede obtener a partir de una base de datos.

Continuando con los estudios, existen métodos automáticos para explorar las posibles uniones entre el L y el R, estos son los denominados estudios de docking, los cuales realizan una exploración de todas las posibles posiciones relativas al L-R, evaluando el modo de interacción intermolecular entre ambos. Como resultado de esta exploración, se obtienen una serie de posibles conformaciones para la unión del complejo.²

Por último, la dinámica molecular es una disciplina particular del modelado molecular que explora el movimiento de las moléculas. Utiliza soluciones numéricas de la ecuación de movimiento de Newton (para hallar conformaciones de mínima energía), sobre un modelo que representa un sistema molecular, para simular el movimiento atómico y así obtener información acerca de las propiedades dependientes del tiempo de dicho sistema. Son precisamente estos movimientos y fluctuaciones de las moléculas los que permiten la interacción, por ejemplo, IFA-receptor.³

Una vez realizados los estudios de dinámica, se analizan las trayectorias obtenidas para identificar las interacciones que se mantienen a lo largo del tiempo, calculando la energía promedio de las interacciones intermoleculares para el proceso de unión. Ello se consigue empleando una metodología conocida como MM-PBSA (siglas en inglés de: Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area), la cual correlaciona magnitudes

calculables a partir de los resultados de la dinámica molecular, con el cambio de energía libre para el proceso de unión.⁴

Por lo mencionado anteriormente, el objetivo de esta tercera parte del trabajo de tesis fue utilizar la técnica de modelado molecular para el sistema SDZ:βCD, como complemento de los resultados experimentales, ya que la combinación de los datos de la técnica de 2D ROESY con cálculos de mecánica molecular es, a menudo, un forma muy útil para el aprendizaje de la geometría de los complejos con CDs.

Los estudios de química computacional se realizaron en colaboración con el Dr. M.A. Quevedo, del grupo de Química Medicinal de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

2.2 Materiales y Métodos

Para el procedimiento de modelado molecular, se construyó la estructura inicial de SDZ usando los gráficos de interfaz Gabedit (Allouche AR, disponible en pag web)⁵; luego se llevó a cabo una búsqueda conformacional sistemática. Esta búsqueda se realizó aplicando el método semiempírico (AM1, Austin Model 1), con el fin de obtener la conformación de mínima energía, la cual se optimizó utilizando el método ab-initio (HF-6-31G). Los métodos de búsqueda conformacional y los de optimización se aplicaron con el programa Gaussian 98,⁶ los resultados se procesaron con el programa Molden v.4.7.⁷

La estructura inicial de la βCD se obtuvo a partir de la base de datos Cambridge Structural Database (código BCDEXD10).

Para el procedimiento de docking molecular, se asignó a SDZ un potencial electrostático restringido (RESP, siglas en inglés) con cargas fijas, mientras que para βCD fueron asignadas las cargas correspondientes al campo de fuerza Glycamm04, implementado en el paquete del programa Amber9.⁸ Por otro lado, se usó Autodock versión 3.05 para las corridas de docking,⁹ mediante la aplicación de un algoritmo genético lamarckiano (LGA) para generar la población evaluada, usando los siguientes parámetros: una población de 150 individuos, un número máximo de evaluaciones de 250.000.000 y 5000 generaciones como criterio final.

Se seleccionó 1 como valor de elitismo, con una probabilidad de mutación y entrecruzamiento (crossing over) de 0,02 y 0,8, respectivamente. Se realizaron treinta corrimientos de docking y luego, para los ensayos posteriores de dinámica molecular, se seleccionó el conjunto de conformación de menor energía.

A continuación, se utilizó el programa Amber9,⁷ para los estudios de dinámica molecular. Las cargas atómicas para SDZ y β CD fueron idénticas a las utilizadas para los procedimientos de docking molecular descritos anteriormente. Los complejos obtenidos por docking molecular fueron solvatados, empleando una caja de agua octaédrica pre-equilibrada TIP3P, para lo cual se llevó a cabo una minimización inicial del solvente, seguida por una minimización de todo el sistema. Luego, el respectivo sistema se calentó a 300 K por 20 picosegundos (ps), seguido por una corrida de equilibración de 100 ps. Las corridas se realizaron por 20 nanosegundos (ns), utilizando un tiempo de paso (timestep) de 2 femtosegundos (fs), bajo presión y temperatura constantes, aplicando el algoritmo SHAKE para restringir los enlaces de hidrógeno implicados.

Los estudios de los puentes hidrógeno y el análisis energético de los componentes, se realizaron usando los módulos Ptraj y MM-PBSA (*siglas en ingles, Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area*) del programa Amber9, respectivamente.⁴ Se aplicaron los análisis de MM-PBSA sobre un segmento de 20 ns, muestreando una de cada diez conformaciones en la trayectoria. Las estructuras se visualizaron, usando el programa VMD v.1.8.6.¹⁰ Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron en el Fimm clúster resource (Parallab, Bergen Centro de Ciencias de la Computación de la Universidad de Bergen, Noruega).

2.3 Resultados y Discusión

2.3.1 *Estudios Computacionales*

Los resultados experimentales de RMN se utilizaron para elaborar los posibles modelos geométricos del complejo binario SDZ: β CD, a través de la técnica de modelado molecular.

2.3.1.1 *Análisis conformacional*

Se calcularon los mínimos de energía y luego, se construyó la estructura tridimensional de SDZ. Para estudiar la posición relativa del anillo A con respecto al anillo B, se rotó el ángulo diedro, definido por el enlace sulfonamida y se analizó el resultado energético final (Figura 2.1).

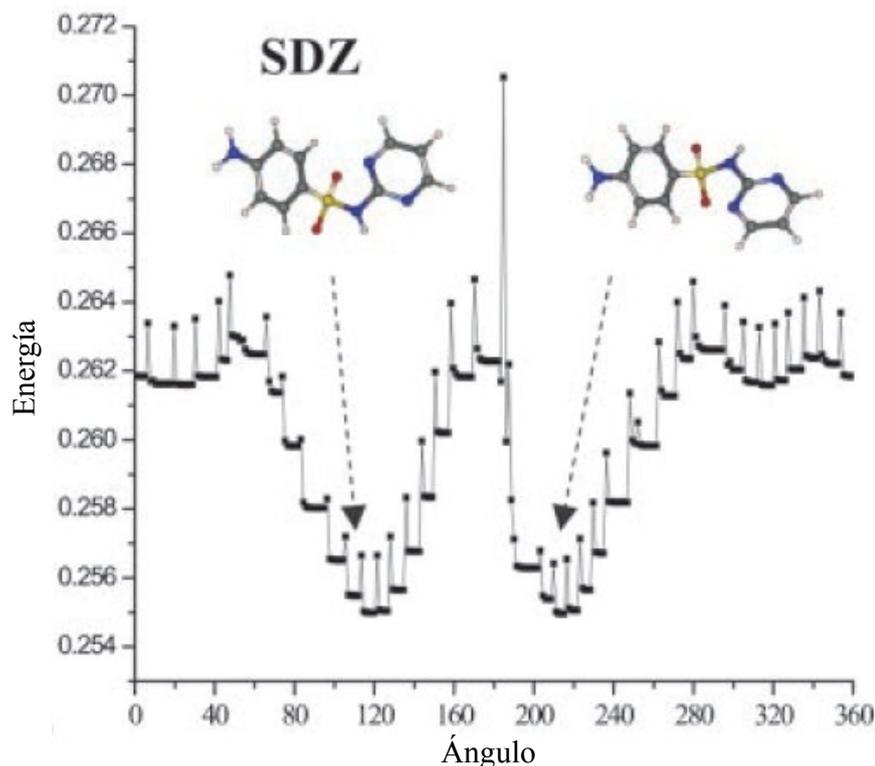


Figura 2.1. Perfil energético obtenido del análisis conformacional de SDZ.

Se encontraron dos conformeros de mínima energía para la molécula de SDZ, ambos corresponden a la posición eclipsada por enlace del hidrógeno unido al átomo de nitrógeno y a ambos átomos de oxígeno en la fracción sulfonamida, donde se establece que los enlaces puente hidrógeno intramoleculares son los responsables de la alta estabilidad de estos dos conformeros. Resultados similares fueron reportados recientemente para SDZ, donde se estudiaron las propiedades conformacionales por medio de métodos de alto nivel teórico y experimental.¹¹

2.3.1.2 Docking Molecular

Considerando que los conformeros de mínima energía obtenidos, son las conformaciones más probables que se pueden presentar en solución, los procedimientos de docking se aplicaron mediante la restricción de la rotación del enlace sulfonamida, sobre los dos conformeros descritos anteriormente, permitiendo la rotación de todos los otros enlaces.

La figura 2.2 muestra la estructura tridimensional del complejo SDZ:βCD obtenido a partir del estudio de docking, en el cual el anillo B de las SDZ está inserto en la cavidad de la CD. Comportamientos similares se obtuvieron para los dos conformeros evaluados.

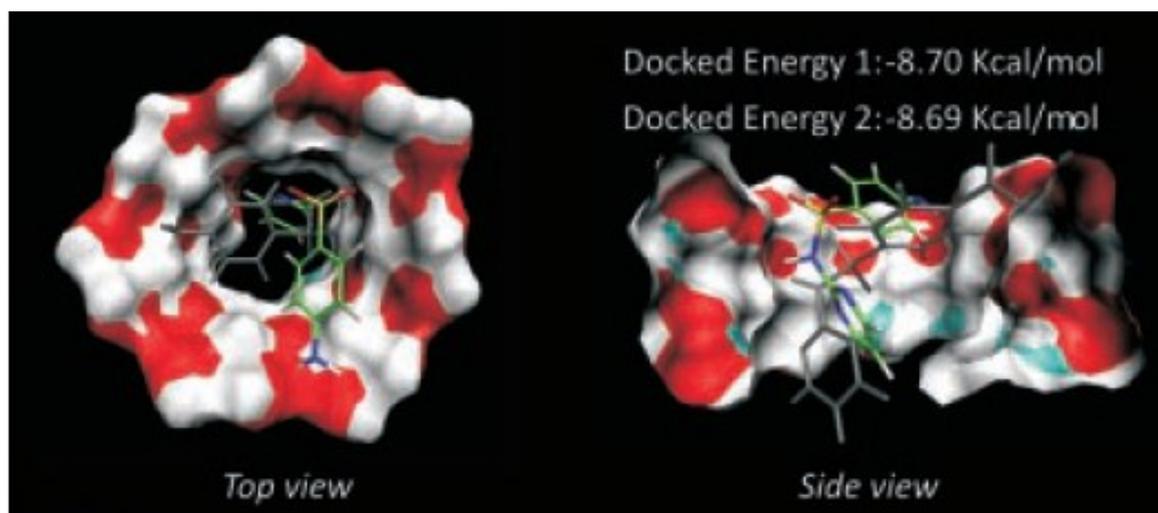


Figura 2.2: Estructura del complejo SDZ:βCD obtenido por el estudio de docking molecular.

Un análisis profundo de la conformación de docking muestra que el anillo A está colocado en una posición coplanar con respecto a la cavidad de β CD y perpendicular a su eje, lo que permite el establecimiento de enlaces de hidrógeno entre los hidroxilos del sector ancho de la macromolécula con la amina primaria y la fracción sulfamida de la molécula huésped.

Por lo tanto, el componente electrostático de afinidad parece tener su origen principalmente en la interacción entre la molécula huésped y los hidroxilos situados en el sector ancho de la β CD, mientras que los resultados de contribución hidrófobos son debidos a la inclusión del anillo B.

2.3.1.3 Dinámica Molecular

Los complejos obtenidos por docking molecular se solvataron, calentaron y equilibraron, tras lo cual se realizaron extensas simulaciones (20 ns).

Con el fin de estudiar la estructura del complejo en función del tiempo, se analizó el establecimiento de los enlaces hidrógeno intermoleculares.

Cabe señalar que cuando la estructura inicial, obtenida por docking molecular se solvata, calienta y equilibra, la molécula huésped se mueve desde la posición inicial de docking, por lo cual la fracción sulfonamida se inserta en la cavidad de β CD (Figura 2.3).

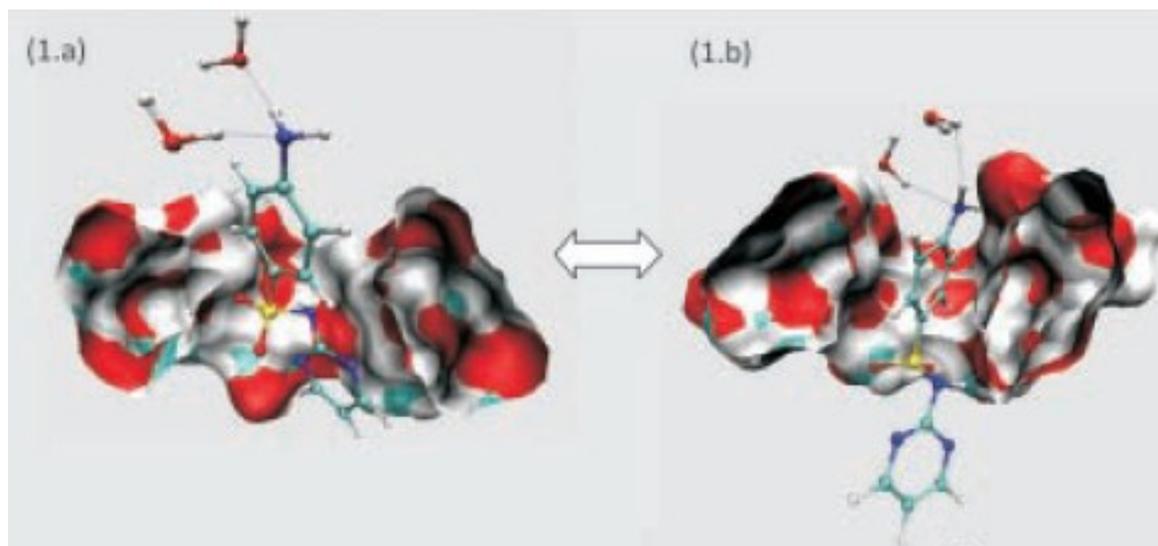


Figura 2.3. Enlaces hidrógeno y estructura tridimensional obtenida para el complejo SDZ:βCD.

Durante el movimiento, la función amina del anillo A (Anexo 3) está orientada hacia el solvente, donde se forman enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua y se mantiene durante toda la simulación (frecuencia media 46,4%).

Al mismo tiempo, parte del anillo A está incluido en la cavidad a través del sector ancho, mientras que el anillo B está parcialmente excluido de la βCD en el sitio opuesto de la macromolécula (Figura 2.3-1.a). En un segundo grupo de conformaciones, el anillo A está incluido profundamente en la cavidad, mientras que el anillo B está excluido casi por completo de la cavidad hidrófoba y la fracción sulfonamida establece enlaces puente hidrógeno con los hidroxilos del sector angosto (Fig. 2.3-1.b). En concordancia con lo observado en los ensayos de 2D ROESY, donde los protones Ha de SDZ correlacionaron con los protones internos de βCD (H5). Además, este modelo es consistente con los desplazamientos a campo bajo de los protones H3 y H5 que se encuentran en el correspondiente espectro de ^1H RMN, probablemente causado por la fracción electronegativa sulfonamida. Un informe anterior, relacionado a la interacción de SDZ con HPβCD, sugirió la inserción del anillo A en la cavidad hidrófoba.¹²

2.3.1.4 Análisis Energético

En la Tabla 2.1 se enumeran los componentes energéticos determinados para el complejo estudiado, utilizando la metodología MM-PBSA. Como se puede ver, la mayor contribución a la estabilidad del complejo, surge del componente de van der Waals

($E_{V_{dw}}$), cuyo valor fue -30,10 kcal/mol. También, se observó al componente electrostático (E_{Ele}), con una contribución a la afinidad de -7,13 kcal/mol.

Tabla 2.1: Análisis de los componentes energéticos de SDZ: β CD usando la metodología MM-PBSA.

E_{Ele}	-7,13 Kcal/mol
$E_{V_{dw}}$	-30,10 Kcal/mol
$E_{Gasoso\ Total}$	-37,23 Kcal/mol
PB_{sur}	-3,63 Kcal/mol
PB_{cal}	25,57 Kcal/mol
PB_{tot}	-15,29 Kcal/mol

La contribución de solvatación polar (PB_{cal}) es de suma importancia en la formación de complejos con β CD y puede ser decisiva con respecto a la afinidad general observada. Como se puede ver, el valor de PB_{cal} fue positivo para el complejo estudiado, e igual a 25,57 kcal / mol.

En contraste, la energía total de interacción (PB_{tot}) fue negativa, lo que indica que la formación del complejo es termodinámicamente favorable. Por lo tanto, la energía requerida para la solvatación se compensó, debido a las interacciones intermoleculares de Van der Waals ($E_{V_{dw}}$) e interacciones electrostáticas (E_{Ele}).

2.4 Conclusión

La caracterización del modo de inclusión, por la técnica 2D ROESY, sumado a los cálculos teóricos por el método AM1, señaló que la orientación preferente de SDZ involucra la inclusión profunda del anillo aromático A (anilina) dentro de la cavidad de la CD.

2.5 Referencias bibliográficas

- 1) Al Omari AA, Al Omari MM, Badwan A A, Al-Sou'od KA. Effect of cyclodextrins on the solubility and stability of candesartan cilexetil in solution and solid state. *J Pharmaceut Biomed* 2011; 54: 503–9.
- 2) Leach AR. *Molecular Modelling Principles and Application*. 2 Ed. Longman; 1996; pp. 554-556.
- 3) Becker OM, Mackerell AD, Roux B, Watanabe M. *Computational Biochemistry and Biophysics*. New York: Marcel Dekker; 2001; pp. 39-69.
- 4) Kuhn B, Gerber P, Schulz-Gasch T, Stahl M. Validation and Use of the MM-PBSA Approach for Drug Discovery. *J Med Chem* 2005; 48: 4040-48.
- 5) Allouche AR. Gabedit es un programa libre que proporciona una interfaz de usuario gráfica, para paquetes de química computacional Disponible desde la página: <http://gabedit.sourceforge.net/>.
- 6) Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Zakrzewski VG, Montgomery JA, Jr., Stratmann RE, Burant JC, Dapprich S, Millam JM, Daniels AD, Kudin KN, Strain MC, Farkas O, Tomasi J, Barone V, Cossi M, Cammi R, Mennucci B, Pomelli C, Adamo C, Clifford S, Ochterski J, Petersson GA, Ayala PY, Cui Q, Morokuma K, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman JB, Cioslowski J, Ortiz JV, Baboul AG, Stefanov BB, Liu G, Liashenko AP, Piskorz I, Komaromi R, Gomperts RL, Fox Martin DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Gonzalez C, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Andres JL, Gonzalez C, Head-Gordon M, Replogle ES, Pople JA. 1998. Software: GAUSSIAN 98. Pittsburgh, PA, USA: Gaussian, Inc. www.gaussian.com.
- 7) Schaftenaar G, Noordik JH. Molden: A pre- and postprocessing program for molecular and electronic structures. *J Comput Aided Mol Design* 2000; 14:123–134.
- 8) Case DA, Cheatham TE, Darden T, Gohlke H, Luo R, Merz KM, Onufriev A, Jr., Simmerling C, Wang B, Woods RJ.. The Amber biomolecular simulation programs. *Comput Chem* 2005; 26: 1668–1688.

- 9) Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem* 1998; 19:1639–1662.
- 10) Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 1996; 14:33–38.
- 11) Ogruc-Ildiz G, Akyuz S, Ozel AE. Experimental, *ab initio* and density functional theory studies on sulfadiazine. *J Mol Struct* 2009; 924-926:514–522.
- 12) Gaspar de Araujo MV, Barbosa Vieira EK, Lazaro GS, Conegero LS, Almeida LE, Barreto LS, Bezerra da Costa N, Gimenez IF. Sulfadiazine/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and molecular modeling. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 5788-94.

En este capítulo se aplica un nuevo método de permeabilidad *in vitro* basado en el desarrollo de una membrana artificial, para evaluar y predecir la absorción de Ingredientes Farmacéuticos Activos.

CAPÍTULO

3

ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD A TRAVÉS DE UN MODELO *IN VITRO*

Alicia Delrivo

Estudios de permeabilidad a través de un modelo *in vitro*

3.1 Introducción

A pesar de las buenas propiedades terapéuticas, un alto porcentaje de potenciales IFAs están destinados a fracasar en los estudios preclínicos o clínicos, debido a características de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) inadecuadas.^{1,2} Por ello, en la actualidad, las propiedades biofarmacéuticas son abordadas rápidamente para seleccionar potenciales candidatos. El principal componente biofarmacéutico estudiado es la biodisponibilidad oral, debido a que esta vía de administración es la más utilizada para en la mayoría de los IFAs.³

Por ello, la velocidad de disolución en los fluidos del tracto gastrointestinal y la permeabilidad, a través de las bicapas lipídicas de las células epiteliales que cubren la pared intestinal, son los factores más importantes en determinar las propiedades de absorción oral de los IFAs.^{1,4,5,6}

Si bien, se han propuesto diferentes métodos *in vitro* o *in silico* para estudiar y predecir la permeabilidad gastrointestinal de los IFAs, aún no se cuenta con métodos oficiales disponibles para esta determinación. Son muy atractivas las técnicas *in silico*, en donde se realizan cálculos computacionales basados en la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR), utilizando algunas propiedades físico-químicas de los compuestos, tales como la solubilidad, el coeficiente de partición octanol/agua ($\text{Log } P_{o/a}$), la lipofilicidad, el área de superficie polar de la molécula, todas ellas, para estimar potenciales absorciones orales. Sin embargo, su valor predictivo no es satisfactorio.^{7,8}

Por su parte, las metodologías experimentales *in vitro*, incluyen sistemas que se basan en el uso de tejidos extraídos de animales o humanos, o células y sistemas que utilizan membranas artificiales. Entre la primera serie de métodos, las monocapas de células Caco-2 (una línea celular de adenocarcinoma del colon y del recto de origen humano), constituyen un modelo ampliamente utilizado, debido a que imita la mayoría de los caminos de transporte de los IFAs en el tracto gastrointestinal, demostrando ser una

herramienta importante para estimar la absorción potencial de los fármacos administrados por vía oral.⁹⁻¹¹ Sin embargo, su uso está limitado por los ciclos de crecimiento celular prolongados, el posible riesgo de contaminación microbiológica, los altos costos para su implementación y la elevada variabilidad inter-experimental e inter-laboratorio.¹²

También se comercializa un sistema para determinar absorción *in vitro*, PAMPA, el cual se basa en una construcción tipo sándwich, con 96 pocillos microtitulantes divididos en dos cámaras, separados por un microfiltro hidrofóbico, saturado con una mezcla de solventes orgánicos y lecitina.¹³ Posteriormente, se generaron numerosas variantes del modelo PAMPA con diversas composiciones lipídicas, incluyendo el n-hexadecano (HDM)-PAMPA, el PAMPA bio-mimético (BM) PAMPA, y otros utilizando la barrera hematoencefálica (BBB)-PAMPA.¹⁴ Este ensayo se basa en realizar una única medición al final del experimento¹⁵ (Figura 3.1).

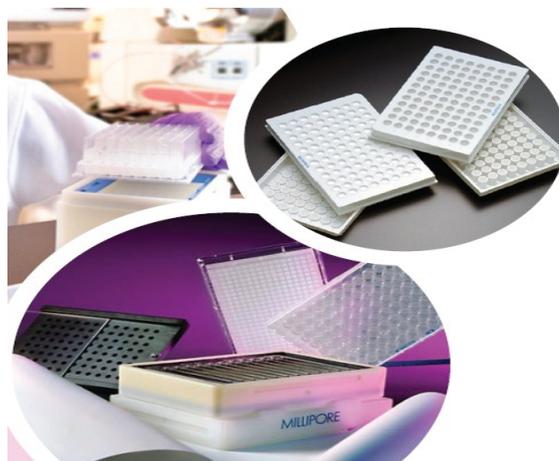


Figura 3.1. Imagen tomada de www.millipore.com/multiscreen, donde se observa el sistema PAMPA.

Este sistema presenta ciertas desventajas, como la ausencia de la condición de agitación, lo cual podría dar una subestimación de la permeabilidad del IFA; la ausencia de la condición de sumidero durante el estudio de transporteⁱ (debido al limitado volumen de los compartimientos donador y receptor), por lo cual no mantiene siempre un gradiente

ⁱ Tras la absorción a través del epitelio del intestino, el IFA es rápidamente eliminado por la sangre del sistema portal. De esta manera, el gradiente de concentración del fármaco es mantenido, esto sirve como una fuerza impulsora para su transporte. Esta disposición es denominada "condición de sumidero" (término en inglés "sink"). Del mismo modo, en los modelos *in vitro*, estas condiciones deben establecerse y mantenerse durante todo el curso del experimento. Esto implica que cualquier IFA que ha permeado hacia el compartimiento receptor no se someterá a la difusión en sentido contrario, o sea, hacia el compartimiento donador. Prácticamente, se requiere que la concentración de IFA en el compartimiento receptor no exceda de 10% de la concentración en el compartimiento donador. El establecimiento de las condiciones de sumidero es necesaria a fin de generar resultados experimentales fiables.¹⁴

de concentración constante y podría dar un aumento significativo del fenómeno de difusión en sentido contrario.

Es por lo anteriormente expuesto que los métodos *in vitro*, que usan membranas artificiales, representan una alternativa interesante a la utilización de los tejidos animales o células, debido a su mayor simplicidad, costo-efectividad y reproducibilidad de los resultados, pudiendo estas membranas ser utilizadas para la clasificación de IFAs en las diferentes categorías de absorción.^{16,17}

Se estima que más del 80% de los IFAs administrados por vía oral se absorben por transporte pasivo a nivel de las células epiteliales¹⁸ (Figura 3.2).

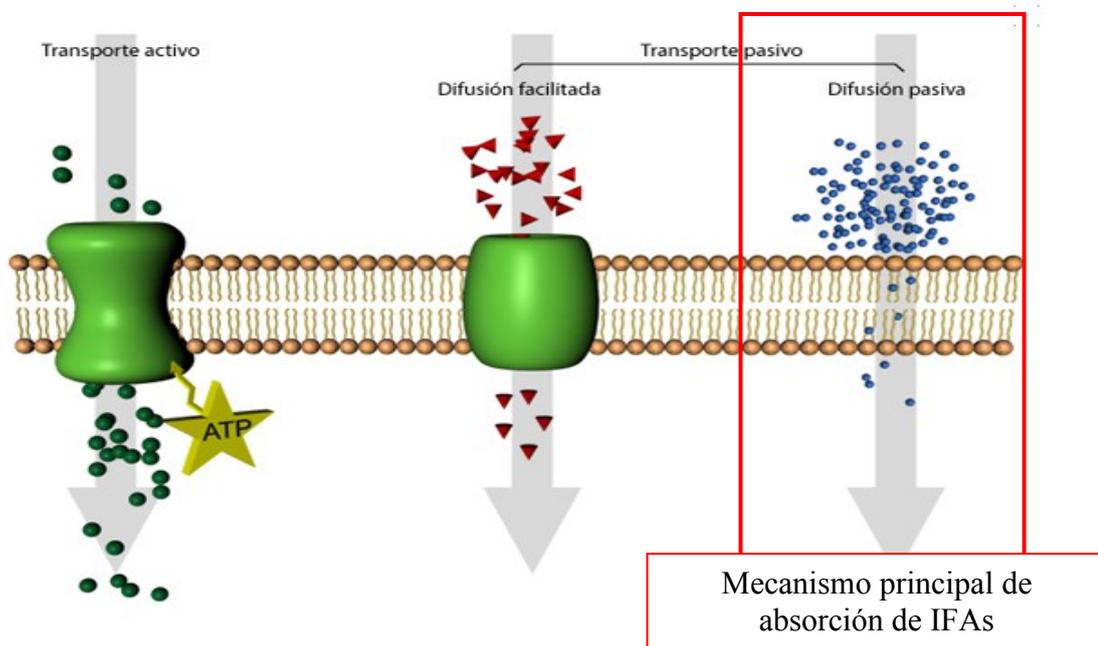


Figura 3.2: Mecanismos de absorción de un IFA.

Es sumamente importante el desarrollo de una membrana artificial adecuada, que simule el comportamiento de los componentes naturales de la membrana de las células gastrointestinales. La misma se define como un sistema multicomponente, en el cual un soporte artificial está impregnado con una solución orgánica de fosfolípidos, seleccionados debido a su presencia en la membrana plasmática de los enterocitos,ⁱⁱ los cuales se supone, forman una estructura de bicapa en los poros del filtro, debido a que

ⁱⁱ Las membranas de los enterocitos están compuestas por lípidos; aproximadamente la mitad de los mismos son fosfolípidos, entre ellos, fosfatidilcolina (fosfolípido predominante), fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina; contienen una cabeza polar, como así también dos cadenas lipofílicas (por ejemplo de ácidos grasos). Los ácidos grasos presentan una gran variedad de cadenas acilo- dependiendo de la longitud y el grado de insaturación. Las cadenas más comunes de la membrana plasmática de los enterocitos son acil-16:0, 18:0, 18:1, y 18:2.¹⁹

cuando se colocan fosfolípidos entre dos soluciones acuosas, separados por un soporte incompleto, forman un bicapa lipídica que completa la separación; las cabezas polares de los fosfolípidos se orientan hacia la solución acuosa y los ácidos grasos se orientan hacia el interior de la bicapa, que por tal motivo resultan altamente hidrofóbicas.²⁰

Por ello, en función del número de compuestos a estudiar y del objetivo concreto del estudio de absorción, se seleccionan unos u otros métodos. No existe el método perfecto, sino el adecuado para cada objetivo experimental.

Basados en los fundamentos anteriormente expuestos, este capítulo tiene como objetivo principal, diseñar un modelo *in vitro* a través del uso de membranas artificiales, capaz de brindar la mayor reproducibilidad en los resultados. Para verificar la conveniencia del modelo, se realizó la determinación de la correlación entre los valores del coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) obtenidos y los datos de extensión de absorción en humanos (% Fa), de una serie de IFAs, considerados compuestos estándares, que, como recomienda la FDA (*Siglas en inglés, Food and Drug Administration*),⁵ cubren un amplio intervalo de % Fa y para la mayoría, se conoce que son absorbidos total o parcialmente por medio del transporte pasivo a través de la membrana del tracto gastrointestinal.

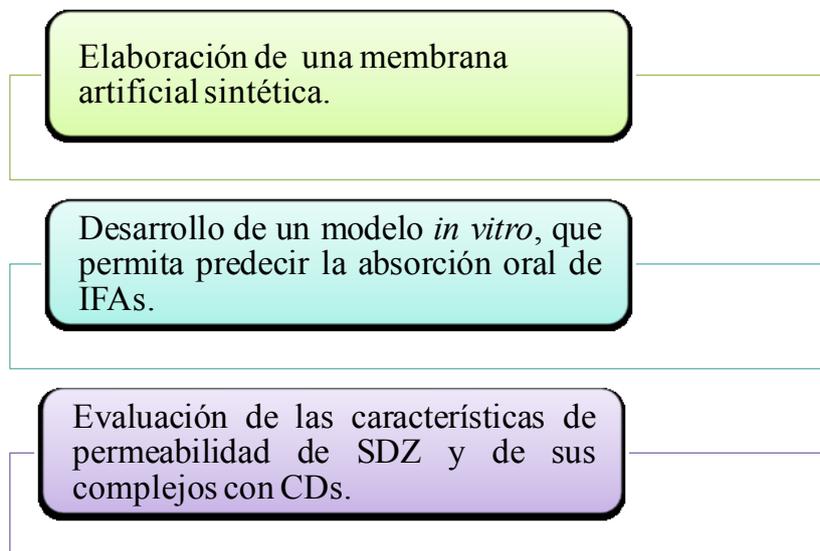
La siguiente etapa de esta investigación se basó en la utilización del método *in vitro* propuesto, para la evaluación del comportamiento de SDZ en el mismo; el respectivo IFA se seleccionó, como se comentó en el capítulo 1, debido a que se encuentra en el listado de fármacos esenciales propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS),²¹ y cuyos datos disponibles sobre permeabilidad son inconclusos.²² Además, como se conoce, es un IFA que posee baja solubilidad en agua, aproximadamente 0,074 mg/mL a 25°C,²³ la cual pudo ser mejorada mediante la obtención de complejos binarios y ternarios con CDs y/o AAs, como se comentó en el capítulo anterior.

El desarrollo de sistemas capaces de superar los problemas de permeabilidad y solubilidad y por lo tanto, el aumento de la biodisponibilidad de los IFAs, está generando cada vez más atención y es un reto crucial para las instituciones industriales y para el sector académico.

Sumado a lo anterior, es importante destacar que se observó que las CDs pueden actuar como potenciadores de la permeabilidad.²⁴ Aún no se conoce cómo las mismas logran aumentar la permeabilidad de los IFAs, ya que numerosos mecanismos han sido propuestos. No obstante, se cree que las CDs actúan como verdaderos transportadores, porque mantienen a los IFAs hidrofóbicos en solución y los liberan en la superficie de la

membrana, donde se particionan desde la cavidad de la CD hacia la membrana lipofílica.^{25,26}

Debido a ello, se evaluó también la incidencia de los complejos elaborados, a partir de las CDs y los AAs, sobre el valor de P_{app} de SDZ (Esquema 3.1).



Esquema 3.1. Objetivos a cumplimentar en el actual capítulo.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 *Materiales*

SDZ (Parafarm, Argentina), β CD fue una donación de Ferromet S.A. (agente Roquette en Argentina), Lipoid 75 fue una donación de DROMEX SA.

IFAs usados como compuestos estándares: teofilina, amoxicilina, carbamazepina, caféina, piroxicam (Todo droga), propranolol, verapamilo, ketoprofeno, cloranfenicol, atenolol, furosemida, norfloxacin, hidroclorotiazida, trimetoprima, ibuprofeno (Parafarm), allopurinol, antipirina. (Unifarma), metoprolol, ácido acetilsalicílico (Sigma), aciclovir (ELEA).

Todos los experimentos fueron realizados con reactivos y solventes grado analítico (calidad pro-análisis). El agua tridestilada que se usó en estos estudios, se obtuvo mediante un sistema de purificación Milli-Q (Millipore® Bedford, USA). Se utilizaron soluciones reguladoras de fosfato (PBS) de pH 7,4 y 5,5 (HI 255 Combined Meter HANNA®, USA).

3.2.2 Equipamiento

- ☞ Balanza analítica: Voyager Ohaus modelo Explorer E01140.
- ☞ Plancha de agitación con 6 centros: AMM-6- Multi-Position Magnetic Stirrer.
- ☞ Circuito de agua con baño termostatzado: HAAKE F3.
- ☞ Espectrofotómetro UV-VIS: Cary 60- Agilent Technologies.

3.2.3 Elaboración de la membrana artificial

La membrana artificial se realizó mediante la inmersión de un soporte de éster de celulosa (Membrana GS EM, 0,22 μm tamaño de poro, 25 mm de diámetro, Millipore®) durante 10 minutos, en una fase lipídica consistente en una mezcla de Lipoid 75 (Tabla 3.1) al 10% con n-octanol.

Tabla 3.1. Composición de Lipoid 75.

FOSFOLÍPIDOS	COMPOSICIÓN (g/100g)
Fosfatidilcolina	68,0-73,0
Fosfatidiletanolamina	7,0-10,0
Lisofosfatidilcolina	< 3,0

La fosfatidilcolina (Figura 3.3) está compuesta por dos ácidos grasos unidos en la posición 1 y 2 del glicerol, formando la parte lipofílica de la molécula, mientras que la cabeza polar es construida por la fosfatidilcolina esterificada en la posición 3 del glicerol. La misma es un zwitterion sin carga neta.



Figura 3.3. Estructura típica de fosfatidilcolina derivada de la soja.

El solvente n-octanol se eligió, debido a que posee varias e importantes ventajas con respecto a otros solventes, como lo es su característica estructural, la cual posee una cadena alquílica larga y un grupo polar $-\text{OH}$, además de presentar la habilidad para

formar puentes hidrógeno y tomar moléculas de agua. Es un solvente UV transparente, lo que permite el empleo de la espectroscopia UV-VIS como técnica analítica.²⁷ Por todo lo nombrado, al sistema propuesto se lo considera un modelo adecuado de los lípidos constituyentes de la membrana biológica.

3.2.4 Estudio de permeabilidad a través de la membrana artificial

Los estudios se realizaron utilizando celdas de difusión de Franz horizontales, las cuales poseen un volumen aproximado de 2,2 mL en cada compartimento (donor y receptor) (Figura 3.4); las mismas se colocaron sobre una plancha de agitación de 6 centros, logrando una agitación constante (11 x 100 rpm) a ambos lados de la celda.

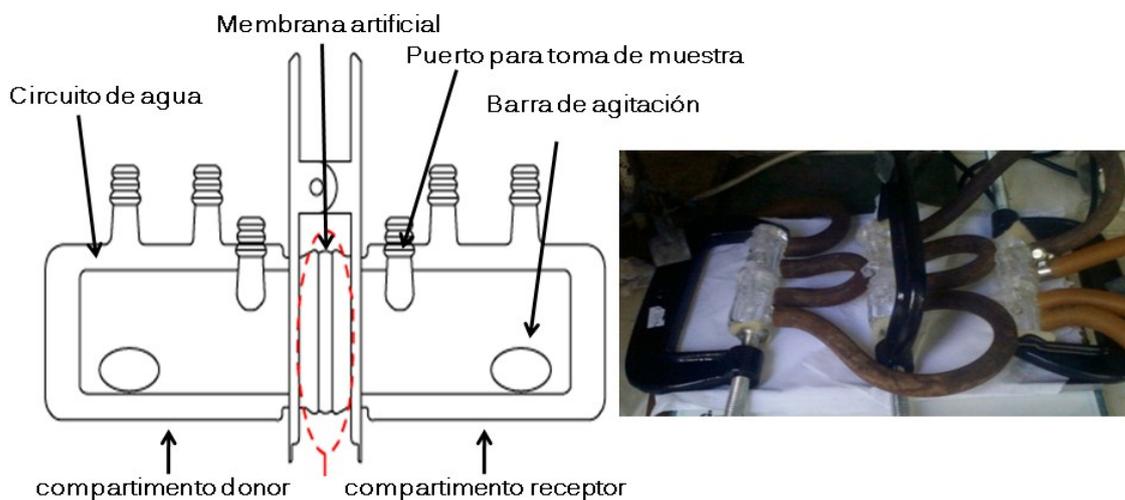


Figura 3.4. Esquema de una celda de difusión de Franz horizontal y fotografía de las celdas utilizadas en este proyecto, por triplicado y con el correspondiente circuito de agua.

La membrana artificial impregnada en n-octanol se colocó entre el compartimento donador y receptor, de la celda de difusión de Franz. El compartimento receptor se llenó con una solución salina de fosfato de pH 7,4 (conteniendo fosfato diácido de potasio, fosfato monoácido de sodio y cloruro de sodio) (PBS); la temperatura se mantuvo a 37°C mediante un circuito de agua con baño termostatzado.

El compartimento donador se llenó con una solución de cada IFA, utilizado como estándar, a una concentración igual a la dosis terapéutica (mg/mL) (Anexo 6), o con una solución de SDZ (0,4mg/mL) o con los complejos binarios (SDZ:βCD, SDZ:MβCD y SDZ:HPβCD, cuya relación molar fue 1:1, con respecto a la dosis terapéutica del IFA

puro), o con los complejos multicomponentes obtenidos con la SDZ, la β CD y los AAs (1:1:1); en soluciones tamponadas de pH 7,4, o 5,5.

A tiempos específicos se tomaron alícuotas de 1 mL, desde el compartimento receptor, las cuales fueron reemplazadas con el mismo volumen de PBS mantenido a igual temperatura (37°C). Las muestras se analizaron por espectrofotometría UV-VIS.

Con los datos obtenidos, se graficó la cantidad de IFA acumulado por unidad de área (superficie expuesta de la membrana artificial, 0,502 cm²) (mg/cm²) en función del tiempo (s), para obtener de la zona lineal (antes de iniciar la zona lineal, existe un periodo de tiempo, cuyo término en inglés es “lag time”ⁱⁱⁱ) el valor de la pendiente, el cual equivale a la velocidad de flujo (dQ/dt), dato utilizado luego, para el cálculo de P_{app}, explicado a continuación.

El P_{app}, el cual representa la capacidad de paso de un IFA a través de la membrana, se calculó de la siguiente manera (Ecuación 3.1):

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{AC_0} \quad \text{Ec 3.1}$$

donde, P_{app} es el coeficiente de permeabilidad aparente medido en cm.s⁻¹; dQ/dt (mg.s⁻¹), la cantidad de IFA permeado por unidad de tiempo (flujo); A, el área de superficie efectiva de la membrana artificial expuesta al medio (cm²) y C₀ (mg.mL⁻¹), la concentración inicial de IFA en el compartimento donador.

Esta ecuación se utilizó debido a que, acorde a la primera ley de difusión de Fick, las moléculas difunden de una región de alta concentración a una de baja concentración, de acuerdo a la siguiente ecuación 3.2:

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{DAK}{h} (C_{GI} - C_p) \quad \text{Ec 3.2}$$

donde, $\frac{dQ}{dt}$ es la velocidad de difusión (g/s.cm²); D, es el coeficiente de difusión [representa el flujo de una sustancia por unidad de gradiente de concentración (cm²/s)]; K, el coeficiente de partición lípido/agua del IFA en la membrana biológica que controla la permeabilidad del fármaco y h, el espesor de la membrana; (C_{GI} - C_p), la diferencia entre la concentración de IFA en el tracto gastrointestinal y en el plasma y A, área de la membrana.

ⁱⁱⁱ *Lag time*: tiempo de latencia previo al comienzo de la permeabilidad, es específico para cada IFA, y es donde se alcanza la saturación de la membrana lipídica del IFA.

Considerando a D, A, K y h constantes para las condiciones usuales de absorción, surge una constante combinada P (coeficiente de permeabilidad) definida como (Ecuación 3.3):

$$P = \frac{D \cdot A \cdot K}{h} \quad \text{Ec 3.3}$$

Entonces, incorporando el coeficiente P y considerando a Cp despreciable, de la ecuación 3.2, de la Ley de Fick, se obtiene la Ecuación 3.4:

$$\frac{dQ}{dt} = P(C_{GI}) \quad \text{Ec 3.4}$$

Con la cual, reordenando, llegamos a una ecuación similar a la 3.1, mencionada anteriormente.²⁸

Cada experimento se realizó por triplicado y se informó un promedio de los resultados obtenidos.

Para demostrar la conveniencia del método, se determinó la correlación entre los valores de P_{app} y los datos de % Fa, de la serie de IFAs citados anteriormente.

Luego, se evaluó el método propuesto con SDZ y sus respectivos complejos multicomponentes, siguiendo el mismo procedimiento citado anteriormente, para determinar así, como la formación de los complejos de inclusión con las CDs y/o los AAs, afectarían el valor de P_{app} de SDZ y para poder estimar un posible valor de % Fa para este IFA.

Al final de cada experimento, se determinó la concentración residual del IFA en la fase donora y se calculó el balance de masa, para determinar la cantidad del mismo retenida por la membrana artificial lipofílica. El porcentaje del compuesto recuperado (R%) se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación (Ecuación 3.5):

$$R\% = \frac{C_{r,final}V_r + C_{d,final}V_d}{C_{d,0}V_d} 100 \quad \text{Ec 3.5}$$

Donde C_{r,final} y C_{d,final} son las concentraciones medidas al final del experimento en los compartimientos receptor y donor, respectivamente; C_{d,0}, la concentración inicial en el compartimiento donor y V_r y V_d, los volúmenes de los compartimientos receptor y donor, respectivamente.

3.3 Resultados y Discusión

3.3.1 *Correlación entre el valor de P_{app} a partir de la membrana artificial y el % Fa.*

Se seleccionaron, como se comentó anteriormente, una serie de IFAs con estructuras diversas y datos de % Fa conocidos; los mismos se eligieron para demostrar la conveniencia del método de permeabilidad *in vitro* desarrollado y poder evaluar así su habilidad predictiva.

Se optó por utilizar las soluciones reguladores de pH 7,4 y de pH 5,5 (compartimento donador), debido a que la permeabilidad, a través de estas membranas, es fuertemente dependiente del pH, especialmente para aquellos IFAs que poseen valores de pKa cercanos al pH del medio utilizado, atribuyendo este comportamiento, a la modificación del estado de disociación de los mismos en solución. Esto indica la importancia de la consideración de diferentes valores de pH en los ensayos de permeabilidad usados para predecir la absorción oral en humanos.¹³

Se usaron celdas de difusión de Franz horizontales y agitación a ambos lados de las mismas, para disminuir el espesor de la capa acuosa estática (siglas en inglés, *UWL*), que se encuentra adyacente en ambos lados de la membrana artificial (Figura 3.5).¹⁵

En términos físicos, el *UWL* es una región sin agitación, a través de la cual el IFA debe difundir con la finalidad de entrar, o en el correspondiente caso salir, de la membrana artificial. Así, como el soporte del filtro, el *UWL* se puede considerar como otra barrera de difusión.¹⁵ Se podría pensar, por ello, que el impacto en la cinética de paso del IFA dependerá de las dimensiones del *UWL*. Entonces, se procedió a agitar a ambos lados de la celda, para poder disminuir el espesor del *UWL*.²⁹ Diferentes técnicas se han propuesto para conseguir una correcta agitación, como las barras magnéticas, que se utilizaron en este caso.

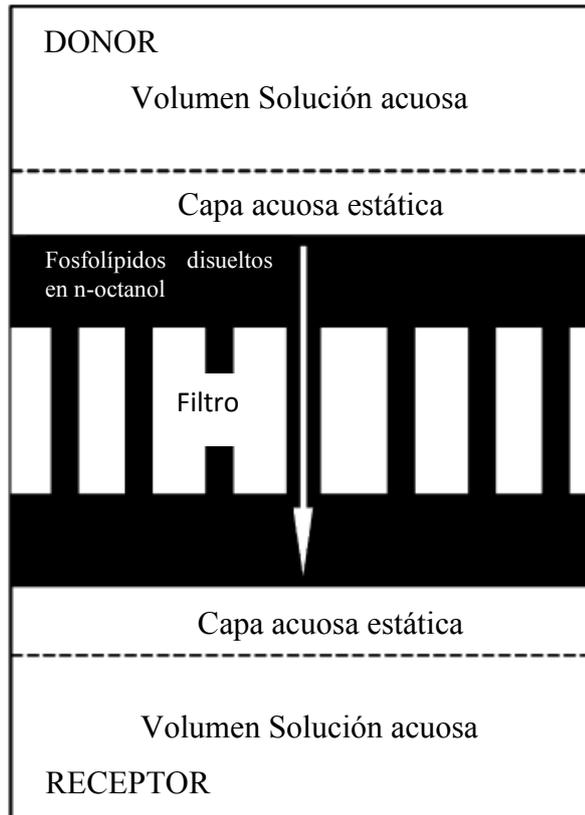


Figura 3.5. Esquema de un ensayo de permeabilidad.¹⁵

Por otro lado, se evaluó el paso de tres IFAs (atenolol, furosemida y propranolol) a través del soporte de éster de celulosa, sin el agregado de los fosfolípidos disueltos en el solvente orgánico y con un pH de 7,4 para los sitios donador y receptor. Se observó un gran paso de los IFAs a través del soporte, confirmando que el soporte, por sí solo, no contribuye al valor de P_{app} obtenido por el método propuesto. Los respectivos valores obtenidos fueron $8,68 \times 10^{-5}$, $1,25 \times 10^{-4}$ y 4×10^{-6} cm/s, para furosemida, propranolol y atenolol, respectivamente.

3.3.1.1 Correlación de P_{app} y los datos de % Fa, en el modelo in vitro a pH 7,4-7,4.

A continuación, en la Tabla 3.2 se presentan los valores de P_{app} obtenidos experimentalmente por nuestro modelo, en condición de isopH (7,4, compartimento donador y receptor), en función de los datos de % Fa.

Tabla 3.2. Valores de Fa (%) obtenidos de literatura^{2,29} y de P_{app} obtenidos a partir del modelo *in vitro* realizado a pH=7,4-7,4.

IFA	Fa (%)	P _{app} / 10 ⁻⁵ cm/s ± DS	R%
ACICLOVIR	21	0,18± 0,02	78 ± 9
NORFLOXACINA	35	0,16 ± 0,03	-----#
ATENOLOL	52	0,40 ± 0,03	86 ± 3
FUROSEMIDA	60	0,68± 0,02	85 ± 5
ALLOPURINOL	70	0,9 ± 0,1	97 ± 9
HIDROCLOROTIAZIDA	70	1,0 ± 0,2	81 ± 2
CLORANFENICOL	90	2,9 ± 0,5	98 ± 13
PROPRANOLOL	93	1,1 ± 0,2	70 ± 4
AMOXICILINA	93	1,1 ± 0,3	82 ± 8
METOPROLOL	95	3,1 ± 0,5	106 ± 8
TEOFILINA	97	2,79 ± 0,08	103 ± 4
VERAPAMILO	98	2,9 ± 0,2	94 ± 19
CARBAMAZEPINA	100	1,7 ± 0,3	-----#
CAFEINA	100	1,6 ± 0,3	89 ± 2
ANTIPIRINA	100	3,0 ± 0,2	102 ± 11
KETOPROFENO	100	1,9 ± 0,2	110 ± 17

No se logró determinar el % R, debido a que las muestras se encontraban como una suspensión.

La posible relación entre los datos de P_{app}, obtenidos en nuestro modelo *in vitro* y el valor de % Fa, se investigó graficando los valores de P_{app} en función de los datos de % Fa de los correspondientes IFAs (Figura 3.6).

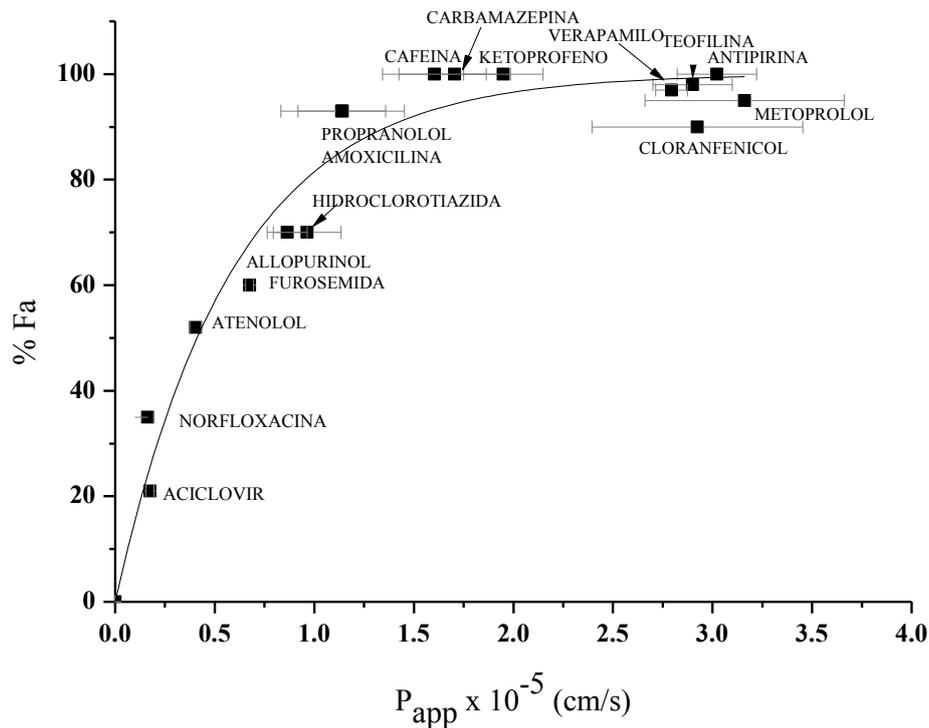


Figura 3.6. Valores de P_{app} (cm/s) en función del % Fa de los IFAs estándares a pH 7,4.

La siguiente ecuación (Ecuación 3.6), propuesta por Amidon et. al, 1988,³⁰ se aplicó para verificar la correlación entre los valores de P_{app} obtenidos y los datos de % Fa conocidos:

$$\%Fa = [1 - \exp(a \times P_{app})] \times 100 \quad \text{Ec 3.6}$$

Siendo, “a” el parámetro que correlaciona los valores del P_{app} del IFA obtenido en el modelo estudiado y el % Fa. Esta ecuación representa una expresión matemática de una curva asintótica, que indica que el valor de % Fa aumenta al incrementarse el valor de P_{app} , hasta que alcanza un determinado valor.

Al aplicar la ecuación (Ecuación 3.6) al modelo realizado, se pudo observar una correlación igual a $r^2 = 0,96$, entre los valores de P_{app} obtenidos con los diferentes IFAs estándares y los respectivos datos de % Fa. El valor del parámetro “a” obtenido fue igual a -168541 ± 12274 .

Los resultados alcanzados por este modelo *in vitro*, donde los valores de pH del compartimento donor y receptor fueron iguales a 7,4, podrían indicar, una buena habilidad predictiva del modelo para determinar el % Fa de un IFA.

Luego, se midió la P_{app} de otra serie de IFAs disponibles en nuestro lugar de trabajo, los cuales también poseían valores de % Fa en humanos conocidos, pero partiendo del dato de P_{app} obtenido, se aplicó la ecuación propuesta y se determinó la % Fa para verificar si el modelo era predictivo (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Datos de % Fa de los IFAs obtenidos de bibliografía³¹ y los correspondientes datos de % Fa obtenidos aplicando la ecuación obtenida a partir del modelo realizado.

IFA	$P_{app} / 10^{-5}$ cm/s \pm DS	% Fa (bibliografía)	% Fa (calculada a partir del modelo)
ÁCIDO ACETILSALICILICO	1,5 \pm 0,5	98	90 \pm 7
TRIMETOPRIMA	2,89 \pm 0,08	97	99,2 \pm 0,1
PIROXICAM	3,0 \pm 0,3	100	99,6 \pm 0,4

Como se puede observar, el modelo realizado es un buen predictor del % Fa para aquellos IFAs que poseen un valor de permeabilidad alta (mayor al 90%).

Para completar esta etapa de investigación, se procedió a graficar el valor de % Fa obtenido de literatura^{2,29} en función del valor de % de Fa estimado por el respectivo modelo (Tabla 3.4, Figura 3.7).

La línea recta negra (Figura 3.7) corresponde a la correlación lineal, las líneas de puntos al límite de confianza 95% y las líneas rectas azules, al límite de predicción 95%. Como es evidente, los valores de permeabilidad obtenidos, con nuestra membrana artificial, producen una buena correlación ($r^2 = 0,92$) entre los valores calculados por el modelo y los % Fa obtenidos en literatura; indicando una buena habilidad predictiva del método propuesto; la mayor parte de los datos están próximos a la línea de regresión, dentro del límite de confianza del 95%, y estando el total de los valores de % Fa estimados dentro del límite de predicción del 95%.

Tabla 3.4. Datos del % Fa para los 16 IFAs estudiados, obtenidos a partir de modelo *in vitro* diseñado y de lo informado en literatura.^{2,29}

IFA	% Fa calculado a partir del modelo <i>in vitro</i>	% Fa
1-ACICLOVIR	26 ± 2	21
2-NORFLOXACINA	24 ± 4	35
3-ATENOLOL	49 ± 2	52
4-FUROSEMIDA	71 ± 5	60
5-HIDROCLOROTIAZIDA	80 ± 6	70
6-ALLOPURINOL	77 ± 3	70
7-CLORANFENICOL	99 ± 1	90
8-PROPRANOLOL	85 ± 6	93
9-AMOXICILINA	85 ± 8	93
10-METOPROLOL	99,5 ± 0,3	95
11-TEOFILINA	99,03 ± 0,06	97
12-VERAPAMILO	99,2 ± 0,3	98
13-CARBAMAZEPINA	94 ± 3	100
14-CAFEINA	93 ± 3	100
15-ANTIPIRINA	99,4 ± 0,2	100
16-KETOPROFENO	96 ± 1	100

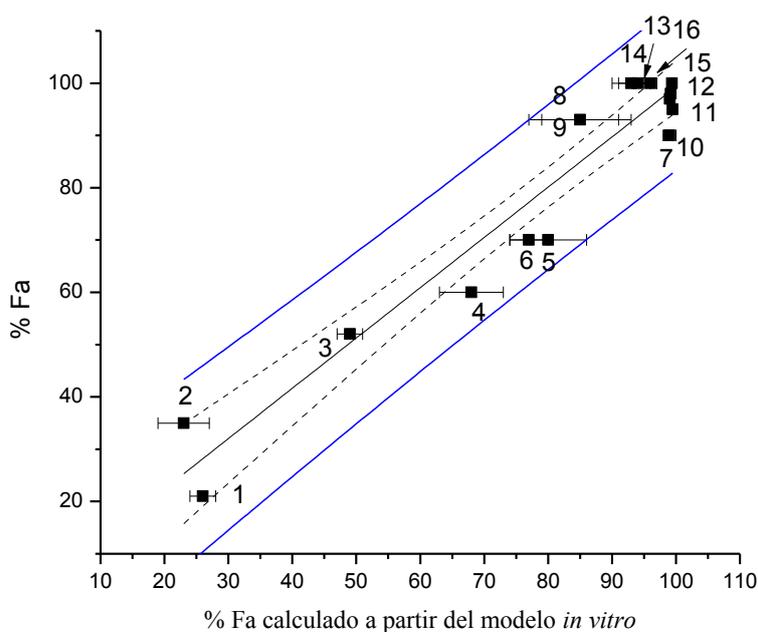


Figura 3.7. Relación del % Fa calculado a partir del modelo diseñado en función del informado en literatura para los 16 IFAs estudiados.

3.3.1.2 Correlación de P_{app} y los datos de % Fa, en el modelo *in vitro* a pH 5,5-7,4.

Se evaluó la correlación entre el valor de P_{app} obtenido con el modelo *in vitro* en función del % Fa, para el modelo realizado a un pH igual a 5,5 en el medio donador (Tabla 3.5, Figura 3.8)

Tabla 3.5. Valores de Fa (%) obtenidos de literatura ^{2,29} y de P_{app} obtenidos a partir del modelo de permeación *in vitro* a pH 5,5.

IFA	Fa (%)	$P_{app} / 10^{-5} \text{ cm/s}$ ± D.S	% R
ACICLOVIR	21	0,16 ± 0,04	103 ± 4
NORFOLOXACINA	35	0,53 ± 0,03	-----#
ATENOLOL	52	0,33 ± 0,02	99,7 ± 0,4
FUROSEMIDA	60	2,7 ± 0,4	96 ± 5
HIDROCLOROTIAZIDA	70	1,5 ± 0,5	92 ± 7
ALLOPURINOL	70	0,76 ± 0,08	91 ± 3
CLORANFENICOL	90	3,4 ± 0,4	99 ± 1
PROPRANOLOL	93	0,72 ± 0,03	82 ± 1
AMOXICILINA	93	0,10 ± 0,01	67 ± 5
METOPROLOL	95	1,6 ± 0,1	102 ± 4
TEOFILINA	97	2,7 ± 0,6	93 ± 8
VERAPAMILO	98	0,54 ± 0,09	105 ± 3
CAFEINA	100	1,6 ± 0,1	94 ± 8
CARBAMAZEPINA	100	1,78 ± 0,06	-----#
KETOPROFENO	100	7,2 ± 0,2	90 ± 12
ANTIPIRINA	100	4,4 ± 0,1	95 ± 7

No se logró determinar el % R, debido a que las muestras se encontraban como una suspensión.

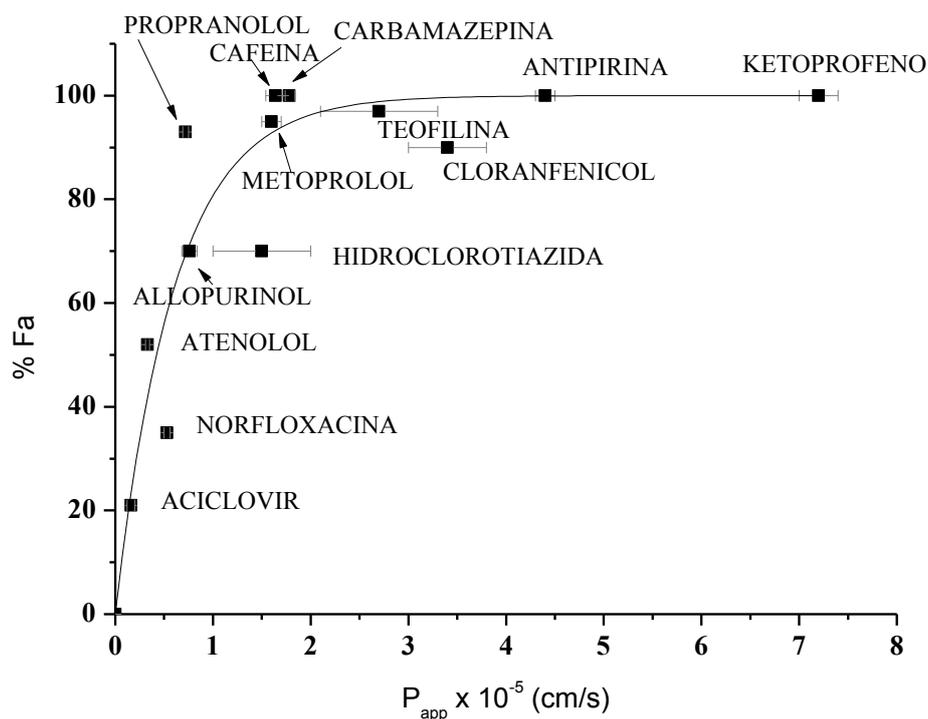


Figura 3.8. Valores de P_{app} (cm/s) en función de % Fa de los IFAs estándares a pH 5,5.

Se pudo observar una correlación (r^2) igual a 0,88 entre los valores de P_{app} obtenidos y los respectivos datos de % Fa, según la ecuación propuesta anteriormente (Ecuación 3.6), este valor de correlación fue menor, con respecto al obtenido en las condiciones de pH de 7,4-7,4.

El valor del parámetro “a”, fue igual a -163909 ± 22324 ; para este cálculo debió excluirse a los IFAs: furosemida, verapamilo y amoxicilina, ya que los mismos se desviaban de la correlación, por ello de los 16 estándares que se listan en la Tabla 3.4, solo se utilizaron 13 para realizar el gráfico de la Figura 3.8.

Para completar la investigación, al igual que con el modelo a pH 7,4-7,4, se procedió a graficar el valor de % Fa de literatura^{2,29} en función del valor de % de Fa estimado por el respectivo modelo (Tabla 3.6 , Figura 3.9).

Tabla 3.6. Datos del % Fa para los 16 IFAs estudiados, obtenidos a partir del modelo diseñado y de lo informado en literatura ^{2,29} (pH 7,4- 5,5).

IFA	% Fa calculado a partir del modelo <i>in vitro</i>	% Fa
1-ACICLOVIR	23 ± 5	21
2-NORFLOXACINA	58 ± 2	35
3-ATENOLOL	42 ± 2	52
4-FUROSEMIDA	98 ± 1	60
5-ALLOPURINOL	71 ± 4	70
6-HIDROCLOROTIAZIDA	91 ± 8	70
7-CLORANFENICOL	99,6 ± 0,3	90
8-PROPRANOLOL	70 ± 2	93
9-AMOXICILINA	15 ± 2	93
10-METOPROLOL	93 ± 1	95
11-TEOFILINA	99 ± 1	97
12-VERAPAMILO	59 ± 7	98
13-CARBAMAZEPINA	90 ± 2	100
14-CAFEINA	95 ± 1	100
15-ANTIPIRINA	99,8 ± 0,2	100
16-KETOPROFENO	99,995 ± 0,008	100

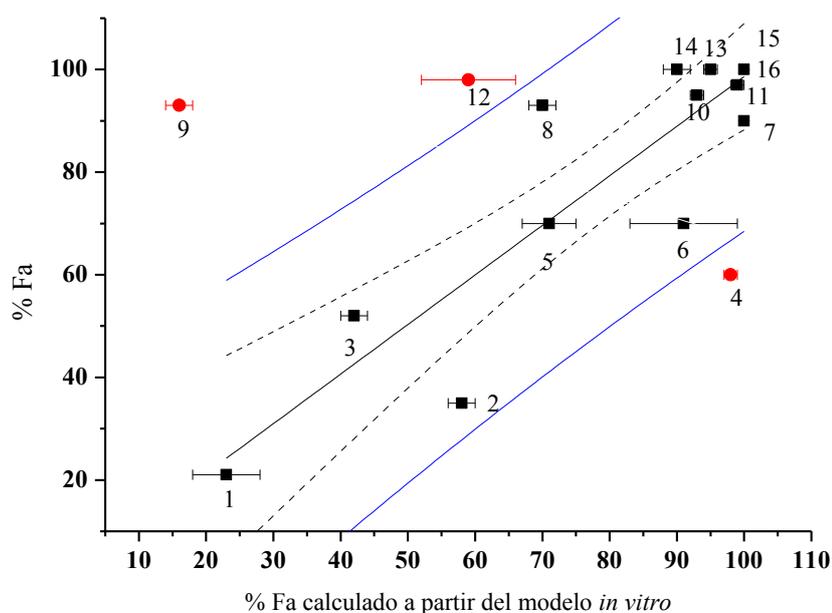


Figura 3.9. Relación del % Fa a partir del modelo diseñado (pH 5,5-7.4) en función del informado en literatura para los 16 IFAs estudiados.

Se pudo observar una correlación (r^2) igual a 0,77 (línea recta central), este valor de correlación fue menor, con respecto al del modelo realizado en condición de iso pH 7,4-7,4, al igual que lo observado cuando se compararon los valores obtenidos en la validación del mismo. Para esta correlación se excluyeron los IFAs, furosemida, amoxicilina y verapamilo (4, 9, 12, respectivamente). Las líneas de puntos son el límite de confianza 95% y las líneas rectas azules, el límite de predicción 95%. Como es evidente, la mayor parte de los datos están próximos a la línea de regresión, dentro del límite de confianza del 95% y dentro del límite de predicción del 95%, a excepción de los 3 IFAs mencionados con anterioridad (puntos rojos), donde podemos observar que, para amoxicilina y verapamilo se estima un % Fa menor al % Fa en humanos (falso negativo), y para furosemida, un valor de % Fa mayor al % Fa en humanos, por lo que se lo considera un valor falso positivo. El motivo por el cual estos IFAs se debieron excluir, puede ser atribuido, en el caso de la amoxicilina, a un porcentaje de recuperación menor (67%) con respecto a los demás, especulándose que parte del IFA quedó retenido en la membrana, por ello, la estimación del valor de % Fa para amoxicilina, fue menor al esperado; por otro lado, se conoce también que se absorbe tanto por transporte pasivo, a través de la membrana intestinal, como así también por un transporte activo mediado por oligopéptidos (Pep T1), localizados en la membrana apical del enterocito.³²

Por otro lado, furosemida presenta un valor de permeabilidad en donde el porcentaje puede fluctuar desde 60 a 70, pero en ciertos casos, la absorción es variable y errática.³³

3.3.2 Sensibilidad del modelo in vitro estudiado a ambos valores de pH

Como se muestra en las Figuras 3.6 y 3.8, el modelo realizado a pH de 7,4-7,4, es capaz de predecir correctamente la fracción absorbida de los 16 IFAs estudiados; mientras que el mismo modelo, pero realizado a un pH diferente en el sitio donador, e igual a 5,5, predice los valores de % Fa de 13 de los 16 IFAs estudiados, lo que equivale a un 81,25 % de los mismos. Es de gran interés preguntarnos si el modelo, realizado a ambos valores de pH, podría predecir el valor de % Fa de los diferentes IFAs; es por ello, que observando los valores de desviación estándar de los respectivos datos de P_{app} para los diferentes IFAs (citados en la Tablas 3.2 y 3.5) y los valores de correlación entre el % FA y los valores de P_{app} , se podría suponer que el modelo, a ambos valores de pH, es un

método reproducible, tanto para IFAs que presentan un valor bajo, como así también alto, de % Fa.

Las diferencias encontradas en el modelo desarrollado, a ambos valores de pH (7,4 y 5,5), con respecto a las membranas biológicas, pueden atribuirse a que tanto las membranas biológicas, como las artificiales, tienen similares valores de permeabilidad para aquellas moléculas no polares y muchas otras polares, pero pequeñas. Por otro lado, las membranas biológicas son más permeables que las artificiales a iones y algunas moléculas polares de gran tamaño ya que, en algunos casos, presentan proteínas de transporte que facilitan el paso selectivo, como es el caso, de amoxicilina y cefalexina.³⁴ Por ejemplo, en un entorno predominantemente ácido, un ácido débil estará neutro, pudiendo ser absorbido a través del transporte pasivo. Bajo estas condiciones experimentales, el pH del sistema regulador puede influir en el estado de ionización de estos IFAs y, por lo tanto, en los valores de P_{app} de los mismos.¹⁴

3.3.3 *Establecimiento del límite entre alta y baja permeabilidad propuesto en el SCB*

Por otro lado, como se comentó anteriormente, se considera que una sustancia medicamentosa es altamente permeable cuando se determina que la medida de absorción en humanos es del 90% o más de una dosis administrada, en base a una determinación de balance de masa o en comparación con una dosis de referencia intravenosa según la FDA,⁵ por otro lado, otros organismos como la EMEA (European Medicines Agency) y la OMS proponen que la medida de absorción en humanos sea del 85% o más de la dosis administrada.^{21,35}

Por lo expuesto en el párrafo anterior, se evaluó el límite entre alta y baja permeabilidad propuesto por Amidon³⁶ en el SCB, basándonos en los porcentajes comentados precedentemente (Figuras 3.10 y 3.11).

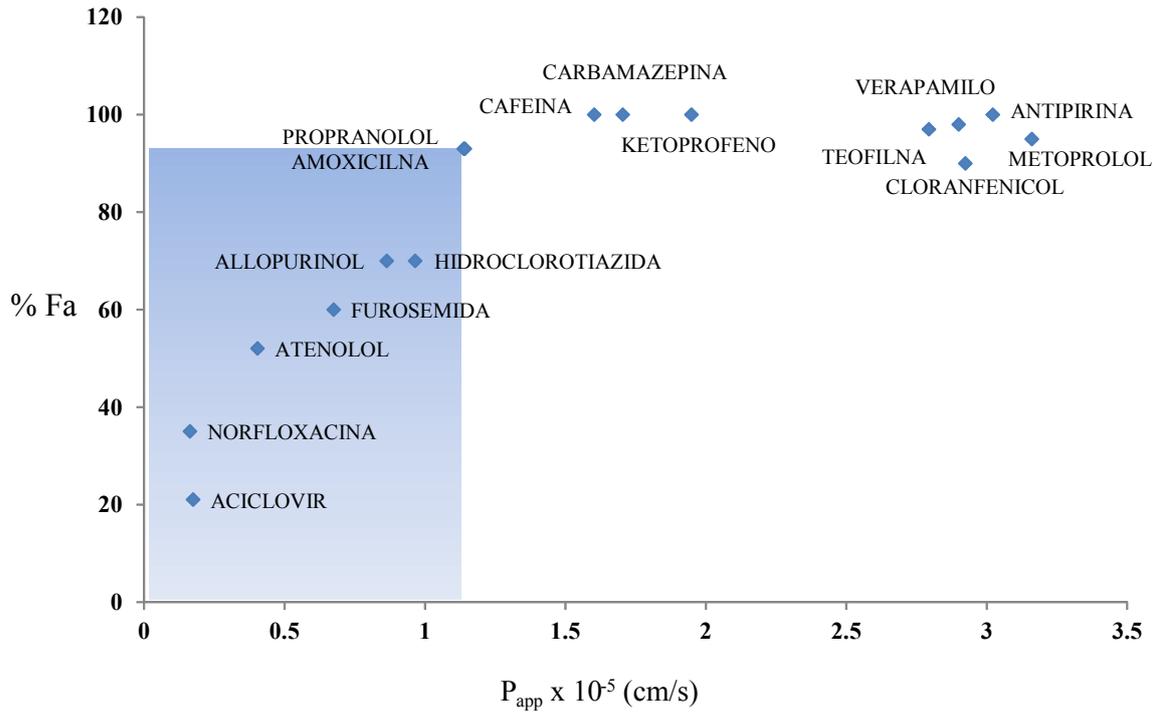


Figura 3.10. Limite entre baja (sector azul) y alta (sector blanco) permeabilidad propuesto para el modelo donde se mantienen iguales las condiciones de pH (7,4-7,4) de los sitios donador y receptor.

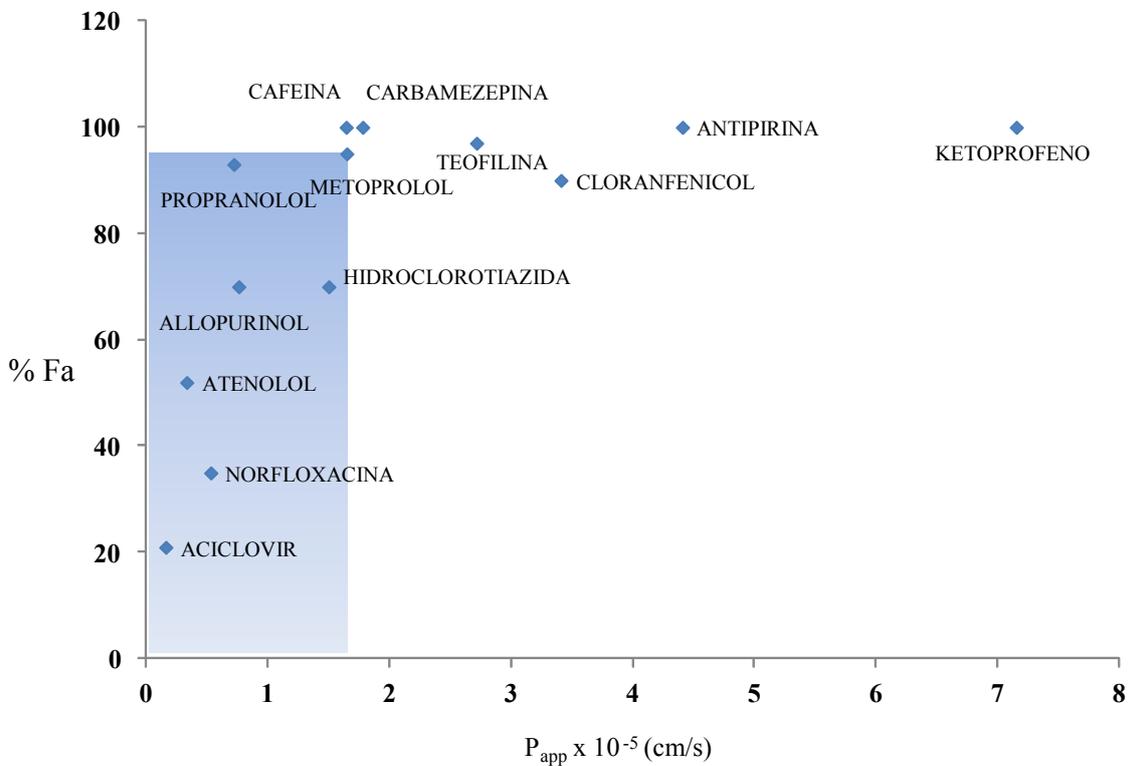


Figura 3.11. Limite entre baja (sector verde) y alta (sector blanco) permeabilidad propuesto para el modelo donde el pH del sitio donador es 5,5 y del receptor 7,4.

No hay ningún IFA oficial que represente el corte entre los valores considerados de alta o de baja permeabilidad, aunque Amidon³⁶ propuso al metoprolol (base; pKa 9,7).

Por ello, a partir del modelo presentado en este proyecto, a ambos valores de pH, se optó por determinar a aquellos IFAs de referencia, en base a las características ácido-base del metoprolol, de acuerdo a lo establecido por Amidon.

Se eligió a amoxicilina (ácido-base; pKa 2,4 y 9,6) y propranolol (base; pKa 9,5) como los IFAs de referencia, para determinar el límite de permeabilidad en el modelo a pH 7,4-7,4, por lo tanto, aquellos IFAs con valores de P_{app} mayores a $1,14 \times 10^{-5}$ (cm/s), son considerados, según este modelo *in vitro*, de permeabilidad alta. Por otro lado, se consideró a metoprolol como el IFA de referencia, para el modelo a pH 5,5, por lo tanto, para este sistema en particular, a aquellos IFAs con valores de P_{app} mayores a $1,6 \times 10^{-5}$ (cm/s), se los considera de permeabilidad alta.

Para la elección de los respectivos estándares, se siguieron los lineamientos de la FDA, donde establece un límite del 90% en el valor de % Fa;⁵ en estos casos en particular, los estándares seleccionados son los que presentan un valor próximo al establecido y además, observando los gráficos (Figuras 3.10 y 3.11), representan un límite que sectoriza a dos grandes grupos, aquellos IFAs que se los considera de baja, con respecto a los de alta permeabilidad.

3.3.4 Correlación entre $\log P_{o/a}$ y $\log D$, con respecto al valor de P_{app}

El $\log P_{o/a}$ y el coeficiente de distribución ($\log D$) son considerados como descriptores moleculares efectivos, indicativos de las propiedades de absorción de los IFAs,³⁷ por otro lado, dependiendo de este valor, también se pueden explicar los porcentajes de recuperación del modelo *in vitro* diseñado, ya que aquellos IFAs más lipofílicos, poseen un mayor tendencia a quedar retenidos en la membrana artificial.

Por este motivo, se evaluó la posible correlación entre los valores de $\log P_{o/a}$ y $\log D$ de ciertos compuestos estándares, cuyos datos fueron extraídos de bibliografía^{29,38} y el valor de P_{app} obtenido del modelo *in vitro* (pH 7,4-7,4), propuesto en este proyecto (Figuras 3.12 y 3.13).

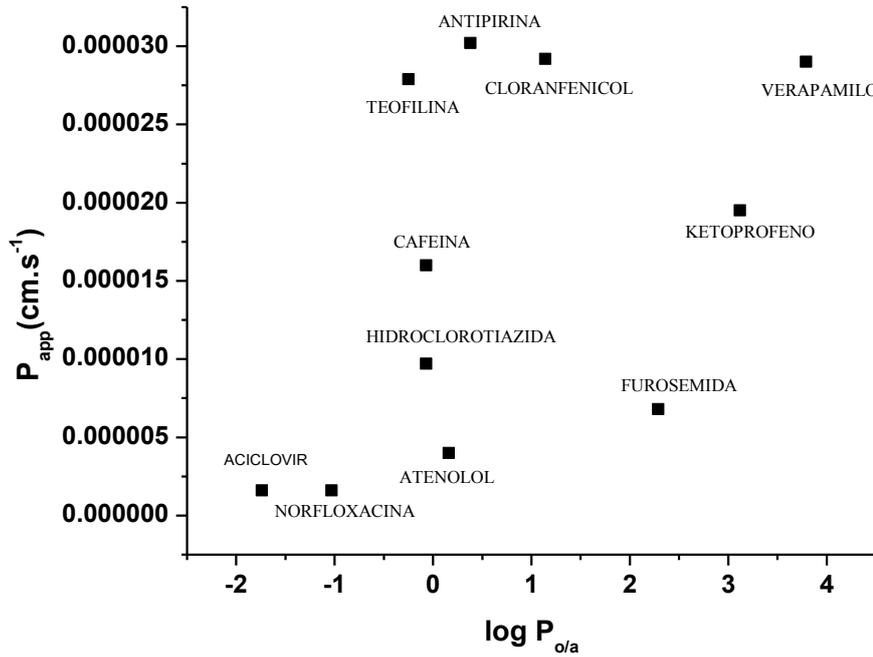


Figura 3.12. $\log P_{o/a}$ vs P_{app}

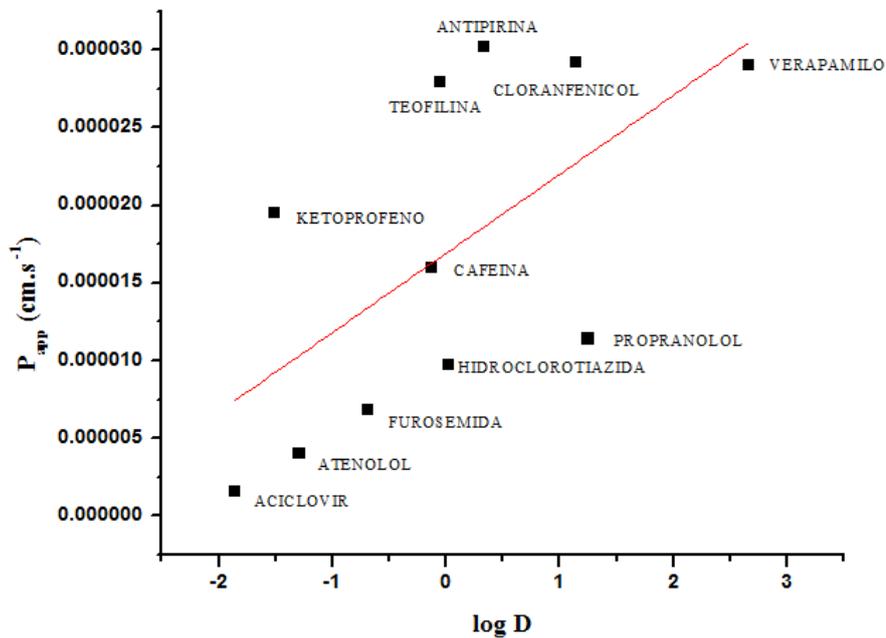


Figura 3.13. $\log D$ vs P_{app}

Como era de esperarse, los compuestos más lipofílicos (valores de $\log P_{o/a}$ y $\log D \geq 0$) generalmente mostraron valores mayores de P_{app} , no obstante, se observó una gran dispersión de los datos y no se considera que se obtuvieron correlaciones significativas. Tampoco se vió una correlación con el $\log D$ (r^2 igual a 0,32) aún cuando este parámetro

no sólo refleja la lipofilicidad intrínseca del IFA, sino también tiene en cuenta la ionización del mismo a pH fisiológico. Por lo tanto, se podrían considerar a estos parámetros como insuficientes para predecir de manera efectiva las características de absorción de los IFAs, al compararlo con el modelo *in vitro* desarrollado.

3.3.5 Efecto de las CDs y los AAs sobre el valor de permeabilidad aparente de SDZ

Dentro de los objetivos del actual capítulo, se propuso evaluar la conveniencia del método *in vitro* diseñado frente a SDZ y así poder comparar ese resultado de P_{app} , con los valores obtenidos de sus complejos de inclusión con CDs y/o AAs.

La SDZ pertenece al grupo de IFAs con características anfotéricas, ya que puede existir en dos formas ionizadas diferentes, dependiendo del pH del medio. A diferencia de otros IFAs que son solo ácidos o solo bases, un IFA anfotérico puede exhibir propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas únicas.³⁹

Por ello, se determinó el valor de P_{app} de SDZ y de los distintos complejos obtenidos, en condiciones de isopH 7,4-7,4 (Tabla 3.7, Figura 3.14).

Tabla 3.7. Valores de P_{app} de los distintos complejos en el sistema de pH 7,4-7,4.

	$P_{app} / 10^{-5} \text{ cm/s} \pm \text{D.S}$	% R
SDZ	$0,27 \pm 0,02$	81 ± 5
SDZ: β CD	$0,46 \pm 0,02$	78 ± 3
SDZ:HP β CD	$0,44 \pm 0,06$	98 ± 3
SDZ:M β CD	$0,47 \pm 0,06$	90 ± 4
SDZ: β CD:GLI	$0,86 \pm 0,04$	102 ± 3
SDZ: β CD:LEU	$0,46 \pm 0,05$	103 ± 3
SDZ: β CD:GLU	$0,61 \pm 0,09$	114 ± 11
SDZ: β CD:ASP	$0,65 \pm 0,1$	99 ± 1
SDZ: β CD:ARG	$0,43 \pm 0,04$	102 ± 2

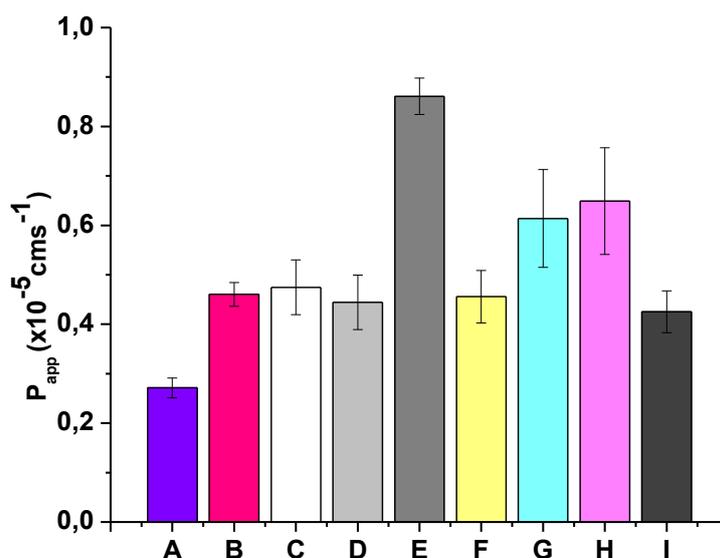


Figura 3.14. Datos de P_{app} de los complejos obtenidos: **A**-SDZ, **B**-SDZ: β CD, **C**-SDZ:HP β CD, **D**-SDZ:M β CD, **E**-SDZ: β CD:GLI, **F**-SDZ: β CD:LEU, **G**-SDZ: β CD:GLU, **H**-SDZ: β CD:ASP y **I**-SDZ: β CD:ARG.

El valor de P_{app} de SDZ se consideró estadísticamente diferente con respecto a los valores de P_{app} obtenidos para los diferentes complejos tanto binarios como ternarios, corroborado por la aplicación del Test t, $p < 0,05$.

El valor de P_{app} de SDZ: β CD se consideró estadísticamente similar a SDZ:M β CD y SDZ:HP β CD, SDZ: β CD:LEU y SDZ: β CD:ARG; mientras que se consideró diferente con respecto a SDZ: β CD:GLI, SDZ: β CD:GLU y SDZ: β CD:ASP.

Estos comportamientos pueden ser atribuidos, en parte y con respecto a los sistemas binarios, a que en un pH próximo al de este estudio (7,4), presentaron una constante de formación de complejo (K_s) del mismo orden de magnitud. Recordando el dato obtenido en el capítulo 2 de la Parte 1, estos valores son 55; 28,2 y 44 M^{-1} para los sistemas obtenidos con β CD, HP β CD y M β CD, respectivamente. El valor de P_{app} mayor se obtuvo con el complejo ternario SDZ: β CD:GLI. Este comportamiento puede ser atribuido, como comentamos anteriormente, a los valores de K_s obtenidos, en este caso para los complejos multicomponentes, donde se observó que para el complejo ternario con GLI se obtuvo el menor valor de K_s con respecto a los demás complejos ternarios (282 M^{-1} , dato obtenido a un pH de 5,78), lo que significa una menor estabilidad de formación de complejo con respecto a los demás sistemas, pudiéndose pensar que el IFA se libera de manera más

rápida, a partir del complejo, teniendo, ahora sí, mayor concentración disponible para ser absorbida. Una excepción a esta tendencia se dió cuando se observó el valor de K_s de GLU (136 M^{-1} a pH 5,22), lo que podría anticipar un aumento en el valor de P_{app} , lo cual no sucedió, este comportamiento podría deberse a que el aminoácido GLU, a los valores de pH de estudio se encuentra con una carga negativa más, con respecto a GLI; lo que dificultaría aún más la posibilidad de permear en el caso de que esto suceda. Si bien, los valores de K_s se obtuvieron en sistema acuoso (pH próximos a 6), se los utilizó en este caso, debido a que todos los AAs se encuentran en un mismo estado de ionización, a los diferentes valores de pH estudiados.

Se analizó el sistema binario SDZ:GLI (a pesar que en solución acuosa, a través de los estudios de DSF no se observaron aumentos de solubilidad, Parte 1, Capítulo 2), para evaluar si GLI ejercía algún efecto, en ausencia de β CD, sobre la P_{app} de SDZ. El valor obtenido fue igual a $0,4 \pm 0,1 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (% R= 100 ± 3), el cual es mayor con respecto a SDZ sola, pero inferior al sistema ternario SDZ: β CD:GLI, confirmando el efecto sinérgico que ejercen la GLI y la β CD, sobre el comportamiento de SDZ.

Luego se realizó la determinación de los valores de P_{app} de SDZ y de los distintos complejos obtenidos en el modelo *in vitro*, variando el pH entre el compartimento donador y receptor (pH 5,5-7,4), y se evaluó como influían las CDs y los AAs en el respectivo valor, con la finalidad, como se comentó en las secciones anteriores, de poder evaluar la incidencia del cambio de pH frente a los valores de P_{app} obtenidos para SDZ libre y acomplejada (Tabla 3.8, Figura 3.15).

Tabla 3.8. Valores de P_{app} de los distintos complejos en un sistema pH 5,5-7,4.

	$P_{app} / 10^{-5} \text{ cm/s} \pm \text{D.S}$
SDZ	$0,55 \pm 0,07$
SDZ: β CD	$1,1 \pm 0,1$
SDZ:HP β CD	$0,7 \pm 0,1$
SDZ:M β CD	$1,10 \pm 0,03$
SDZ: β CD:GLI	$1,0 \pm 0,2$
SDZ: β CD:LEU	$0,9 \pm 0,2$
SDZ: β CD:GLU	$0,96 \pm 0,05$
SDZ: β CD:ASP	$1,1 \pm 0,2$
SDZ: β CD:ARG	$0,81 \pm 0,09$

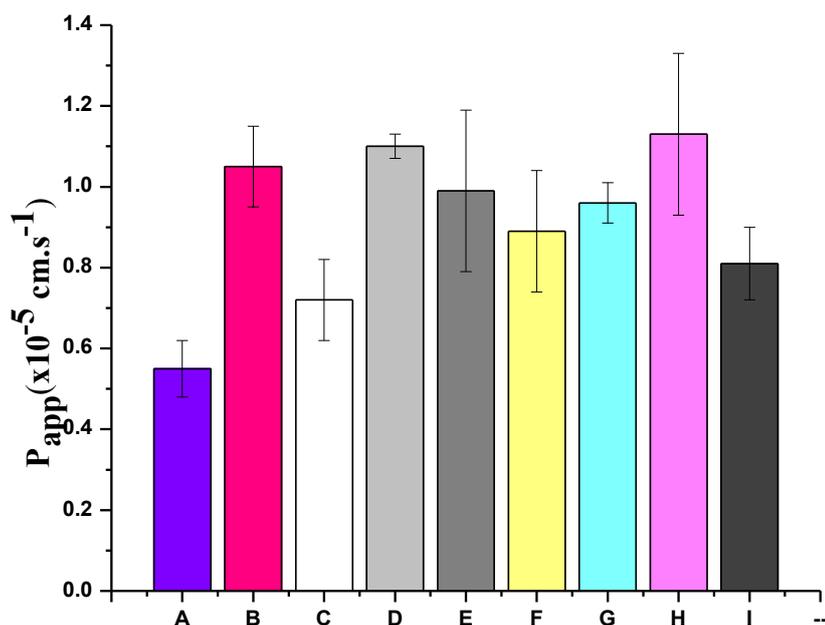


Figura 3.15. Datos de P_{app} de los complejos obtenidos: **A**-SDZ, **B**-SDZ:βCD, **C**-SDZ:HPβCD, **D**-SDZ:MβCD, **E**-SDZ:βCD:GLI, **F**-SDZ:βCD:LEU, **G**-SDZ:βCD:GLU, **H**-SDZ:βCD:ASP y **I**-SDZ:βCD:ARG.

Se observó que el valor de P_{app} de SDZ es considerado estadísticamente diferente con respecto a los valores de P_{app} obtenidos para los diferentes complejos, tanto binarios como ternarios, corroborados todos por la aplicación del Test t, $p < 0,05$.

El valor de P_{app} para SDZ, obtenido a partir del sistema SDZ:βCD, se consideró estadísticamente similar respecto a SDZ:MβCD, SDZ:βCD:LEU, SDZ:βCD:GLI, SDZ:βCD:GLU y SDZ:βCD:ASP, así como estadísticamente diferente en relación a SDZ:βCD:ARG y SDZ:HPβCD.

A pH 5,5 hay un mayor porcentaje de especie neutra de SDZ disponible para ser absorbida (99,95% para la especie básica y 86,68 % para la especie ácida), por esa razón, los valores de P_{app} a este pH, fueron mayores que los obtenidos a pH 7,4, donde los porcentajes de especie neutra fueron de 100% y de 7,36%, para los grupos básico y ácido, respectivamente. Debido a ello, la diferencia en los valores de P_{app} , con respecto a los obtenidos al pH de trabajo 7,4, se puede atribuir al grupo ácido (SO_2NH), ya que es el que presenta las mayores diferencias en los porcentajes entre la especie neutra y luego ionizada, a pH 5,5 y 7,4, respectivamente. El % R no se pudo obtener a pH 5,5, debido a

que los sistemas se presentaron en forma de suspensiones, no permitiendo la obtención de un valor apropiado de C_0 .

Cuando se analizaron los complejos, si bien se obtuvieron diferentes resultados, con todos se logró un aumento en el valor de P_{app} con respecto al de SDZ sola. Por otro lado, es interesante notar que el sistema SDZ: β CD:GLI presenta, en todas las situaciones a las que fue expuesto, valores de P_{app} similares (aplicación del Test T), independientemente del pH de estudio, este comportamiento es muy importante, debido a que en este caso, el estado de ionización del IFA no afectaría su capacidad de permeación, sino que estaría directamente relacionado al efecto sinérgico que ejercen la β CD y la GLI en la formación del complejo de inclusión con la SDZ. Además, este mismo sistema logró duplicar el valor de % Fa estimado para SDZ acomplejada con respecto a SDZ pura, aunque el aumento que se obtuvo no alcanzó para superar el valor de P_{app} propuesto como límite entre alta y baja permeabilidad para ambos modelos. Por lo expuesto, a SDZ pura y a sus complejos, se los podría clasificar, de acuerdo al SCB, como de baja permeabilidad (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. % Fa estimados a partir de modelo *in vitro* a los diferentes pHs, de SDZ y sus complejos.

	% Fa estimado a pH 7,4	% Fa estimado a pH 5,5
SDZ	37	59
SDZ: β CD	54	82
SDZ:M β CD	55	84
SDZ:HP β CD	52	69
SDZ: β CD:LEU	54	77
SDZ: β CD:ARG	52	73
SDZ: β CD:GLI	77	81
SDZ: β CD:GLU	64	79
SDZ: β CD:ASP	67	84

Las causas de este comportamiento, o sea, un aumento en el valor de P_{app} en todos los complejos formados, en base a datos bibliográficos⁴⁰ y considerando la formación de complejos de inclusión, se las puede atribuir a diferentes razones. Por un lado, la estructura química de la CD está asociada a un alto peso molecular (desde 972 hasta 2000

Da) y un bajo coeficiente de partición octanol/agua (desde -3 a 0), prediciendo que las CDs no penetran fácilmente las membranas; por lo tanto, la capacidad de las CDs y de sus complejos para difundir a través de las membranas artificiales depende del peso molecular nominal de la membrana, pero se ha informado que son capaces de penetrar las membranas con corte de peso molecular mayor a 3000 Da.⁴¹ Por ende, se podría suponer que solo el IFA libre es capaz de permear la membrana lipofílica, mientras que un exceso de CD es necesario para solubilizarlo en el exterior acuoso. En efecto, se podría pensar que, en un primer instante, ocurre una disminución en el valor de permeabilidad a través de la membrana, ya que el IFA se encuentra aún acomplejado, pudiendo asociarse este evento con los valores de constante de formación de complejos (capítulo 2, parte 1) obtenidos para los diferentes sistemas, para luego lograr un aumento, a partir del IFA libre. Además, si ocurren interacciones hidrofóbicas y si están presentes moléculas de agua en la superficie de la membrana, éstas pueden tener implicancia sobre los efectos biológicos de los IFAs, incluida su habilidad para permear varias barreras biológicas.

Con respecto al ancho de la *UWL* (Capa acuosa estática, siglas en inglés), que rodea la membrana, *in vivo*, es de aproximadamente 10-100 μm , mientras que *in vitro* es por lo general, superior a 1000 μm . No obstante, el ancho de la *UWL* depende también de las propiedades fisicoquímicas del IFA a permear, incluida su habilidad de formar iones, por lo cual no existe un espesor fijo de *UWL* para todos los IFAs,⁴⁰ así, la resistencia de la *UWL* a la difusión del IFA lipofílico puede ser importante.⁴¹

Por ello, en estas condiciones, la presencia de CD en la solución acuosa puede conducir a un aumento del gradiente de concentración del IFA en la capa de difusión, así como una mayor disponibilidad de moléculas de IFA libres junto a la superficie de la membrana, dando lugar a un aumento del valor de P_{app} del IFA en estudio.

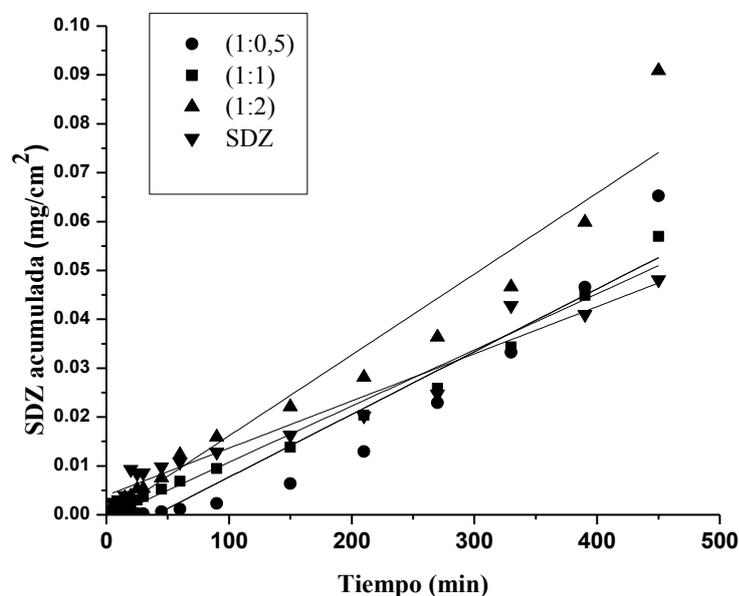
Por último, es importante agregar que las CDs son capaces de extraer componentes lipofílicos (incluidos los fosfolípidos) de las biomembranas, como por ejemplo, del estrato córneo, pero se observó que pre-tratamientos de las membranas con CDs no aumentan generalmente la permeabilidad.^{42,43}

3.3.6 Efecto de la concentración de la βCD utilizada sobre la permeabilidad aparente de SDZ en el complejo SDZ: βCD .

Por último, se evaluó como afectaba la cantidad de CD incluida en el sistema frente a los valores de P_{app} de SDZ, manteniendo constante la concentración de la misma (0,4

mg/mL) y variando la concentración de β CD, para obtener las siguientes relaciones molares: 1:0,5, 1:1 y 1:2. Este procedimiento se realizó sólo con el modelo *in vitro* diseñado a pH 7,4 en ambos compartimentos (Figura 3.16 y Tabla 3.10).

A)



B)

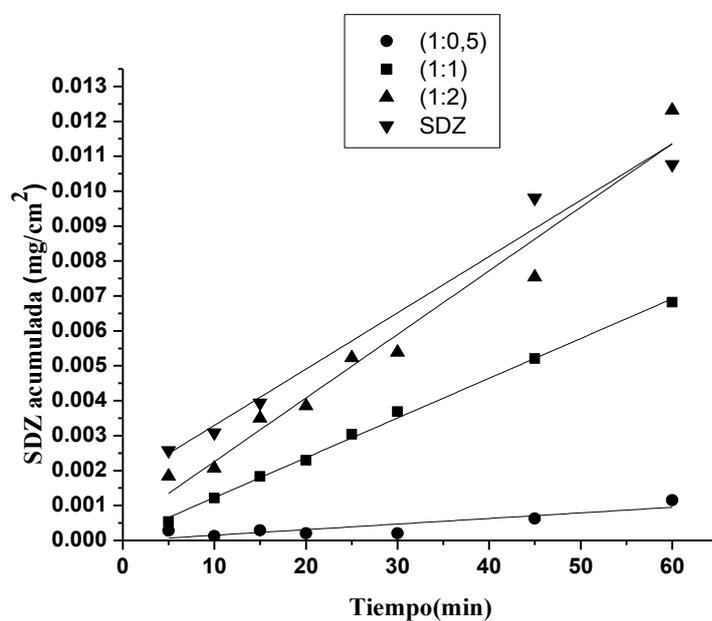


Figura 3.16. Cantidad acumulada de complejos formados entre la SDZ y la β CD a diferentes relaciones molares en función del tiempo: A) hasta 500 minutos y B) hasta 60 minutos.

Tabla 3.10. Valor de P_{app} de SDZ sola y de los complejos binarios considerando diferentes relaciones molares

	$P_{app} / 10^{-5} \text{ cm/s} \pm \text{D.S}$
SDZ	0,27 \pm 0,02
SDZ: β CD (1:0,5)	0,71 \pm 0,04
SDZ: β CD (1:1)	0,46 \pm 0,02
SDZ: β CD (1:2)	0,80 \pm 0,03

Se puede observar que, cuando SDZ está pura presenta, en una primera instancia un pasaje mayor a través de la membrana artificial, comparado con el de los complejos formados, aunque, luego de los 60 min (se considera este tiempo como el *lag time*), se estabiliza para pasar a tener un valor de P_{app} final menor, con respecto a los valores obtenidos para SDZ cuando se encuentra acomplejada con la CD, obteniéndose el valor mayor para la relación molar 1:2. Este comportamiento puede deberse a que los IFAs acomplejados con CD pasan a través de la membrana de manera más lenta, si es que la atraviesan, comparado con las moléculas de IFA libres, como consecuencia de estar insertos en la cavidad; pero la suma de la permeabilidad del complejo y la del IFA libre, puede lograr un aumento del flujo total de IFA permeado. Además, como se postuló anteriormente, la inclusión de CD en la solución puede conducir a un aumento del gradiente de concentración del IFA en la *UWL*, a pesar del espesor pequeño de esta última, así como a una mayor disponibilidad de moléculas de SDZ libre, próximas a la superficie de la membrana, dando lugar a un aumento en la tasa de flujo del IFA a través de la membrana artificial con el tiempo.

3.4 Conclusión

Se diseñó una membrana artificial mediante la utilización de una mezcla de fosfolípidos disuelta en un solvente orgánico y se evaluó su comportamiento en un modelo *in vitro* utilizando celdas de difusión de Franz horizontales; los experimentos se realizaron a un pH de 7,4 en el compartimento receptor y de 5,5 y 7,4 en el compartimento donador. En el modelo realizado a un valor de pH de 7,4 (donor-receptor), se consideraron a amoxicilina y propranolol como los estándares para determinar el límite entre baja y alta permeabilidad, mientras que para el modelo realizado a los valores de pH

5,5 y 7,4 (compartimento donador y receptor, respectivamente), se consideró a metoprolol para establecer dicho límite.

Los complejos formados entre la SDZ, las CDs y/o los AAs, lograron aumentar el valor de P_{app} de SDZ, datos obtenidos a partir de los modelos diseñados, con respecto al valor de P_{app} del respectivo IFA puro. El complejo SDZ: β CD:GLI logró duplicar el % Fa estimado, independientemente del pH a estudiar. Este comportamiento es muy importante para este complejo debido a que se logró independizar la absorción del estado de ionización de SDZ. Por último, sobre la base de este resultado, se podría considerar que la combinación propuesta, entre el IFA, las CDs y los AAs, cada uno con sus consideraciones particulares, podría ser de gran utilidad en la aplicación como potenciadores de la permeabilidad de IFAs a nivel gastrointestinal.

3.5 Referencias bibliográficas

- 1) Maestrelli F, Cirri M, Mennini N, Zerrouk N, Mura P. Improvement of oxaprozin solubility and permeability by the combined use of cyclodextrin, chitosan, and bile components. *Eur. J Pharm Biopharm* 2011; 78: 385–93.
- 2) Sugano K, Hamada H, Machida M, Ushio H, Saitoh K, Terada K. Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay. *Int J Pharm* 2001; 228: 181–8.
- 3) Zhu C, Jiang L, Teng-Man C, Kin-Kai H. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *Eur J Med Chem* 2002; 37: 399–407.
- 4) Lobenberg, R, Amidon, GL. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur J Pharm* 2000; 50: 3-12.
- 5) The Biopharmaceutics Classification Systems (BCS) Guidance. US Food and Drug Administration (FDA). Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2001.
- 6) Dahan A, West BT, Amidon GL. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPiP) approach in the rat. *Eur J Pharm Sci* 2009; 36: 320–29.

- 7) Vedani A, Descloux A, Spreafico M, Ernst B. Predicting the toxic potential of drugs and chemicals *in silico*: A model for the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *Toxicol Lett* 2007; 173:17–23.
- 8) Bergstrom, CAS., Strafford, M., Lazarova, L., Avdeef, A., Luthman, K., Artursson, P. Absorption classification of oral drugs based on molecular surface properties. *J Med Chem* 2003; 46: 558: 70.
- 9) Yamashita S, Furubayashi T, Kataoka M, Sakane T, Sezaki H, Sakane H, Tokuda H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* 2000; 10: 195-204.
- 10) Beck R, Pohlmann A, Hoffmeister C, Gallas M, Collnot E, Schaefer U, Guterres S, Lehr C. Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: Correlation between *in vitro* drug release and drug transport across Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 67: 18:30.
- 11) Bhagavan H, Chopra R, Craft N, Chitchumroonchokchai C, Failla M. Assessment of coenzyme Q10 absorption using an *in vitro* digestion-Caco-2 cell model. *Int J Pharm* 2007; 333: 112-17.
- 12) Verma RP, Hansch C, Selassie CD. Comparative QSAR studies on PAMPA/modified PAMPA for high throughput profiling of drug absorption potential with respect to Caco-2 cells and human intestinal absorption. *J Comput Aided Mol Des* 2007; 21, 3–22.
- 13) Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical High throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem* 1998; 41: 1007-10.
- 14) Buckley ST, Fischer SM, Fricker G, Brandl M. *In vitro* models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives. *Eur J Pharm Sci* 2012; 45: 235–50.
- 15) Nielsen PE, Avdeef A. PAMPA- a drug absorption *in vitro* model 8. Apparent filter porosity and the unstirred water layer. *Eur J Pharm Sci* 2004; 22: 33-41.
- 16) Avdeef, A. High-throughput measurement of membrane permeability. In: Van de Waterbeemd, H., Lennernäs, H., Artursson, P. (Eds.), *Drug Bioavailability/Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability*. Wiley-VCH, Weinheim, 2003, p 46-71.

- 17) Mälkiä A, Murtomäki L, Urtti A, Kontturi K. Drug permeation in biomembranes. *In vitro* and *in silico* prediction and influence of physicochemical properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2004; 23:13–47.
- 18) Nirasay S, Mouget Y, Marcotte I, Jerome P. Claverie. Supported bilayer on a nanopatterned membrane as model PAMPA membranes. *Int J Pharm* 2011; 421: 170–75.
- 19) Seoa PR, Teksina ZS, Kao JPY, Polli JE. Lipid composition effect on permeability across PAMPA. *Eur J Pharm Sci* 2006; 29: 259–68.
- 20) De Robertis EMF, Hib J. *Fundamentos de biología celular y molecular*. 3ra ed. Buenos Aires: El Ateneo, 2001.
- 21) World Health Organization (WHO). Proposal To Waive *In Vivo* Bioequivalence Requirements For The WHO Model List Of Essential Medicines Immediate Release, Solid Oral Dosage Forms. 17th list; 2011.
- 22) Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58: 265–78.
- 23) Stober H, De Witte W. Sulfadiazine. En: Florey K, editor. *Analytical Profiles of Drug Substances*. New York: Academic Press; 1982 pp 523-551
- 24) Brewster M, Noppe M, Peeters J, Loftsson T. Effect of the unstirred water layer on permeability enhancement by hydrophilic cyclodextrins. *Int J Pharm* 2007; 342: 250-53.
- 25) Uekama K, Hirayama F, Irie T. Cyclodextrin drug carrier system. *Chem Rev* 1998; 98: 2045-2076.
- 26) Loftsson T. Cyclodextrins and the biopharmaceutical classification system of drugs. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 2002; 44: 63–7.
- 27) Loftsson T, Konradsdottir F, Masson M. Development and evaluation of an artificial membrane for determination of drug availability. *Int J Pharm* 2006; 326: 60–8.
- 28) Shergel L, Wu-Pong S, Yu ABC. *Applied biopharmaceutical & pharmacokinetics* (5th ed.). New York: McGraw-Hill; 2005; pp. 102.
- 29) Corti G, Maestrelli F, Cirri M, Zerrouk N, Mura P. Development and evaluation of an *in vitro* method for prediction of human drug absorption II. Demonstration of the method suitability. *Eur J Pharm Sci* 2006; 27: 354-62.

- 30) Amidon GL, Sinko PJ, Fleisher D. Estimating human oral fraction dose absorbed, a correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier mediated compounds. *Pharm Res* 1988; 5: 651-654.
- 31) Kin-Kai H, Martin NE, Jiang L. Permeation prediction of M100240 using the parallel artificial membrane permeability assay. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2003; 6(3):315-320.
- 32) Lennerna H, Knutson L, Knutson T, Hussain A, Lesko L, Salmonson T, Amidon GL. The effect of amiloride on the in vivo effective permeability of amoxicillin in human jejunum: experience from a regional perfusion technique. *Eur J Pharm Sci* 2002; 15: 271–77.
- 33) Granero GE, Longhi MR, Mora MJ, Junginger HE, Midha KK, Shah VP, Stavchansky S, Dressman JB, Barends DM. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Furosemide. *J Pharm Sci* 2010; 99: 2544-56.
- 34) Miret S, Abrahamse L, De Groene ME. Comparison of in Vitro Models for the Prediction of Compound Absorption across the Human Intestinal Mucosa. *J Biomol Screen* 2004; 9: 598-606.
- 35) European Medicines Agency (EMA). Committee For Medicinal Products For Human USE (CHMP). Guideline On The Investigation Of Bioequivalence. London; 2010.
- 36) Amidon GL, Lennernås H, Shah VP, Crison JR. Theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, *Pharm. Res.* 1995; 12: 413–20.
- 37) Balimane PV, Chong S, Morrison RA. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J Pharmacol Toxicol Meth* 2000; 44: 301-12.
- 38) Faller B, Grimm HP, Grimm HP, Loeuillet-Ritzler F, Arnold S, Briand X. High-Throughput Lipophilicity Measurement with Immobilized Artificial Membranes. *J Med Chem* 2005; 48: 2571-6.

- 39) Tam KY, Avdeef A, Tsinman O, Sun N. The Permeation of Amphoteric Drugs through Artificial Membranes - An in Combo Absorption Model Based on Paracellular and Transmembrane Permeability (dagger). *J Med Chem* 2009; **53**(1):392-401.
- 40) Loftsson T, Vogensen SB, Brewster ME, Konradsdottir F. Effects of Cyclodextrin on Drug Delivery Through Biological Membranes. *J Pharm Sci* 2007; **96** (10): 2532-46.
- 41) Nogueiras-Nieto L, Sobarzo-Sánchez E, Gómez-Amoza JL, Otero-Espinar FJ. Competitive displacement of drugs from cyclodextrin inclusion complex by polypseudorotaxane formation with poloxamer: Implications in drug solubilization and delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2012; **80**: 585–95.
- 42) Loftsson T, Brewster M, Másson M. Role of cyclodextrin in improving oral drug delivery. *Am J Drug Deliv* 2004; **2** (4): 261-275.
- 43) Tsamaloukas A, Szadkowska H, Slotte PJ, Heerklotz H. Interaction of cholesterol with membranes and cyclodextrin characterized by calorimetry. *Biophys J* 2005; **89**: 1109-19.

En este capítulo se consideró la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de SDZ y de sus complejos con β CD y/o AAs, para evaluar si la formación de complejos afectaba la acción antibiótica del IFA.

CAPÍTULO

4

ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS DE SDZ Y SUS COMPLEJOS MULTICOMPONENTES

Alicia Delrivo

Ensayos Microbiológicos de SDZ y sus complejos multicomponentes

4.1 Introducción

Las sulfonamidas de uso en clínica médica, con propiedades antibacterianas, son derivados N¹-monosustituídos de la p-amino bencensulfonamida (sulfonilamida), caracterizada por un núcleo benceno con un grupo amino (NH₂) y otro amido (SO₂NH₂) (Figura 4.1).^{1,2}

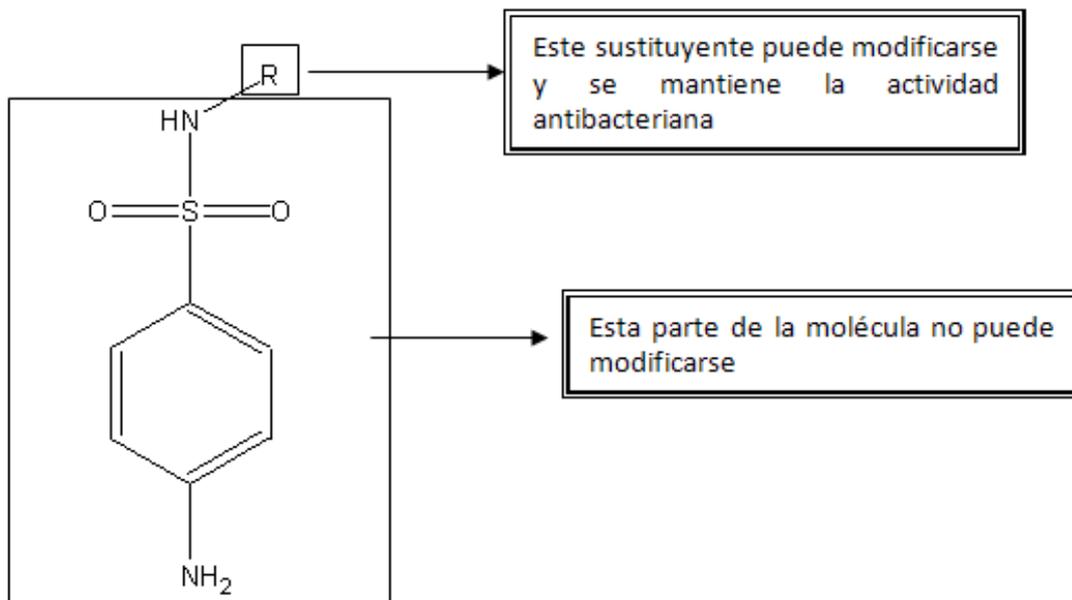


Figura 4.1. Estructura general de las sulfonamidas.

Las sulfonamidas actúan sobre las bacterias en crecimiento inhibiendo la síntesis microbiana del ácido tetrahidrofólico, por lo que producen un efecto bacteriostático. Las bacterias tienen que sintetizar el ácido tetrahidrofólico a partir del ácido p-amino benzoico (PABA) y de la pirofosforilmetil dihidropterina. Primeramente, se forma el ácido dihidropterico, el que después incorpora una molécula de ácido glutámico para producir el ácido dihidrofólico, el cual, a su vez, genera el ácido tetrahidrofólico en presencia de una dihidrofolato reductasa.

Las sulfonamidas son análogos estructurales del PABA e inhiben competitivamente la síntesis del ácido dihidropterico. El hombre, en cambio, no es afectado por esta inhibición debido a que no sintetiza el ácido fólico sino que lo ingiere con la dieta y luego lo reduce, por catálisis enzimática, a ácido tetrahidrofólico (FH₄).

El FH₄ se forman a su vez cofactores que interviene en la síntesis de purinas y pirimidinas, que son componentes esenciales del DNA y RNA y de los aminoácidos metionina y glicina.¹

En términos generales, las sulfonamidas son activas frente a un amplio espectro de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, por ejemplo, son eficaces en las enfermedades causadas por microorganismos tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, entre otros.

Los microorganismos sensibles a las sulfonamidas son los que sintetizan su propio ácido fólico; los que son capaces de utilizar ácido fólico o tetrahidrofólico preformado no son generalmente afectados por estos agentes.³ Cuando se alcanzan elevadas concentraciones en el organismo, como en el caso de infecciones urinarias, ejercen una acción bactericida.⁴⁻⁶ La SDZ, en particular, es un IFA que se ha usado para el tratamiento de nocardiosis, para infecciones del tracto urinario, para el tratamiento profiláctico de la fiebre reumática en pacientes alérgicos a las penicilinas y para infecciones sistémicas, por ejemplo en combinación con pirimetamina para el tratamiento de la toxoplasmosis o para la profilaxis de la malaria.

Actualmente se la está dejando de usar porque se requieren altas dosis de SDZ debido a su baja solubilidad, por lo cual se intentó la alcalinización de la orina, utilizando bicarbonato de sodio y de esta manera aumentar la solubilidad y evitar riesgos de cristaluria.¹

Un antibiótico se considera activo, frente a una bacteria, cuando inhibe su multiplicación. Su actividad se evalúa *in vitro*, determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM), que es la concentración mínima de antibiótico que inhibe el crecimiento visible del microorganismo. En el laboratorio, este parámetro, que cuantifica la sensibilidad, puede determinarse mediante técnicas de dilución en medio líquido, en medio sólido o por técnicas de gradientes de difusión. Todos estos métodos requieren una rigurosa estandarización del medio de cultivo, del inóculo bacteriano, de la temperatura, la atmósfera y el tiempo de incubación y de los criterios de lectura.⁷ Por ello, el objetivo de este capítulo fue estudiar el efecto de los complejos de inclusión con las CDs y/o los AAs, sobre la actividad microbiológica de SDZ, a través de la determinación de la CIM.

Los estudios microbiológicos se realizaron en colaboración con la Dra. V. Aiassa, del grupo de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

4.1 **Materiales y Métodos**

4.2.1 *Materiales*

SDZ (Parafarm, Argentina); β CD, HP β CD y M β CD fueron un obsequio de Roquette (agente Ferromet S.A en Argentina). L-Leucina (LEU) y L-Arginina (ARG) (SIGMA); Acido L-Aspártico (ASP) y Acido L (+)-Glutámico (GLU) (Anedra) y Glicina (GLI) (Todo Droga). Los experimentos fueron realizados con reactivos y solventes grado analítico.

4.2.2 *Estudios Antimicrobianos*

La CIM de SDZ y de sus complejos binarios y ternarios con la β CD y/o los AAs, se determinó mediante el método de macrodilución en caldo de acuerdo a las normas internacionales de CLSI (2006),⁸ contra la especie Gram-positiva *Staphylococcus aureus* 29213 y la especie Gram-negativa *Escherichia coli* 25922. El inóculo bacteriano se preparó suspendiendo 4 ó 5 colonias de cultivos de 18 h en Agar Mueller Hinton (AMH). Se ajustó la turbidez al 0,5 de la escala de Mc Farland, diluyéndose hasta obtener aproximadamente, 5×10^5 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) en cada tubo. Luego, se adicionó SDZ o sus complejos binarios y/o ternarios a diferentes concentraciones (0,125 a 256 μ g/mL). La lectura de la CIM se realizó luego de 20 h de incubación a 37 °C. La CIM fue definida como la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir en un 99,9% el crecimiento microbiano en relación al inóculo inicial (Figura 4.2).

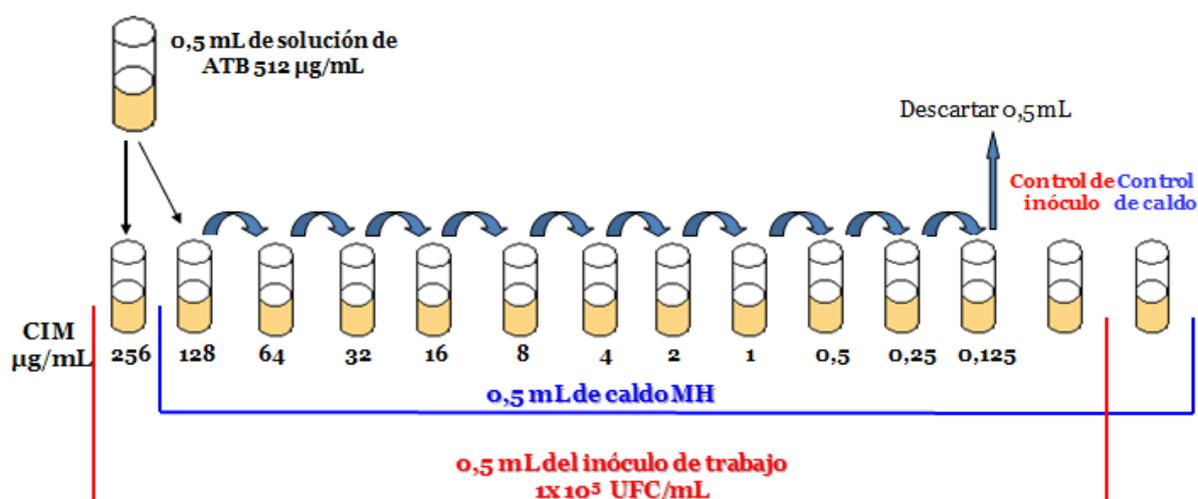


Figura 4.2. Esquema de determinación de la CIM

La SDZ se disolvió con una alícuota de DMSO (250 μ L, considerado cosolvente) y luego fue llevada a un volumen de 10 mL con medio de cultivo caldo Mueller Hinton (MH), hasta la obtención de una concentración final igual a 512 μ g/mL (concentración máxima que pudo obtenerse por la baja solubilidad acuosa que posee el IFA). De igual manera se trató a los complejos binarios y ternarios, los cuales se disolvieron en MH y fueron adecuadamente diluidos hasta obtener una concentración final igual a la de SDZ pura. Soluciones puras de las CDs, de los AAs y de DMSO fueron usadas como control negativo para descartar que estos compuestos presentaran efecto bacteriostático *per se*.

4.3 Resultados y Discusión

4.3.1 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de SDZ y de sus complejos binarios y ternarios, frente a las especies Gram-positiva (*S. aureus*) y Gram-negativa (*E. coli*), fue evaluada mediante la determinación de la CIM y luego comparada con SDZ pura. Los resultados se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Valores de CIM de SDZ pura y de sus complejos multicomponentes.

Bacteria	Compuesto	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>E. coli</i>	SDZ	> 256
	SDZ: β CD	> 256
	SDZ:M β CD	> 256
	SDZ:HP β CD	> 256
	SDZ: β CD:ARG	> 256
	SDZ: β CD:GLI	> 256
	SDZ: β CD:ASP	> 256
	SDZ: β CD:GLU	> 256
	SDZ: β CD:LEU	> 256
<i>S. aureus</i>	SDZ	> 256
	SDZ: β CD	> 256
	SDZ:M β CD	> 256
	SDZ:HP β CD	> 256
	SDZ: β CD:ARG	> 256
	SDZ: β CD:GLI	> 256
	SDZ: β CD:ASP	> 256
	SDZ: β CD:GLU	> 256
	SDZ: β CD:LEU	> 256

Los ensayos realizados revelaron que no aparecen diferencias significativas entre los complejos binarios o ternarios y la SDZ, es decir, la SDZ sola y sus complejos muestran una actividad antibacteriana equivalente ($>256 \mu\text{g/mL}$), sugiriendo que las interacciones, entre la SDZ y la CD en los complejos formados, son lo suficientemente fuertes como para aumentar la solubilidad del IFA, pero no tan fuertes como para ejercer efectos negativos sobre la actividad bacteriostática de SDZ, a las concentraciones que pudieron ensayarse, frente a *S. aureus* y *E. coli*.

Cabe destacar que la baja solubilidad de SDZ en el medio estudiado fue un obstáculo para una mejor evaluación de su actividad antimicrobiana, ya que no permite encontrar la CIM exacta para cada complejo.

Por otro lado, se corroboró que el DMSO y ninguna de las CD o AA evaluados, inhibieron el desarrollo de *E. coli* ni de *S. aureus*.

4.4 Conclusión

A través de los ensayos microbiológicos se pudo determinar que la acción antibiótica de SDZ frente a *S. aureus* y *E. coli*, no se ve afectada por la presencia de las CDs ni de los AAs, a las concentraciones ensayadas, lo que podría sugerir que la formación de complejos es un técnica favorable para el aumento de la solubilidad y permeabilidad del IFA, sin afectar su acción terapéutica, además de corroborar que las CDs y los AAs no poseen actividad antimicrobiana por si solos.

4.5. Referencias bibliográficas

- 1) Mascaretti OA. Bacteria Versus Antibacterial Agents: An Integrated Approach. Washington: ASM Press; 2003.
- 2) Flórez J. Farmacología Humana. Capítulo 6: Quinolonas. Sulfamidas. Trimetoprina. Cotrimoxazol. Nitrofurantoina. Antisépticos. España: Elsevier; 2003; pp. 1175-78.
- 3) Gennaro A R. Remington FARMACIA. Argentina: Editorial Medica Panamericana; 2003. 19 edición.
- 4) Connor, E.E. Sulfonamides antibiotics. Honorable mention paper Primary Care Update for OB/GYNS 1998; 5: 32–35
- 5) Sweetman S.C. *Martindale: The Complete Drug Reference*. 36 ed, 2009. London: Pharmaceutical Press.
- 6) Molinoff P.B. and Ruddon R.W. Goodman and Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. 9th ed. 1996. New York.
- 7) Guillermo Prats, Microbiología Clínica. 2005. Buenos Aires: Madrid: médica Panamericana. ISBN: 978-84-7903-971-4.
- 8) The Clinical and Laboratory Standars Institute (CLSI), Wayne, Pennsylvania, USA (CLSI, 2006).

En este capítulo se establecen las conclusiones y proyecciones generales de este trabajo de tesis.

CAPÍTULO

5

CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES

Alicia Delrivo

Conclusiones Generales y Proyecciones

5.1 Conclusiones Generales

En este trabajo de tesis se emplearon diferentes técnicas, tanto en solución acuosa, en estado sólido, así como los estudios teóricos, con la finalidad de medir los cambios en las características fisicoquímicas de la molécula de IFA y luego, para evaluar la formación de complejos con CDs y AAs. Los resultados indican que SDZ fue capaz de formar complejos de inclusión binarios y ternarios.

Todas las técnicas en su conjunto, permitieron observar que en solución, mediante los DSF, se obtuvieron los valores de K_s y se pudo determinar la formación de complejos solubles con las diferentes CDs y/o los AAs. Por otro lado, en los sistemas binarios, se observaron, en todos los casos, la formación de complejos solubles con una estequiometría 1:1. La información sobre la estructura supramolecular, sobre las especies involucradas en la interacción y sobre las fuerzas de enlace (puente hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas) entre el IFA, los AAs y las CDs en solución, se obtuvo por RMN, ROESY y DC, en combinación con métodos computacionales. Estas técnicas en conjunto permitieron obtener datos confiables y comparables frente a la formación de complejos de inclusión con CDs y confirmar que durante la formación del complejo, se forman enlaces no covalentes, los cuales afectan significativamente las características de solubilidad de SDZ.

Por otro lado, se observó que se logró una mayor solubilización cuando se combinó el efecto de la formación de complejo con la existencia del IFA como especie ionizada. Además, el agregado de los AAs, como tercer componente, resultó en un incremento de la solubilidad de SDZ, en comparación a lo que se esperaba cuando se adicionaron la CD o los AAs por separado.

Se emplearon 4 técnicas diferentes para la obtención de los sistemas en estado sólido entre la SDZ y la β CD, MF, CO, LI y SD, mientras que para los demás sistemas se utilizaron MF, LI y CO.

Los resultados obtenidos muestran que aquellos sistemas elaborados por la simple mezcla física presentan comportamientos similares a los de los compuestos individuales superpuestos, indicando que sólo contienen las especies libres. Cuando los sistemas son preparados por la técnica de CO, se podría pensar que se forman complejos, pero de manera incompleta. En cambio, cuando los sistemas son elaborados por la técnica de LI y de SD (éste último en el caso particular de SDZ: β CD), se podría concluir que se forman verdaderos complejos en estado sólido en todos los sistemas ensayados.

Por otro lado, en este trabajo de tesis se usó el método *in vitro* propuesto basado en una membrana artificial en combinación con las celdas de difusión de Franz horizontales. Este es un método simple, económico y rápido, que generó datos que se correlacionaron con los datos de fracción absorbida en humanos. Fue muy interesante su aplicación en la evaluación del comportamiento de permeabilidad, tanto del IFA puro como de los sistemas multicomponentes de la SDZ con las distintas CDs y los AAs.

Además, a través de los ensayos microbiológicos, se pudo determinar que la acción antibiótica de SDZ no se ve afectada por la presencia de las CD ni de los AAs.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se podría decir que SDZ, según el sistema de clasificación biofarmacéutica, es de CLASE IV (baja solubilidad y baja permeabilidad).

Si bien, con la formación de los complejos de inclusión, no se logró el cambio de clase en el SCB con respecto a los valores de permeabilidad, tomando los valores límites propuestos por el modelo *in vitro* diseñado, se obtuvieron aumentos importantes en el valor de % Fa estimado de este IFA, llegando a 77 y 81% para el complejo SDZ: β CD:GLI (lo que significó un aumento de 2 y 1,4 veces, a pH 7,4 y 5,5, respectivamente, en función del % Fa estimado para SDZ puro). Además, se verificó que mediante la formación de este complejo de inclusión, se logró independizar a los valores de P_{app} del estado de ionización de SDZ. Por otro lado, todos los complejos formados entre la SDZ, las CDs y/o los AAs, permitieron aumentar el valor de P_{app} del IFA.

Con respecto a los datos de solubilidad, se dice que un IFA presenta solubilidad alta cuando el valor de D_0 (número de dosis) es menor o igual a 1; por lo tanto, a aquellos valores de D_0 superiores a 1, se los considera de baja solubilidad (Ecuación 5.1):

$$D_o = \frac{M_o/V_o}{C_s} \quad \text{Ec. 5.1}$$

donde, M_o es la dosis más alta utilizada, V_o es equivalente a 250 mL y C_s es la solubilidad del IFA.

Aplicando esta ecuación, se vio que SDZ presenta un valor de D_o igual a 5,4, por cual se la considera, de solubilidad baja, mientras que los sistemas, tanto binarios como ternarios, lograron disminuir ese valor, siendo igual a 1,21; 0,80; 1,38; 0,3; 1; 1,25; 1,42 y 1 para SDZ: β CD, SDZ:M β CD, SDZ:HP β CD, SDZ: β CD:ARG, SDZ: β CD:GLI, SDZ: β CD:LEU, SDZ: β CD:ASP y SDZ: β CD:GLU, respectivamente.

Debido a estos resultados, SDZ pasó de ser de Clase IV a Clase III de acuerdo al SCB, en los sistemas SDZ:M β CD, SDZ: β CD:ARG, SDZ: β CD:GLI y SDZ: β CD:GLU.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta investigación, podemos postular que la interacción de SDZ, las CDs y los AAs, a través de la formación de complejos de inclusión, conduce a modificaciones importantes en las propiedades físico-químicas de la molécula huésped (SDZ), lo que sin duda tiene un efecto positivo sobre sus propiedades biofarmacéuticas. Además, el uso de adecuadas combinaciones de SDZ, CDs y AAs podría ser explotado para desarrollar oportunamente formas farmacéuticas orales de SDZ, capaces de mejorar simultáneamente la solubilidad y la permeabilidad del IFA y, en consecuencia, mejorar su biodisponibilidad, sin afectar su actividad microbiológica.

Con el agregado de AAs como tercer componente, en los sistemas elaborados a partir de las CDs, se demostró que se obtuvieron resultados sinérgicos y que podrían ser potenciales candidatos para el uso de los mismos, con la finalidad de aumentar la solubilidad y la permeabilidad de IFAs, cuando la cantidad de CD a utilizar se vea limitada.

Siguiendo la línea de investigación de nuestro grupo de trabajo “Estudio y Desarrollo de Estrategias Tecnológicas para Optimizar la Actividad Terapéutica de Fármacos mediante Formación de Complejos”, con la realización de este trabajo de tesis, se ha dado un paso más en el conocimiento de las CDs y sus potenciales aplicaciones en el campo de la biofarmacia y la tecnología farmacéutica, además de la innovadora incorporación de AAs a los sistemas. Por otro lado, el diseño del método *in vitro*, para estimar los % Fa, fue muy importante para la implementación de dicha técnica en nuestro grupo de investigación, para poder en un futuro, hacerla extensiva a otros tipos de IFAs.

Debido a todo ello, podría decirse que la selección de un contraión adecuado, así como de la CD correcta, es una estrategia poderosa para reformular IFAs genéricos de manera tal, que le aseguren un desempeño comparable con aquellos productos de última generación.

Por último, es importante destacar que para la realización de este trabajo de tesis, se emplearon numerosas y diferentes técnicas y metodologías que hicieron a la formación integral en el ámbito profesional y académico.

5.2 Proyecciones

Este trabajo de tesis presenta proyecciones orientadas a la realización de estudios teóricos de modelado molecular de los complejos ternarios, elaborados a partir de la β CD y los AAs, con la finalidad de relacionar los resultados que se obtengan con los de los estudios experimentales, pudiendo así obtener las orientaciones preferentes de SDZ y de los AAs dentro de la cavidad de la CD.

Por otro lado, continuar con los estudios de permeabilidad *in vitro*, abocados al estudio profundo de la membrana artificial obtenida, por medio de diferentes técnicas microscópicas, como lo es la microscopía de fuerza atómica. Y por último, evaluar el mecanismo por el cual las CDs logran aumentar el valor de permeabilidad aparente del IFA en estudio, ya que por medio de las técnicas aplicadas en nuestro lugar de trabajo, no se puede concluir.

ANEXOS

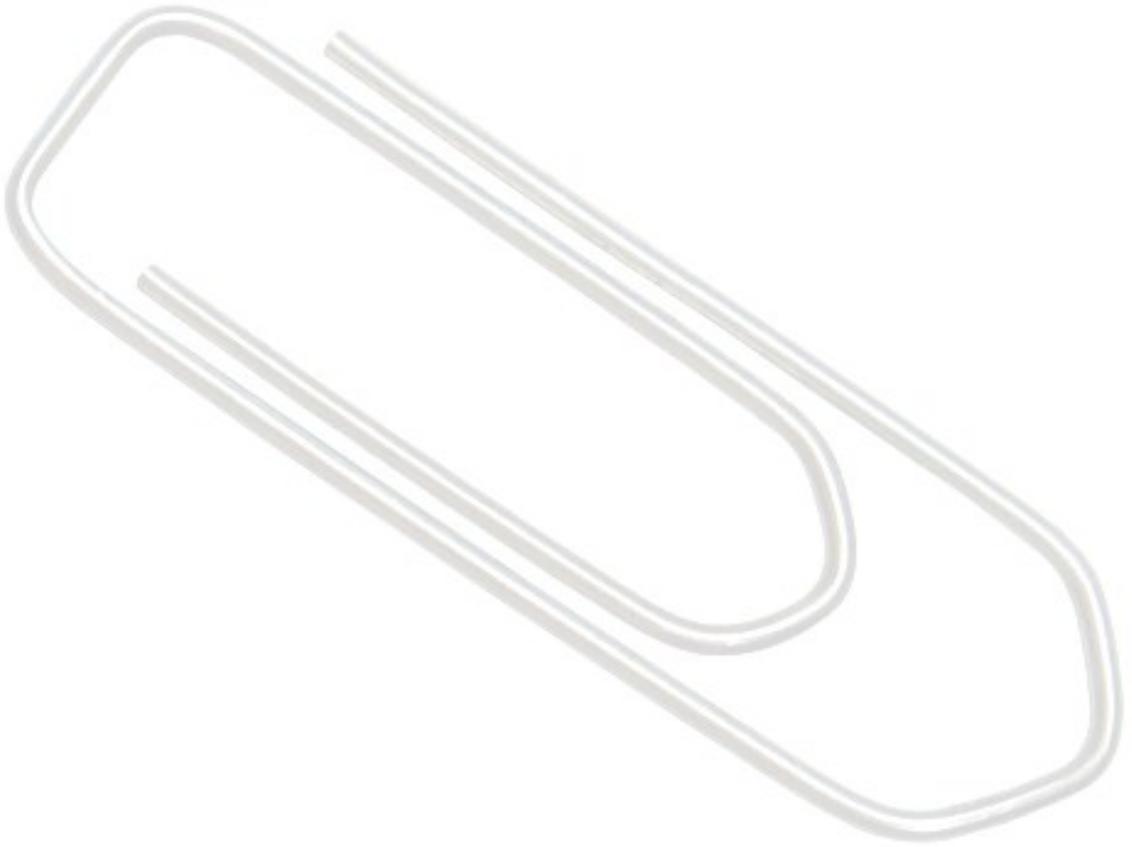


Diagrama de solubilidad de fase (DSF)

Implica la adición de un peso constante (en un exceso considerable) de un compuesto poco soluble, el sustrato (S), dentro de un tubo de ensayo. Se le agrega un volumen de solvente y sucesivas alícuotas de concentración crecientes de un compuesto (ligando o agente acomplexante), luego se cierran y se deja llegar al equilibrio de solubilidad a una temperatura constante (25 °C) por 72 Hs. Las soluciones obtenidas se filtran y son analizadas, para obtener la concentración total de compuesto S.

Posteriormente a eso, se construye un gráfico, el cual posee en el eje vertical la concentración total de compuesto S encontrado en la solución, en función de la concentración de ligando o agente acomplexante adicionado al sistema.

Los diagramas observados pueden ser de dos clases, con algunas variaciones dentro de cada una de ellas (Figura 1).

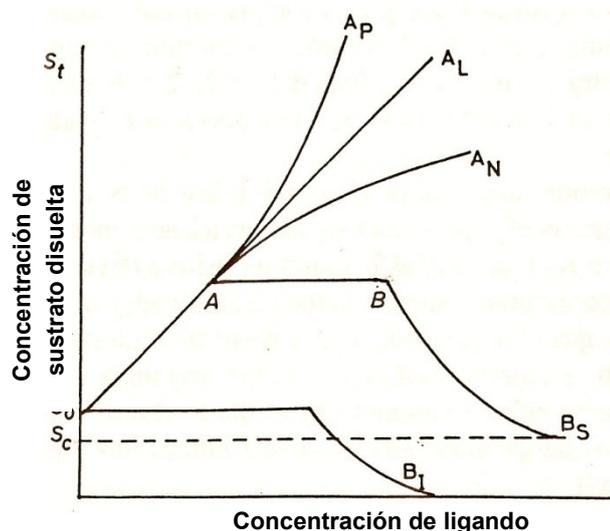


Figura 1. Tipos de Isotermas de Solubilidad.

Los diagramas **Tipo A** indican la formación de complejos solubles entre S y L, y de este modo incrementan la cantidad de S en la solución (A_L : presenta un incremento lineal de la solubilidad de S con respecto a las adiciones de ligando. Cuando hay una curvatura positiva o negativa, con respecto a la lineal son tipo A_P y A_N , respectivamente). Con el incremento de la solubilidad de estos sistemas, se esperan una o más interacciones moleculares entre S y L dando una especie química diferente, llamada complejo.

- ↻ Si los complejos poseen el ligando con orden uno, como por ejemplo pueden ser SL , S_2L , S_3L , se observa un diagrama de tipo A_L .
- ↻ Si los complejos presentan el ligando con un orden mayor a uno, como por ejemplo SL_2 , SL_3 , se produce un diagrama de tipo A_p .
- ↻ El origen del diagrama de tipo A_N es incierto. Esto puede asociarse con una alteración en la naturaleza del solvente en presencia de grandes concentraciones de L , protagonizando así un cambio en la constante de formación de complejo. Otra posibilidad es la asociación de L con él mismo a altas concentraciones.

Diagramas de **Tipo B** indican la formación de complejos insolubles.

B_S : desde S_0 a A , el sistema es similar a **Tipo A**, eso significa que la solubilidad aparente de S aumenta debido a la formación del complejo soluble entre L y S . En el punto A se llega a la solubilidad límite del complejo. Y luego, con la adición de más L , resulta la formación de más complejo, el cual precipita.

La curva B_I es interpretada de la misma manera, con la diferencia que el complejo formado es tan insoluble, que el aumento inicial en la concentración de S no se detecta.

Estimación de las constantes de equilibrio

Considerando un sistema de **Tipo A**, incluyendo también la porción inicial en aumento del diagrama **Tipo B_s** y suponiendo que un solo complejo, es el responsable del aumento de la solubilidad aparente de S. La constante de formación (o de estabilidad) del complejo para esta especie es igual a:

$$K_s = [S_m L_n] / [S]^m [L]^n$$

La concentración puede ser expresada en términos de cantidades conocidas,

$$\begin{aligned} [S] &= S_0 \\ [S_m L_n] &= \frac{S_t - S_0}{m} \\ [L] &= L_t - n[S_m L_n] \end{aligned}$$

donde S_0 es el equilibrio de solubilidad de S en ausencia de L, S_t es la concentración total de S disuelta, considerando el estado molecular y L_t es la concentración total adicionada de L.

Las ecuaciones antes nombradas pueden combinarse para dar una expresión de K_s en términos de concentraciones, m y n.

En este caso, la ecuación general quedaría:

$$S_t = \frac{m K_s S_0^m L_t}{1 + K_s S_0^m} + S_0$$

Un gráfico de S_t en función de L_t para la formación de un complejo $S_m L$ debería, por lo tanto, dar una línea recta (en el diagrama de tipo A). Donde, el intercepto es igual a S_0 y la pendiente da:

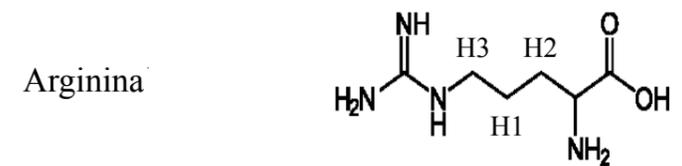
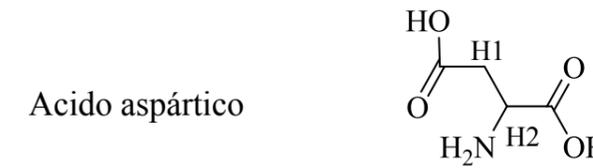
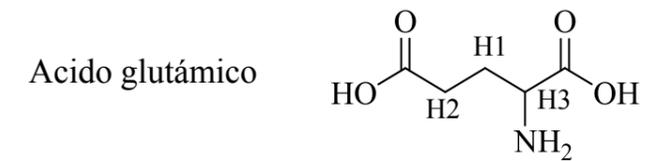
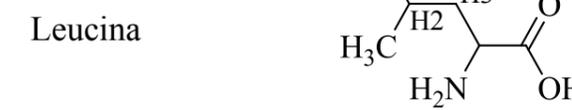
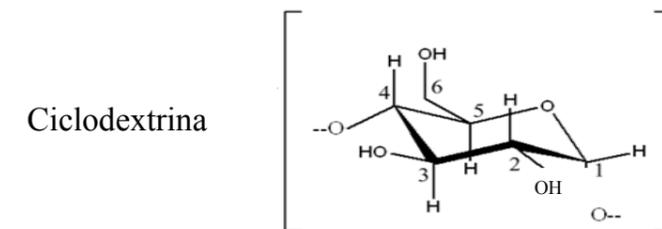
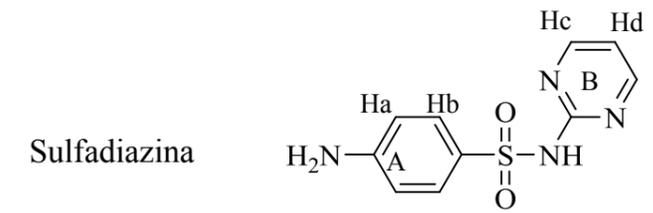
$$\text{pendiente} = \frac{m K_s S_0^m}{1 + K_s S_0^m}$$

Si el valor de m es conocido, la ecuación provee la forma básica para calcular la K_s de la pendiente del diagrama de **Tipo A**, en el caso de que m sea igual a 1 queda:

$$K_s(1:1) = \frac{\text{pendiente}}{(1 - \text{pendiente}) \times \text{intercepto}}$$

O sea que esta ecuación es aplicada para calcular la constante de estabilidad sobre la base de una relación estequiométrica 1:1.

Estructura química



Espectros de RMN de los complejos ternarios

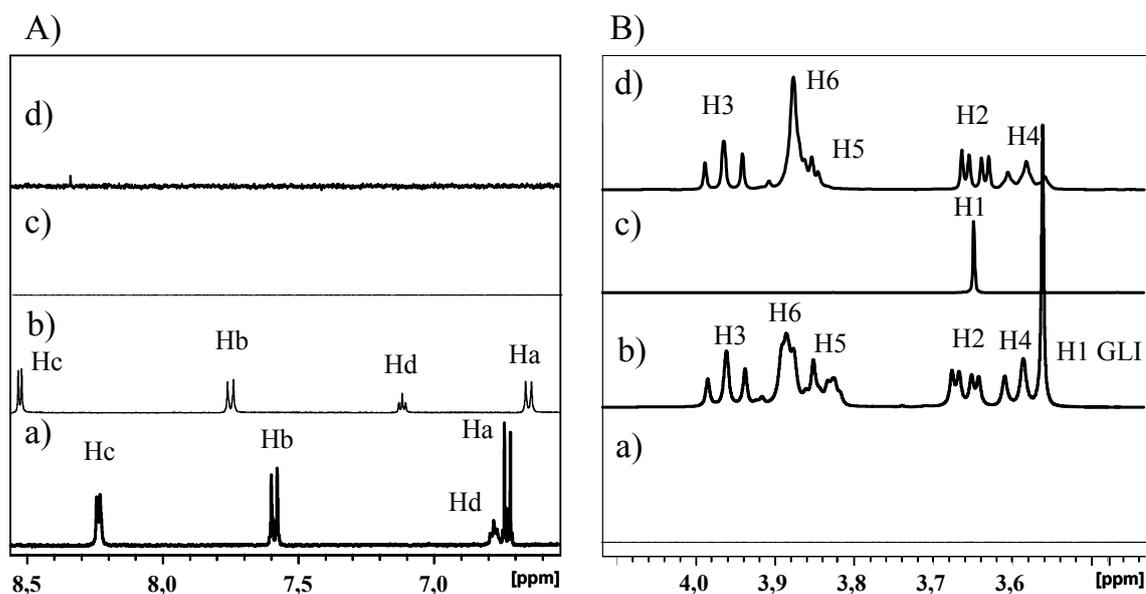


Figura 1. Espectro ^1H NMR SDZ (a), SDZ: β CD:GLI (b), GLI (c) y β CD (d). A) Corrimientos químicos de los protones de SDZ, en estado libre y acomplejado, B) Corrimientos químicos de los protones de β CD y GLI, en estados libre y acomplejado.

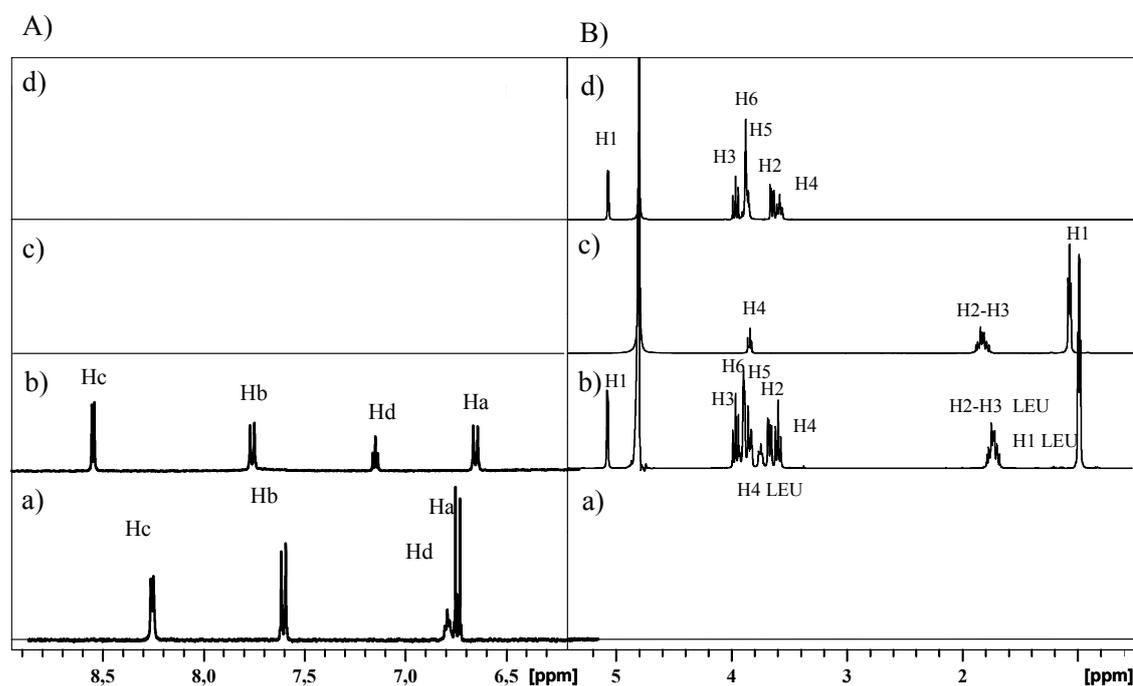


Figura 2. Espectro ^1H NMR SDZ (a), SDZ: β CD:LEU (b), LEU (c) y β CD (d). A) Corrimientos químicos de los protones de SDZ, en estado libre y acomplejado, B) Corrimientos químicos de los protones de β CD y LEU, en estados libre y acomplejado.

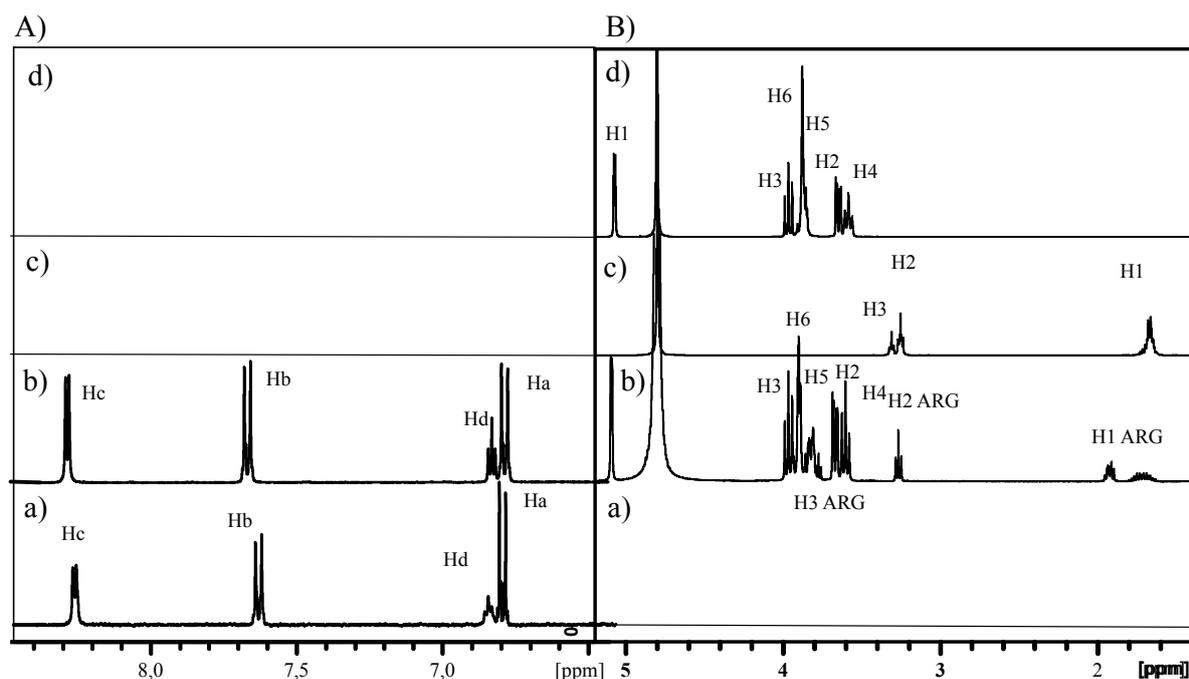


Figura 3. Espectro ^1H NMR SDZ (a), SDZ: β CD:ARG (b), ARG (c) y β CD (d). A) Corrimientos químicos de los protones de SDZ, en estado libre y acomplejado, B) Corrimientos químicos de los protones de β CD y ARG, en estados libre y acomplejado.

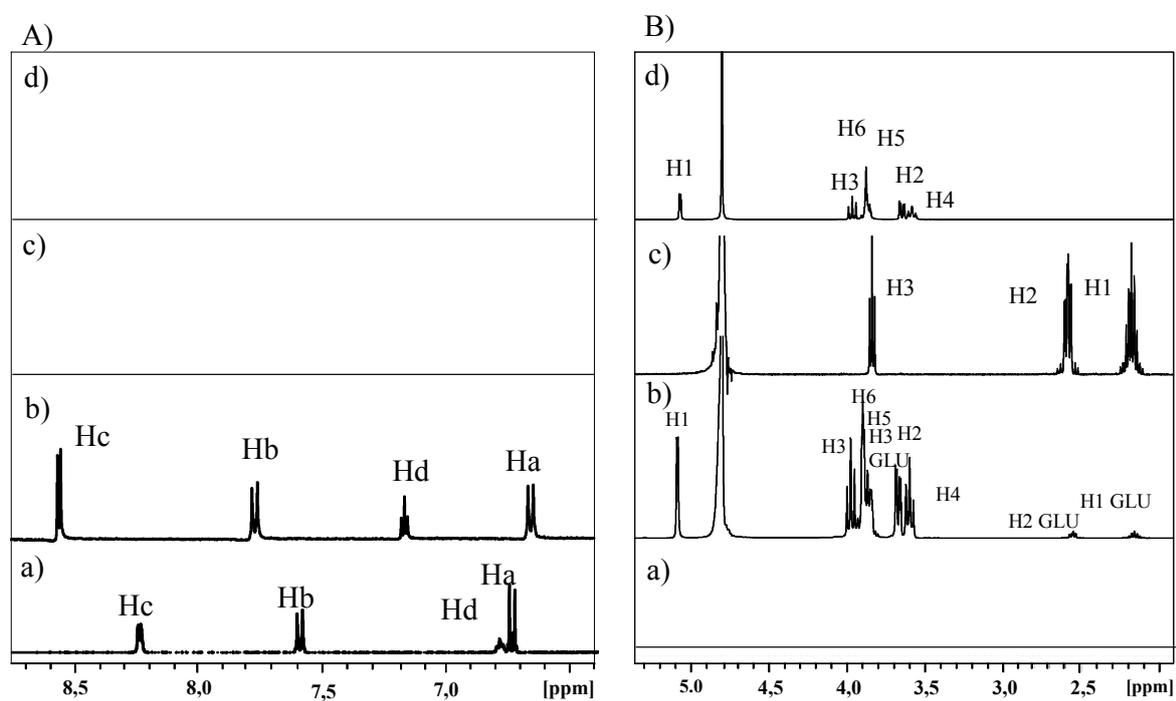


Figura 4. Espectro ^1H NMR SDZ (a), SDZ: β CD:GLU (b), GLU (c) y β CD (d). A) Corrimientos químicos de los protones de SDZ, en estado libre y acomplejado, B) Corrimientos químicos de los protones de β CD y GLU, en estados libre y acomplejado.

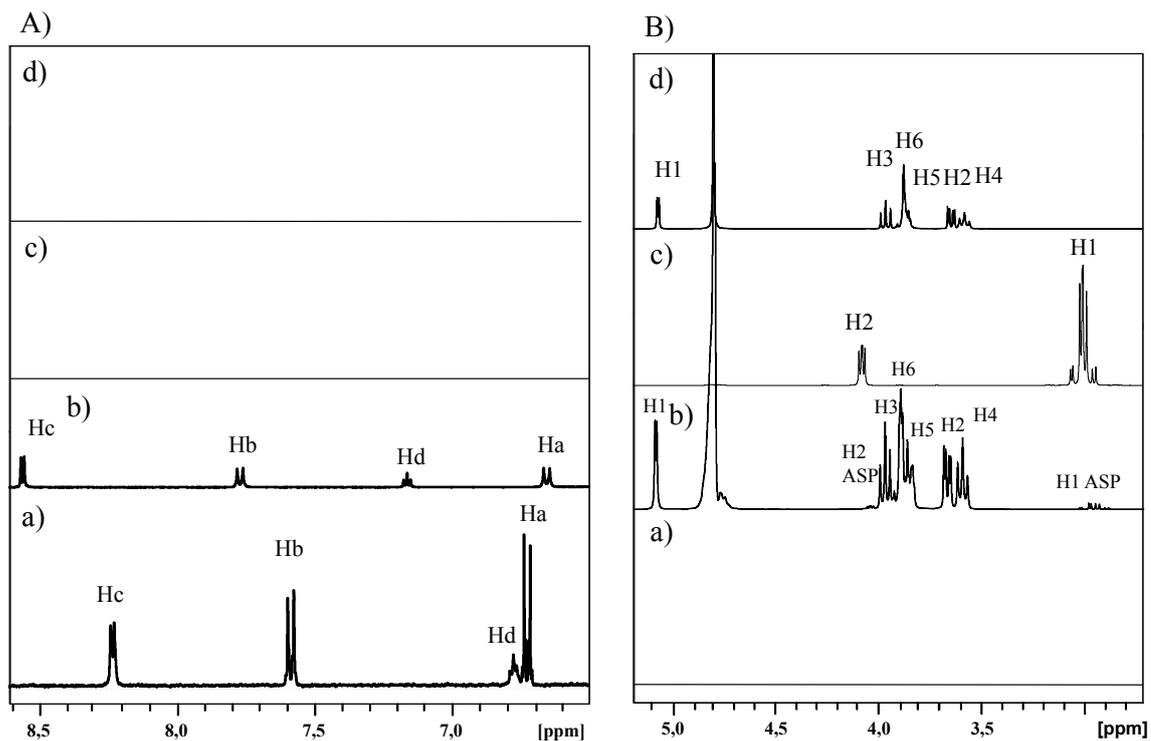


Figura 5. Espectro ^1H NMR SDZ (a), SDZ: β CD:ASP (b), ASP (c) y β CD (d). A) Corrimientos químicos de los protones de SDZ, en estado libre y acomplexado, B) Corrimientos químicos de los protones de β CD y ASP, en estados libre y acomplexado.

Gráficos de DSC, ATG y TG de los Complejo ternario

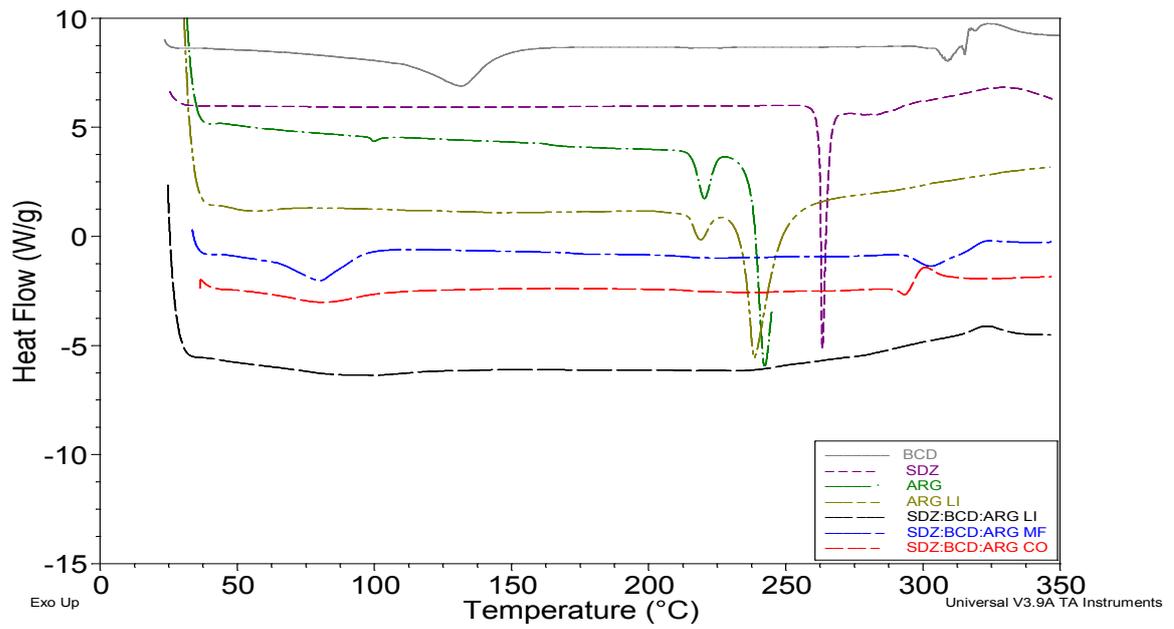


Figura 1. Curvas de DSC del complejo ternario con ARG.

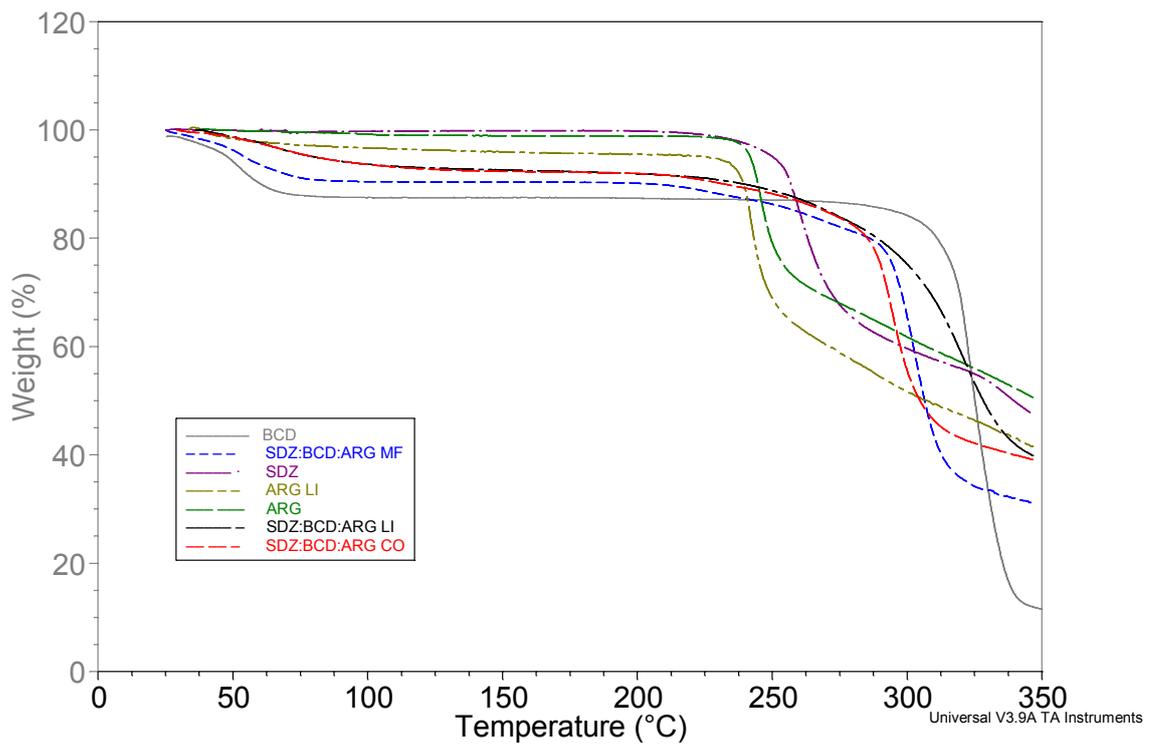


Figura 2. Curvas de ATG del complejo ternario con ARG.

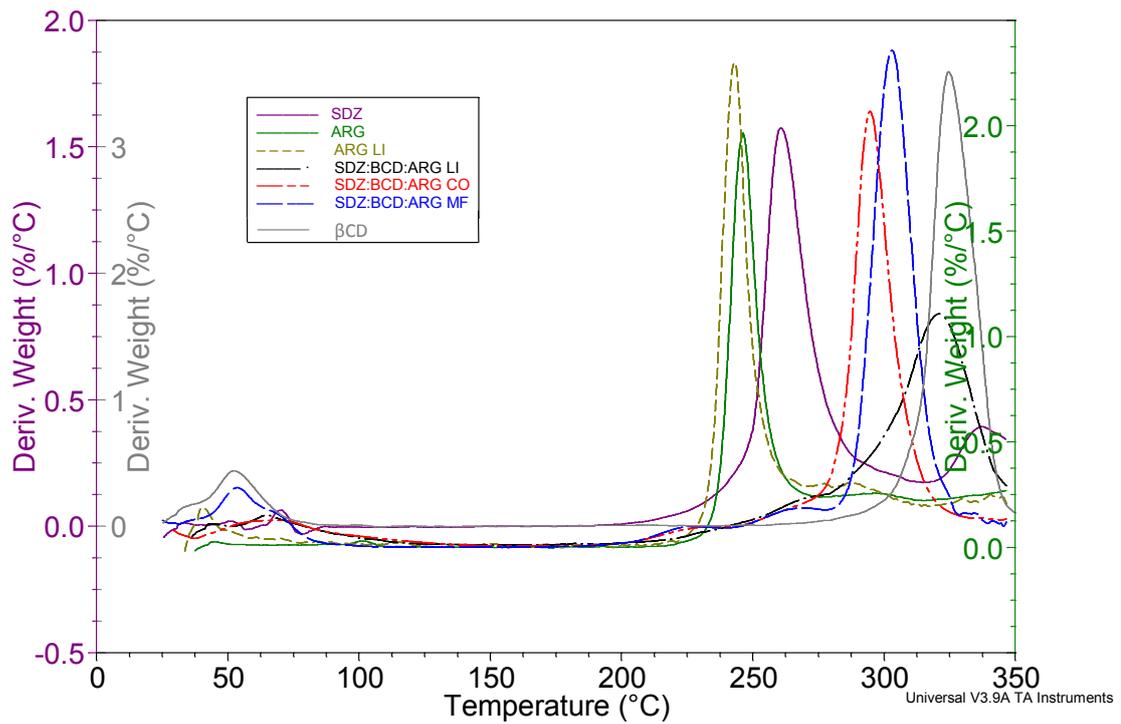


Figura 3. Curvas de DTG del complejo ternario con ARG.

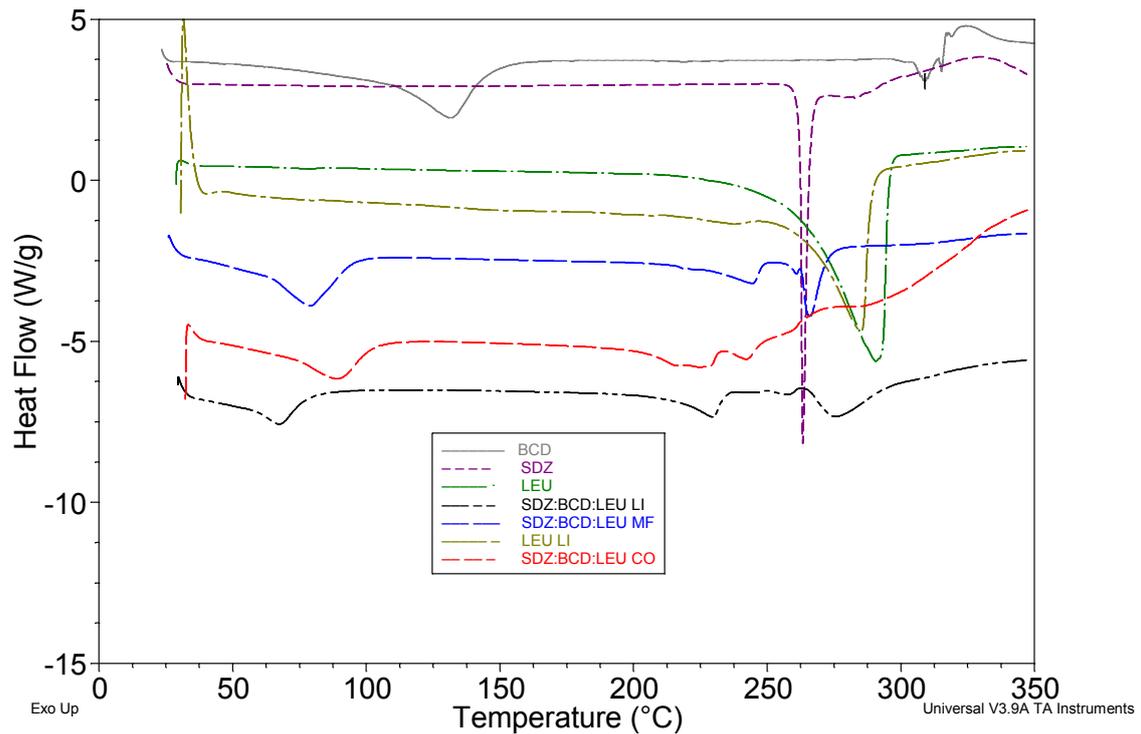


Figura 4. Curvas de DSC del complejo ternario con LEU.

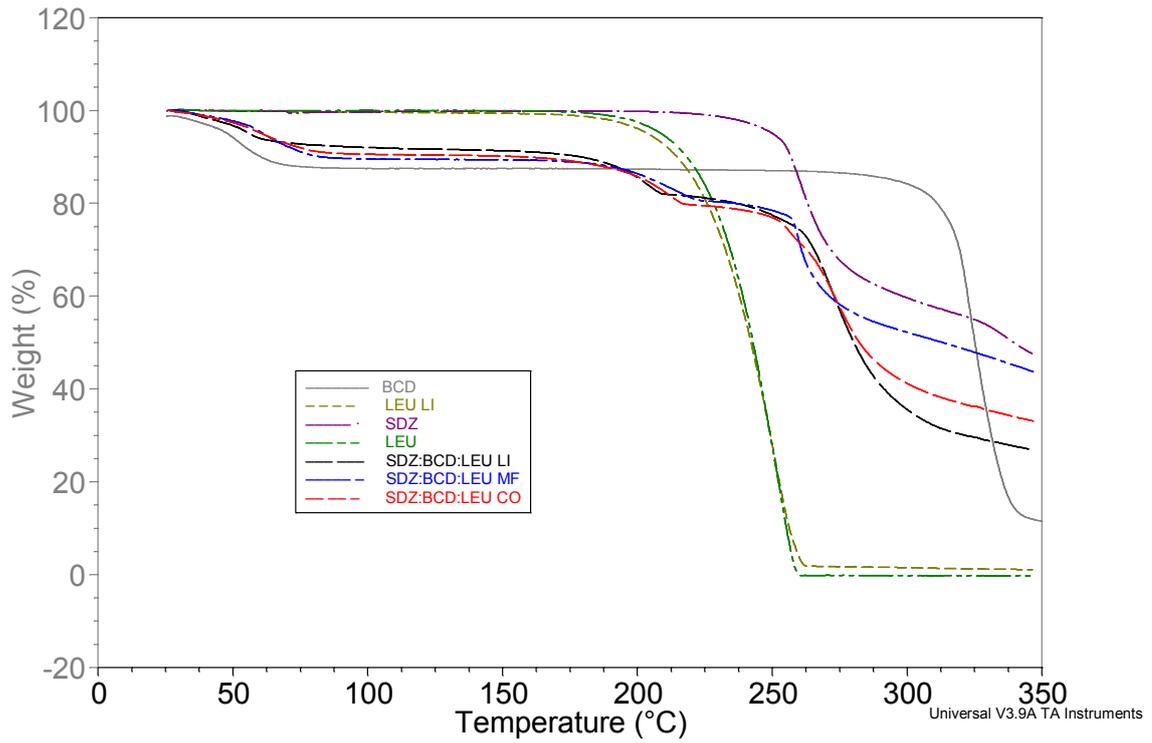


Figura 5. Curvas de ATG del complejo ternario con LEU.

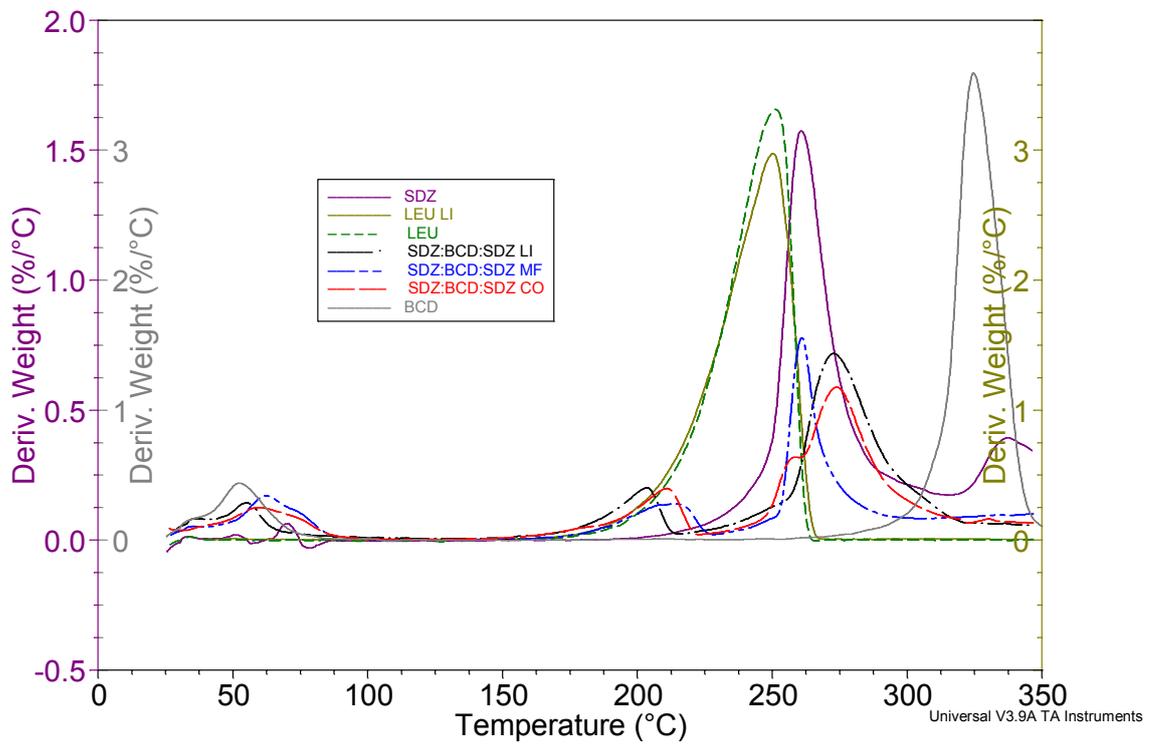


Figura 6. Curvas de DTG del complejo ternario con LEU.

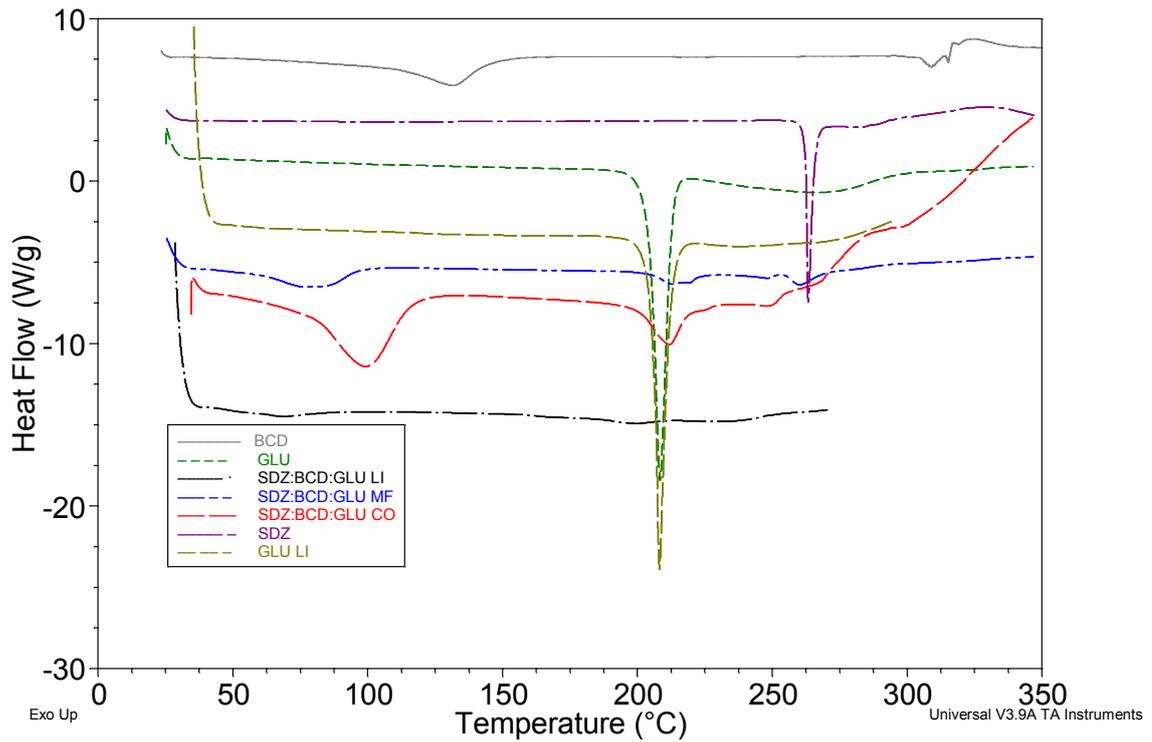


Figura 7. Curvas de DSC del complejo ternario con GLU.

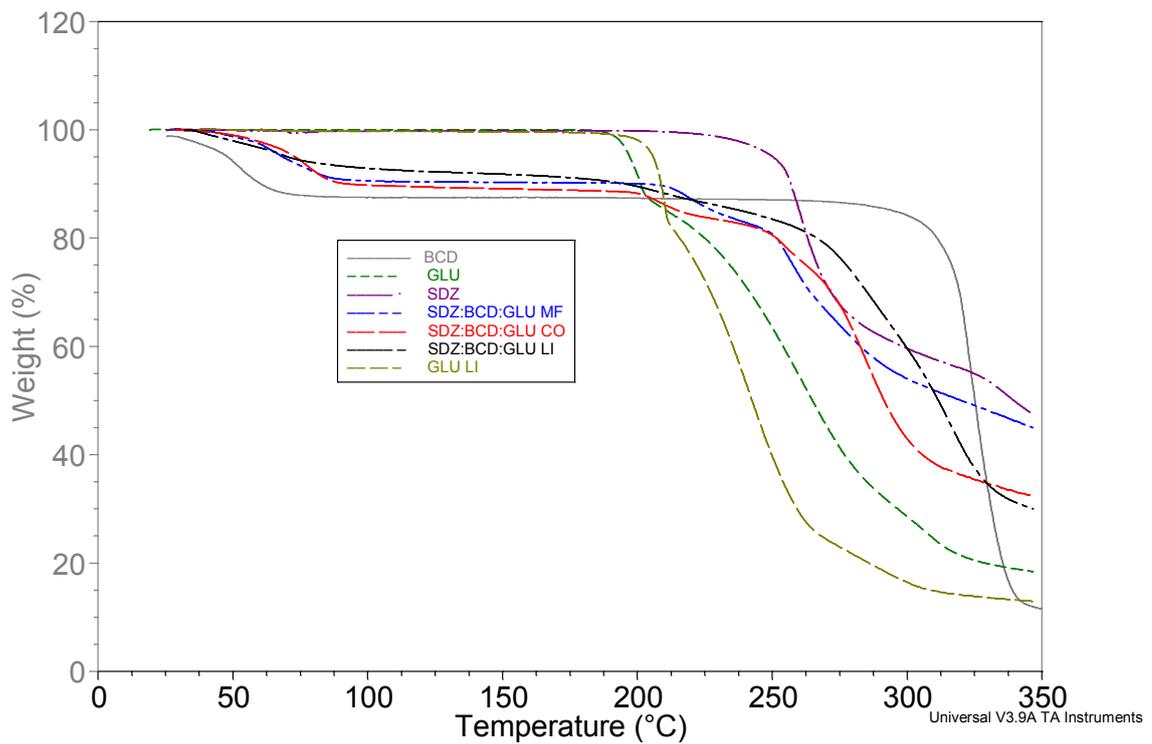


Figura 8. Curvas de ATG del complejo ternario con GLU.

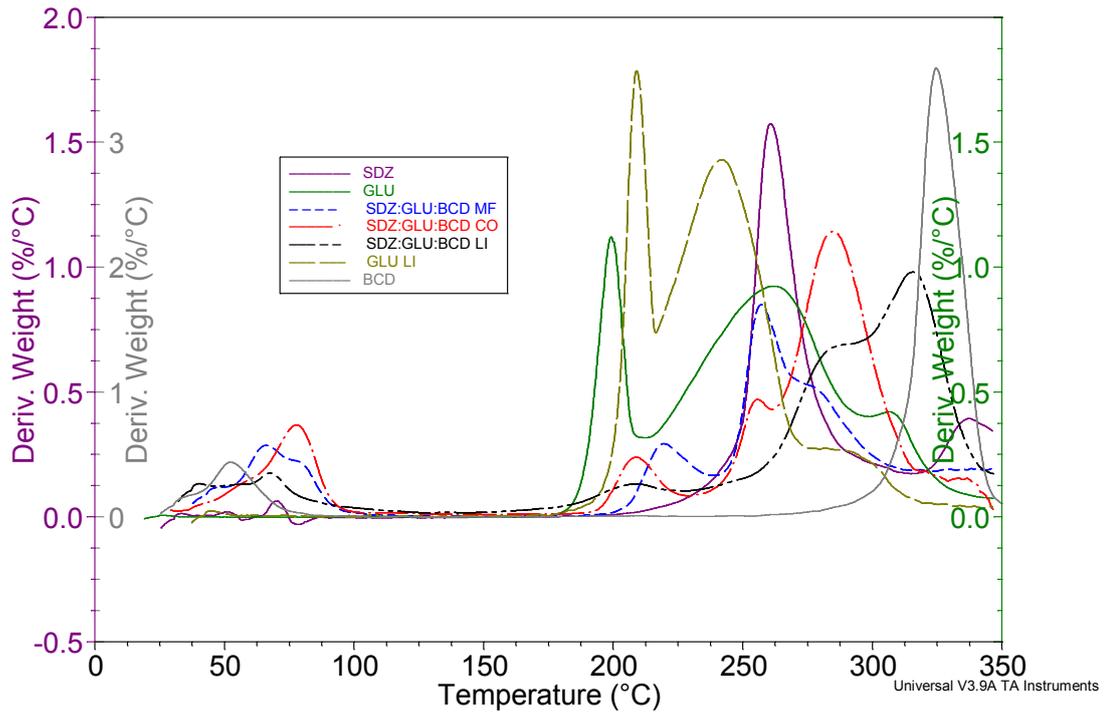


Figura 9. Curvas de DTG del complejo ternario con GLU.

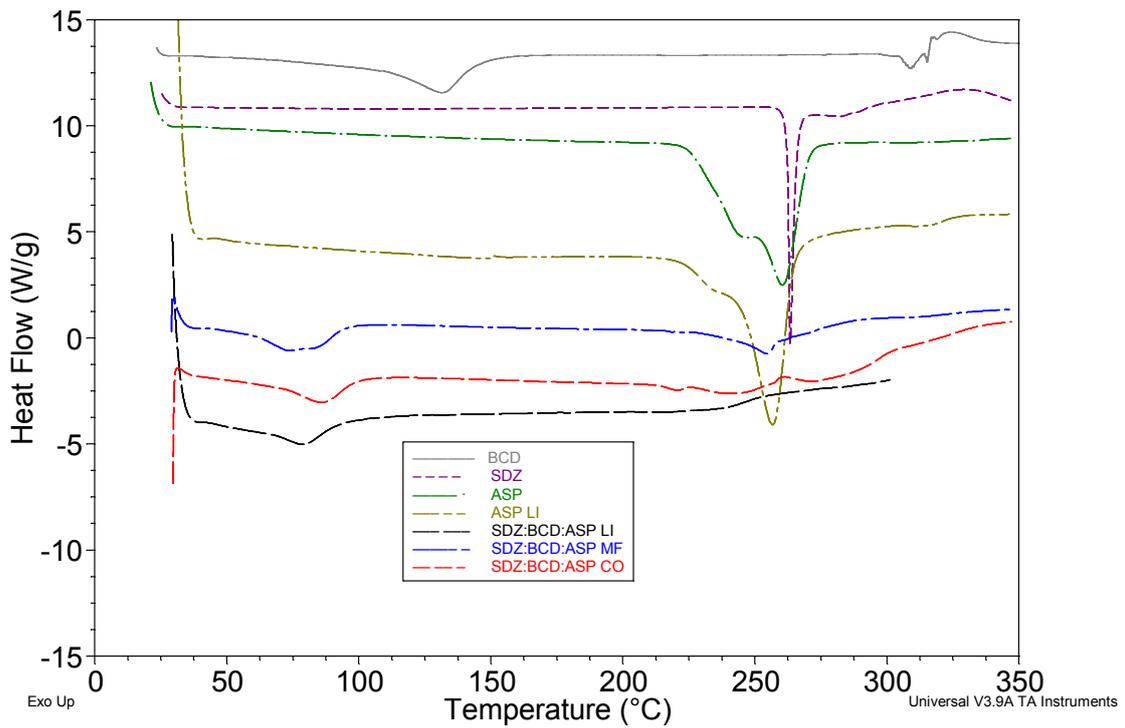


Figura 10. Curvas de DSC del complejo ternario con ASP.

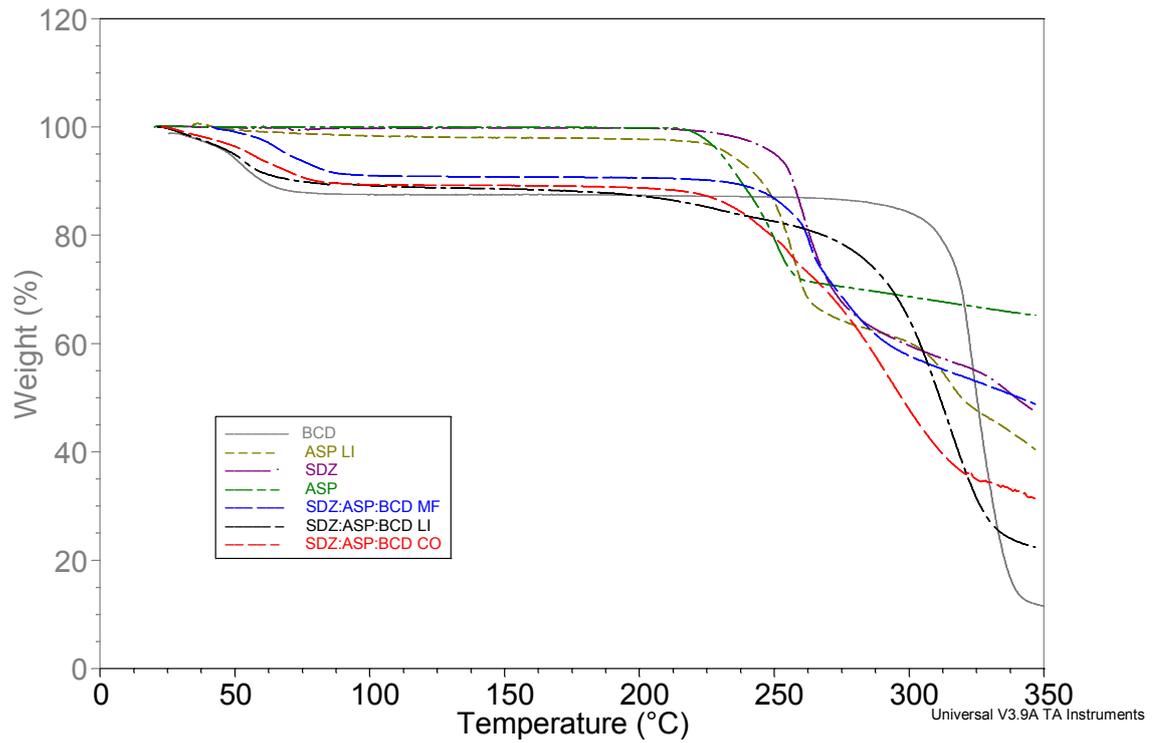


Figura 11. Curvas de ATG del complejo ternario con ASP.

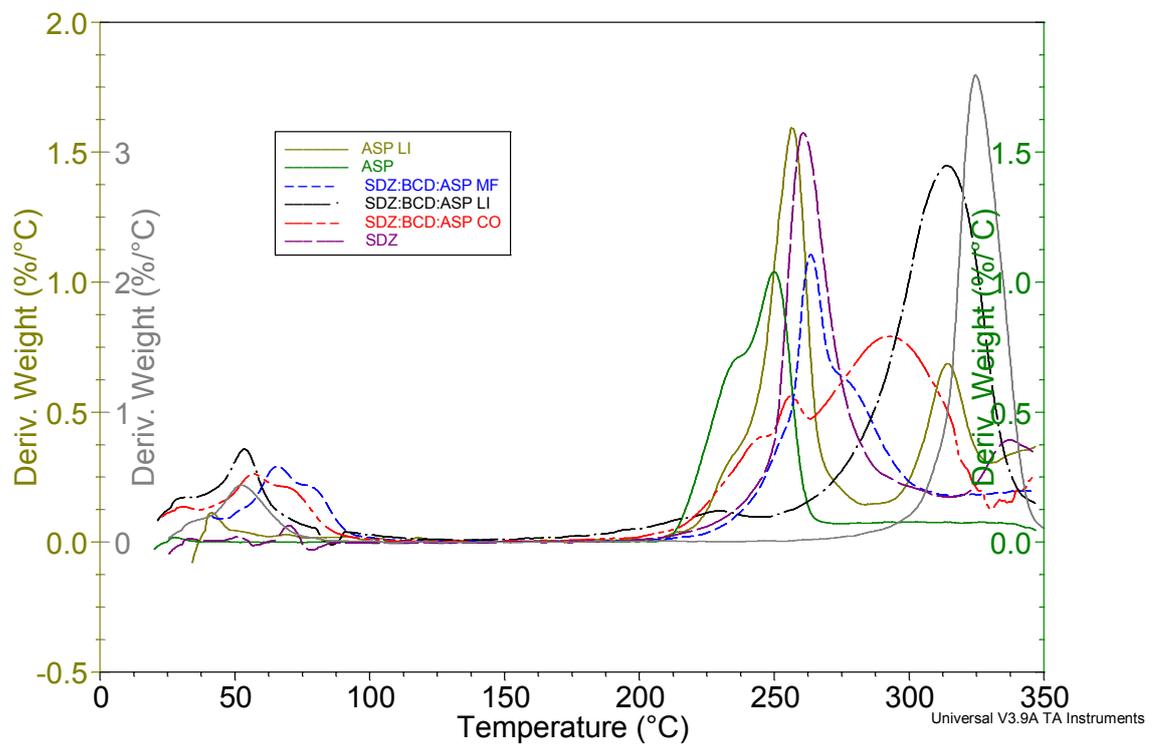


Figura 12. Curvas de DTG del complejo ternario con ASP.

Diagramas de Rayos X

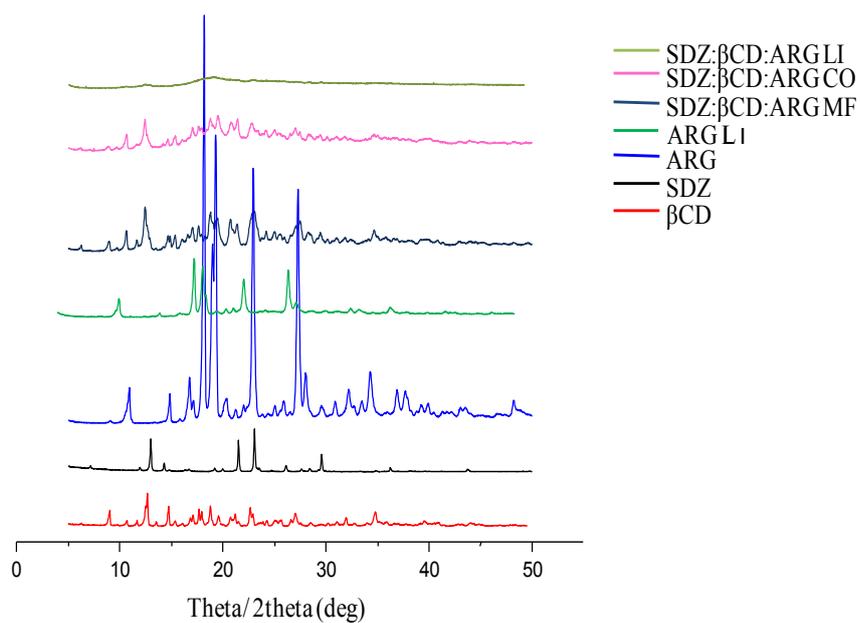


Figura 1. Difractograma de Rayos X del complejo SDZ:βCD:ARG.

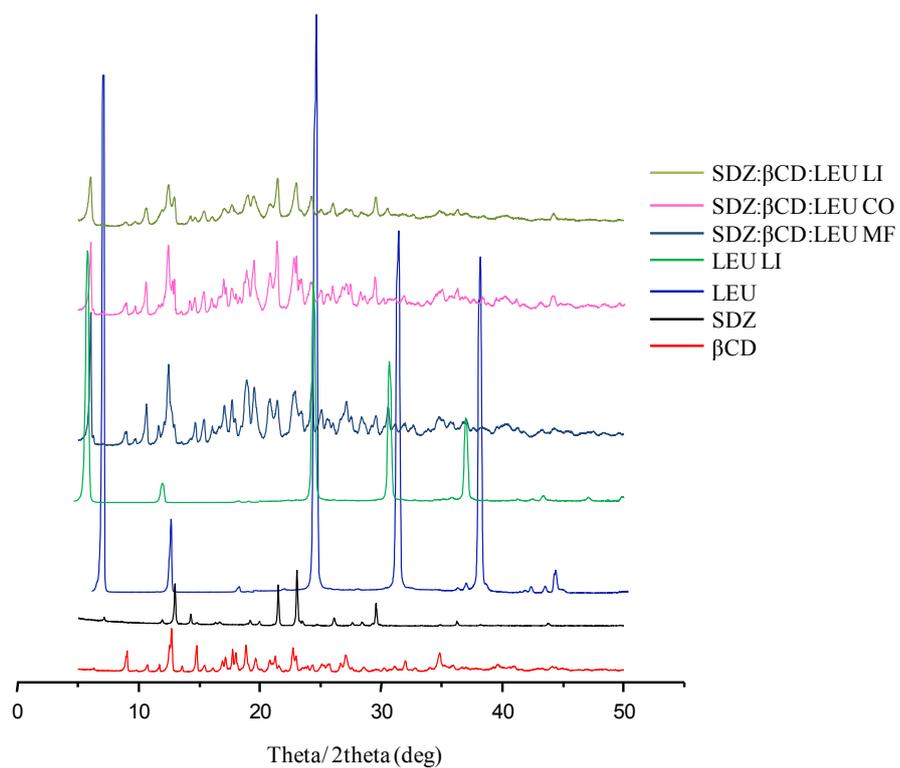


Figura 2. Difractograma de Rayos X del complejo SDZ:βCD:LEU.

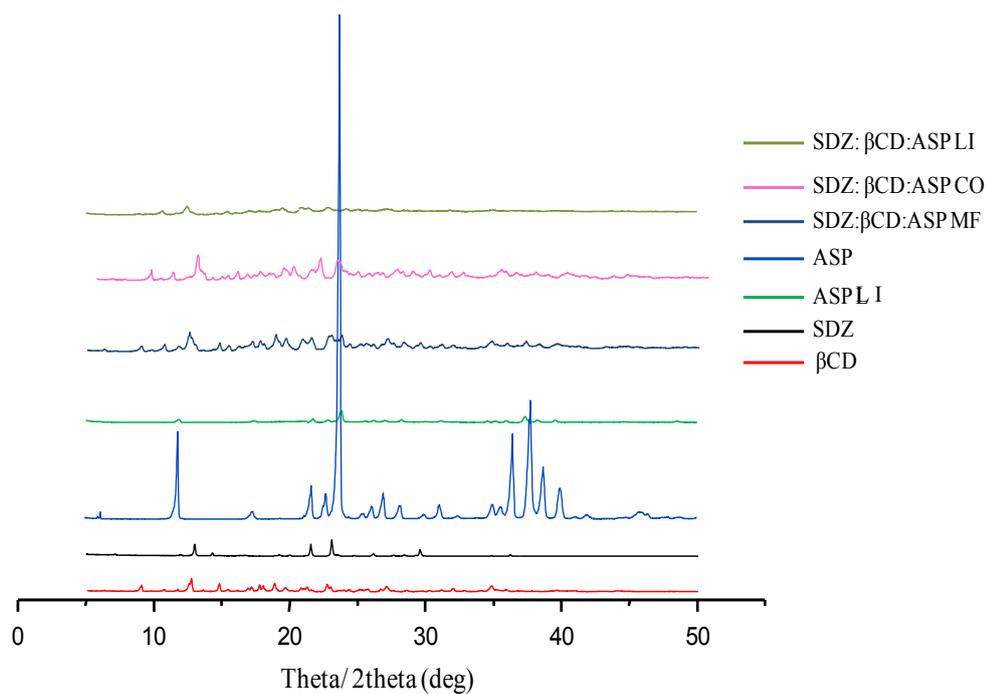


Figura 3. Difractograma de Rayos X del complejo SDZ:βCD:ASP.

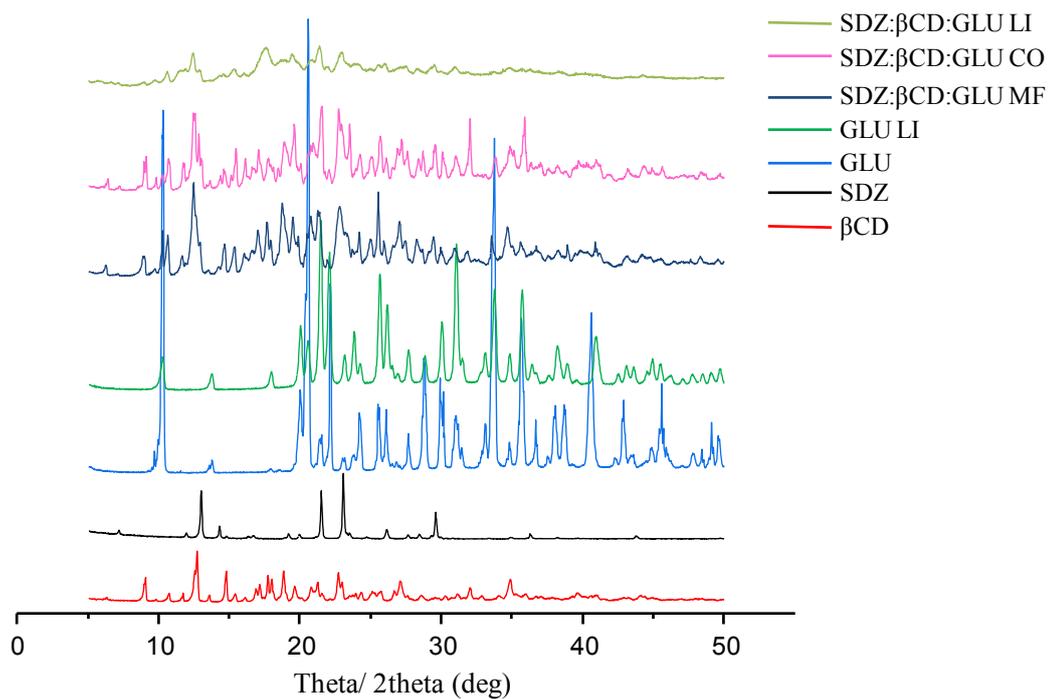


Figura 4. Difractograma de Rayos X del complejo SDZ:βCD:GLU.

Espectros Infrarrojo

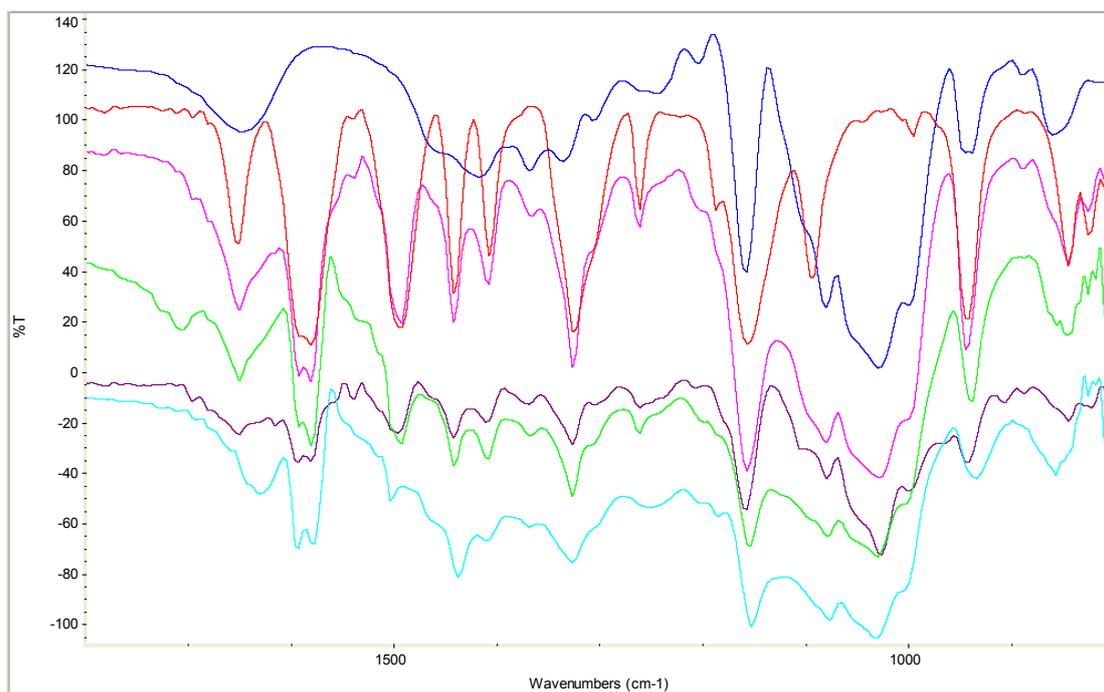


Figura 1. Espectros IR desde 2000 a 400 ppm, de SDZ (rojo), βCD (azul), SDZ:βCD MF (fucsia), SDZ:βCD CO (verde) y SDZ:βCD LI (lila) y SDZ:βCD SD (celeste).

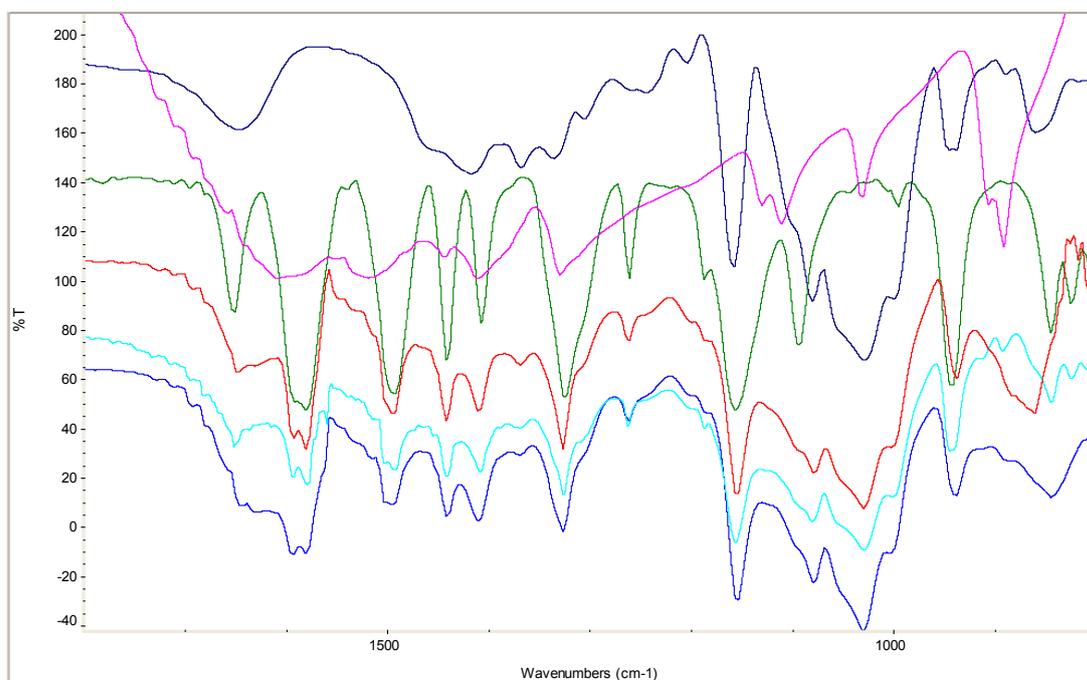


Figura 2. Espectros IR desde 2000 a 400 ppm, de SDZ (verde), GLI (fucsia), βCD (azul oscuro), SDZ:βCD:GLI MF (rojo), SDZ:βCD:GLI CO (celeste) y SDZ:βCD:GLI LI (azul).

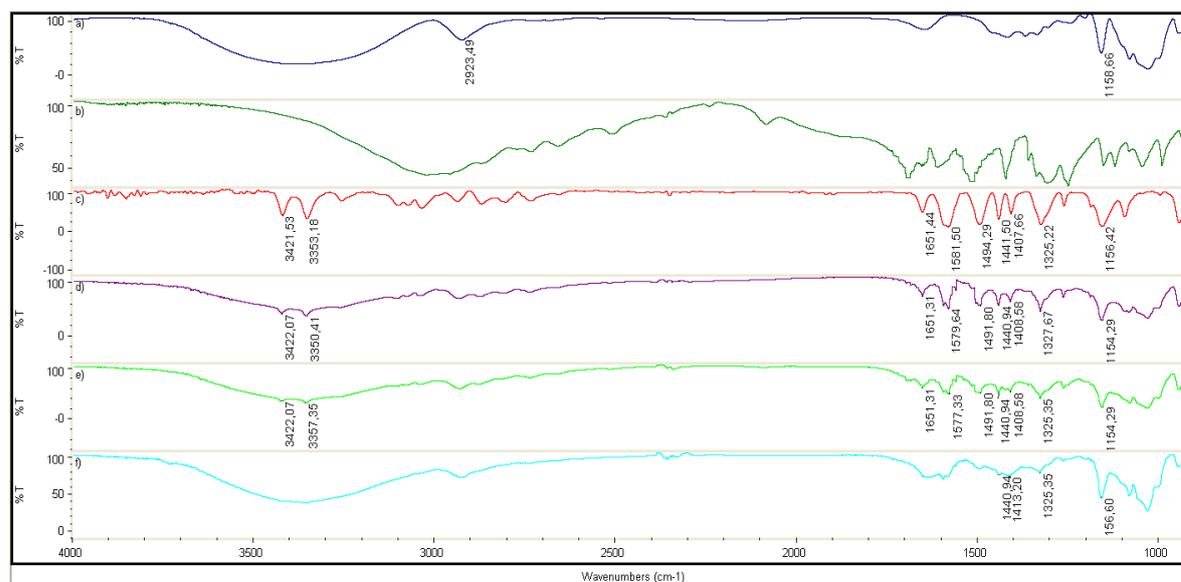


Figura 3. Espectros IR de β CD (a), ASP (b), SDZ (c), SDZ: β CD:ASP MF (d), SDZ: β CD:ASP (e) y SDZ: β CD:ASP LI (f).

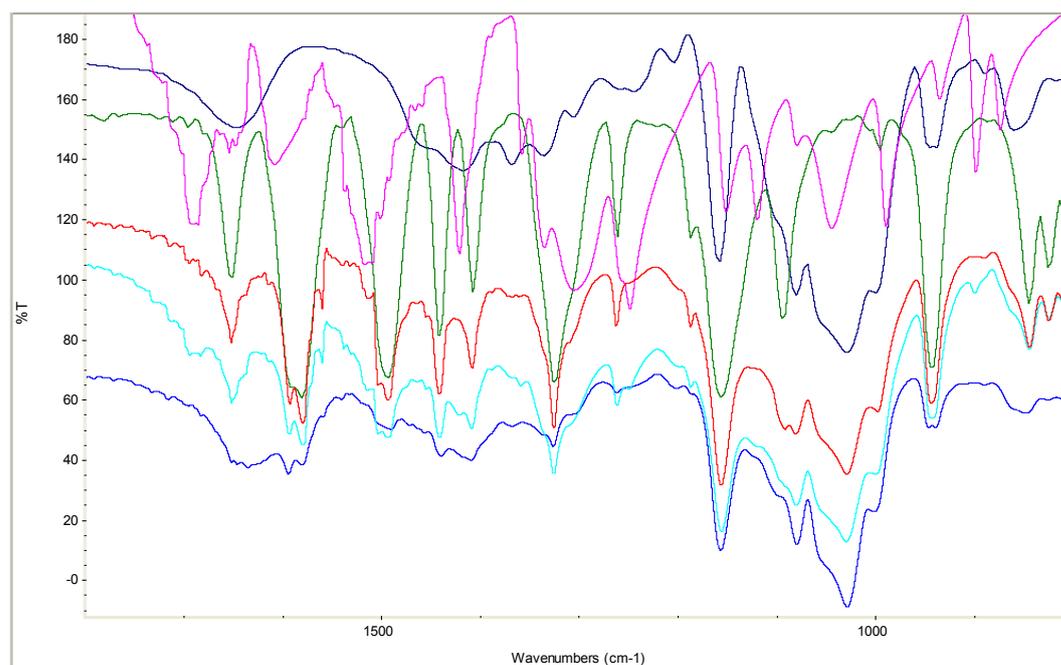


Figura 4. Espectros IR desde 2000 a 400 ppm, de SDZ (verde), ASP (fucsia), β CD (azul oscuro), SDZ: β CD:ASP MF (rojo), SDZ: β CD:ASP CO (celeste) y SDZ: β CD:ASP LI (azul).

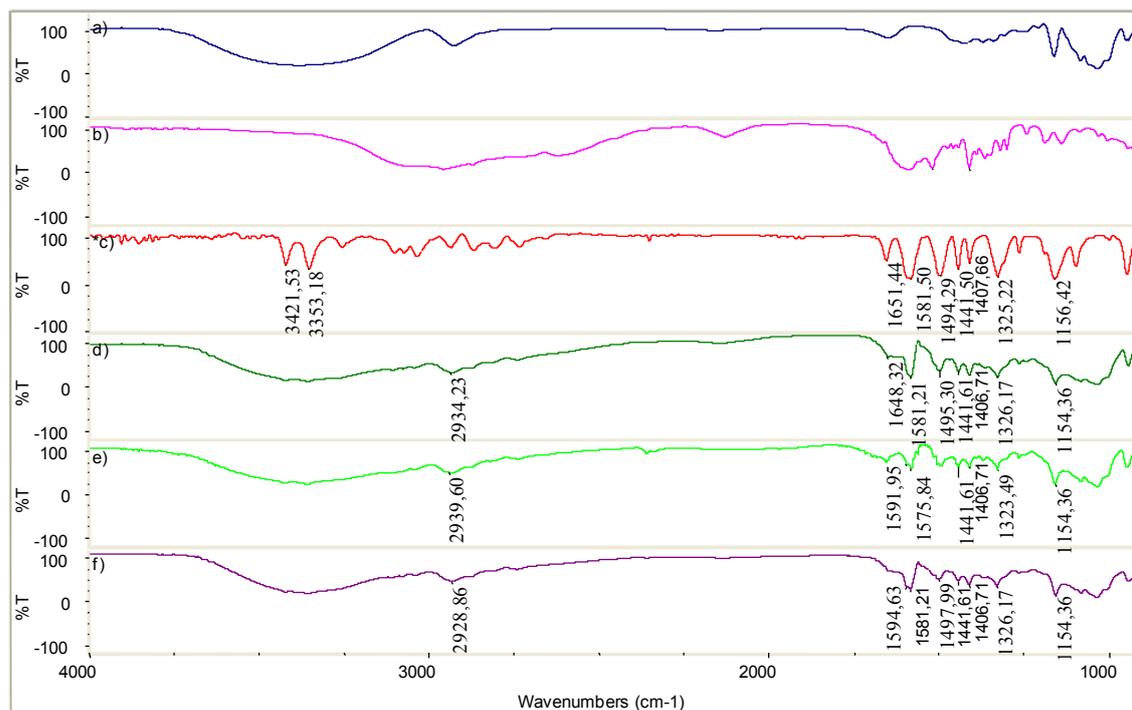


Figura 5. Espectros IR de β CD (a), LEU (b), SDZ (c), SDZ: β CD:LEU MF (d), SDZ: β CD:LEU (e) y SDZ: β CD:LEU LI (f).

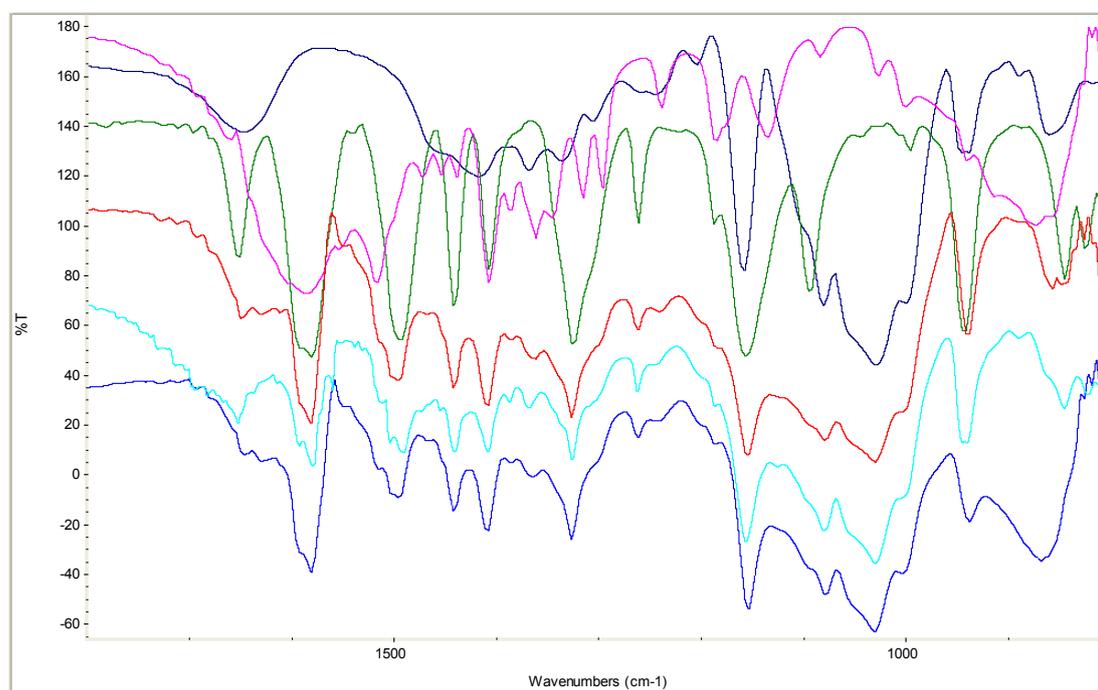


Figura 6. Espectros IR desde 2000 a 400 ppm, de SDZ (verde), LEU (fucsia), β CD (azul oscuro), SDZ: β CD:LEU MF (rojo), SDZ: β CD:LEU CO (celeste) y SDZ: β CD:LEU LI (azul).

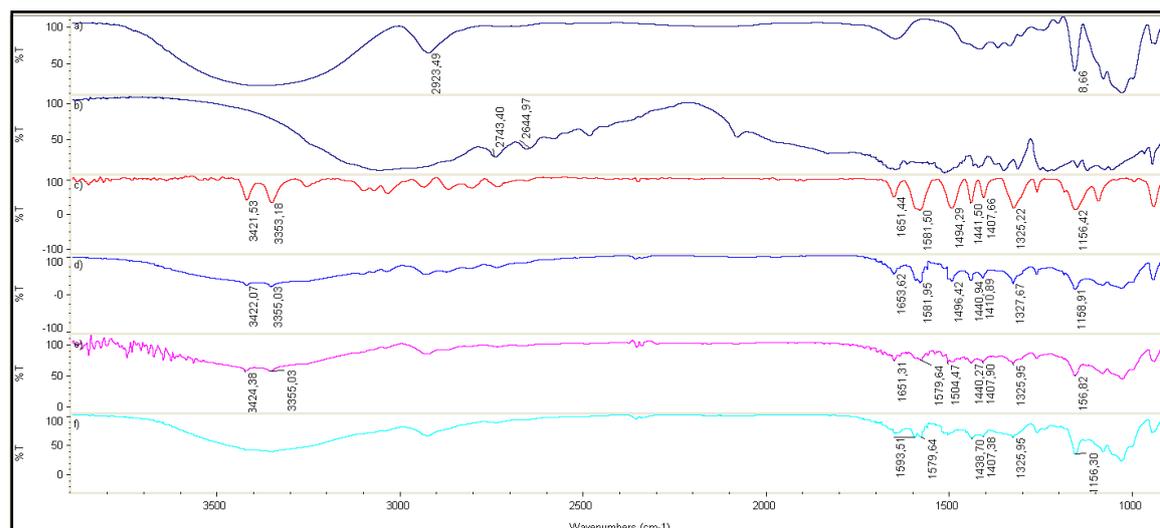


Figura 7. Espectros IR de β CD (a), GLU (b), SDZ (c), SDZ: β CD:GLU MF (d), SDZ: β CD:GLU (e) y SDZ: β CD:GLU LI (f).

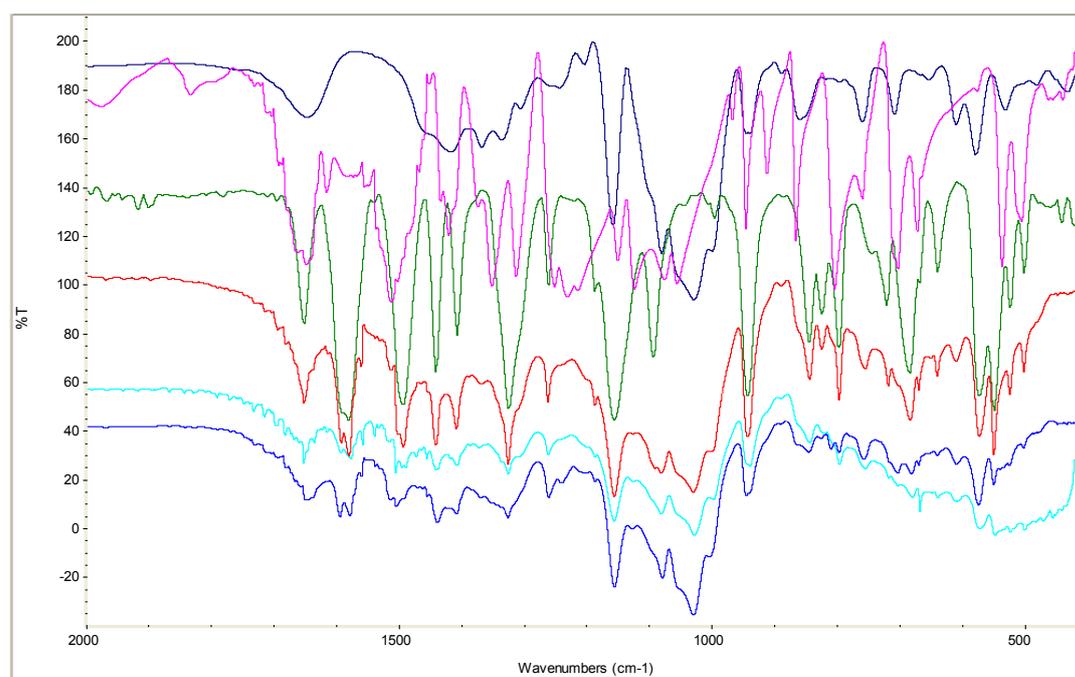


Figura 8. Espectros IR desde 2000 a 400 ppm de SDZ (verde), GLU (fucsia), β CD (azul oscuro) y SDZ: β CD:GLU MF (rojo), CO (celeste) y LI (azul).

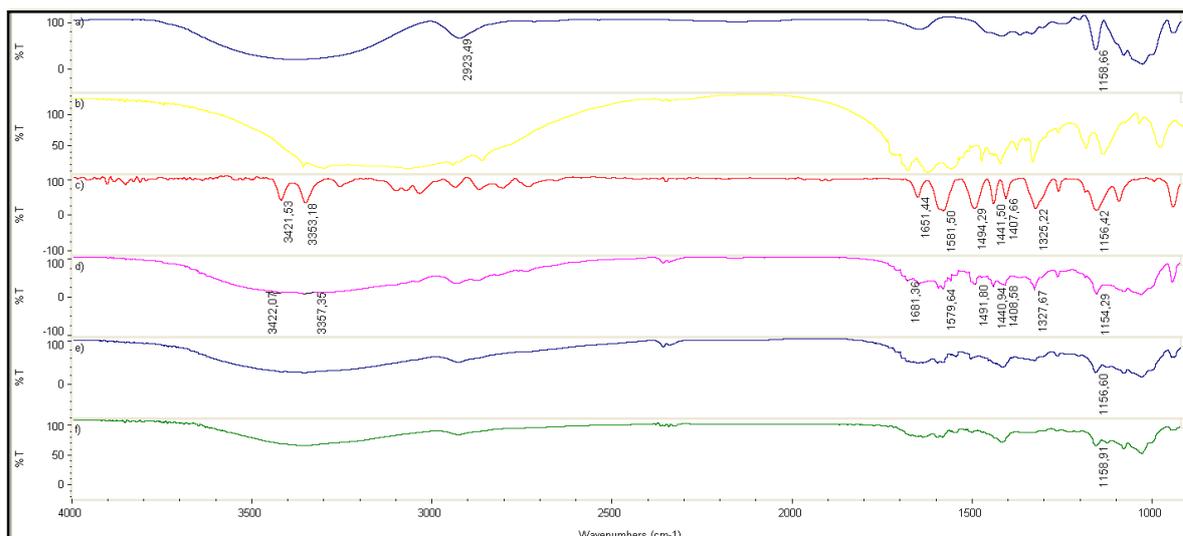


Figura 9. Espectros IR de β CD (a), ARG (b), SDZ (c), SDZ: β CD:ARG MF (d), SDZ: β CD:ARG CO (e) y SDZ: β CD:ARG LI (f).

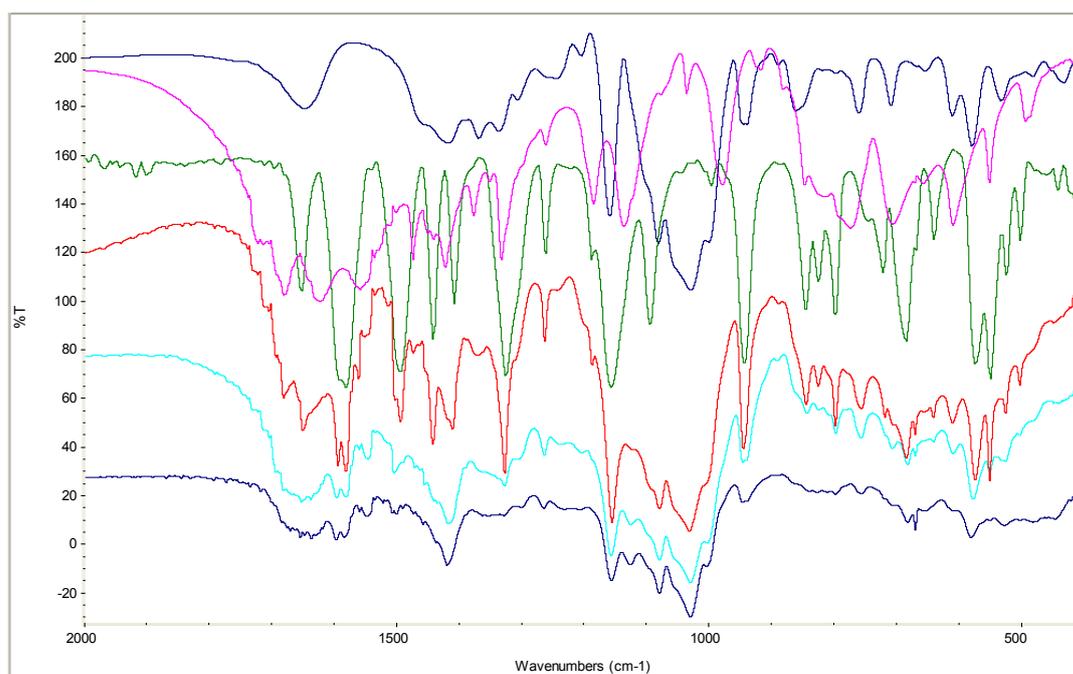


Figura 10. Espectros IR desde 2000 a 400 ppm de SDZ (verde), ARG (fucsia), β CD (azul oscuro) y SDZ: β CD:ARG MF (rojo), CO (celeste) y LI (azul).

Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

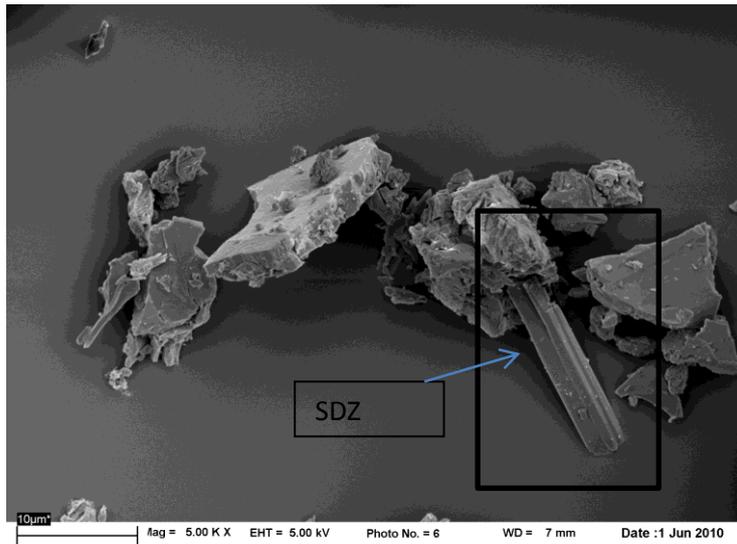


Figura 1. Imagen SEM de SDZ:βCD CO, 5000 X.

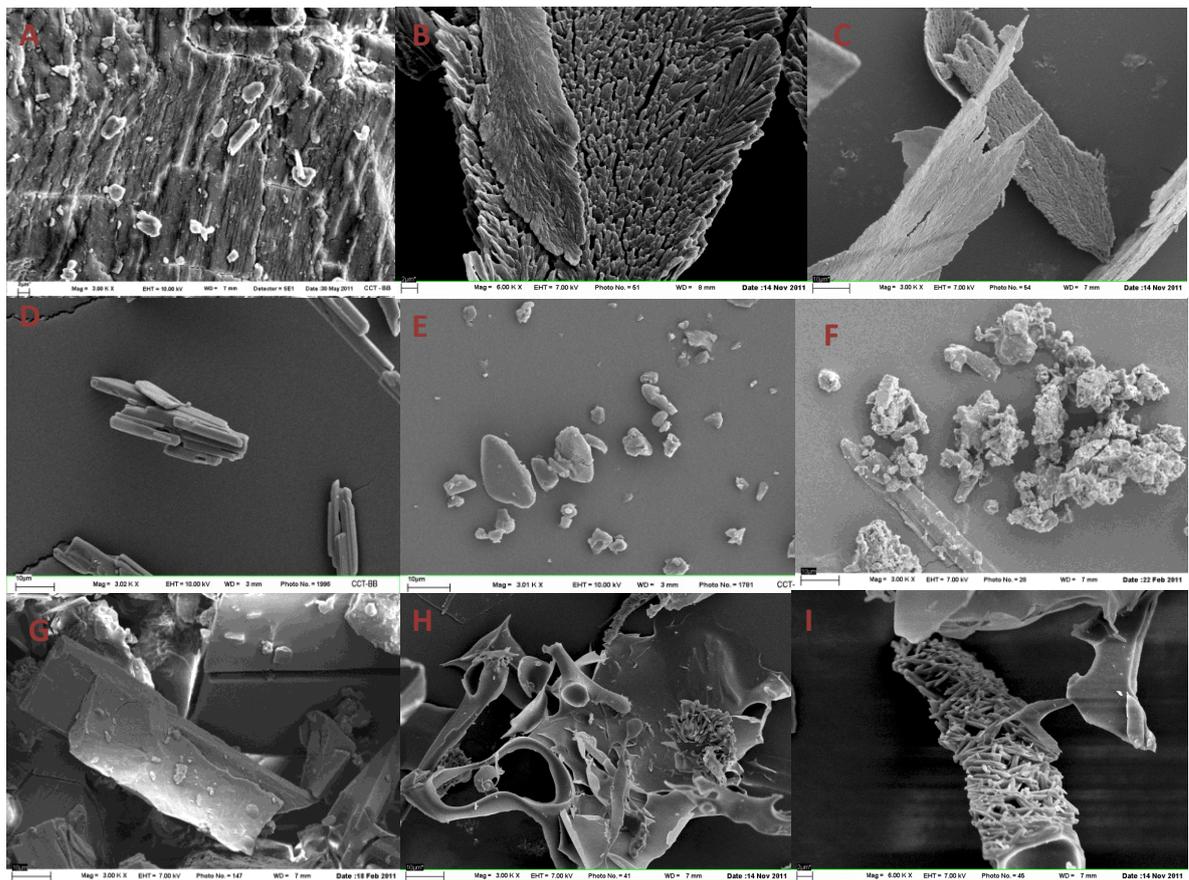


Figura 2. Imágenes SEM de ARG, 3000X (A); ARG, 6000 X (B); ARG LI, 3000X (C); SDZ, 3000X (D); βCD, 3000 X (E); SDZ:βCD:ARG MF, 3000 X (F); SDZ:βCD:ARG CO, 3000 X (G); SDZ:βCD:ARG LI, 3000 X (H) y SDZ:βCD:ARG LI, 3000 X (I).

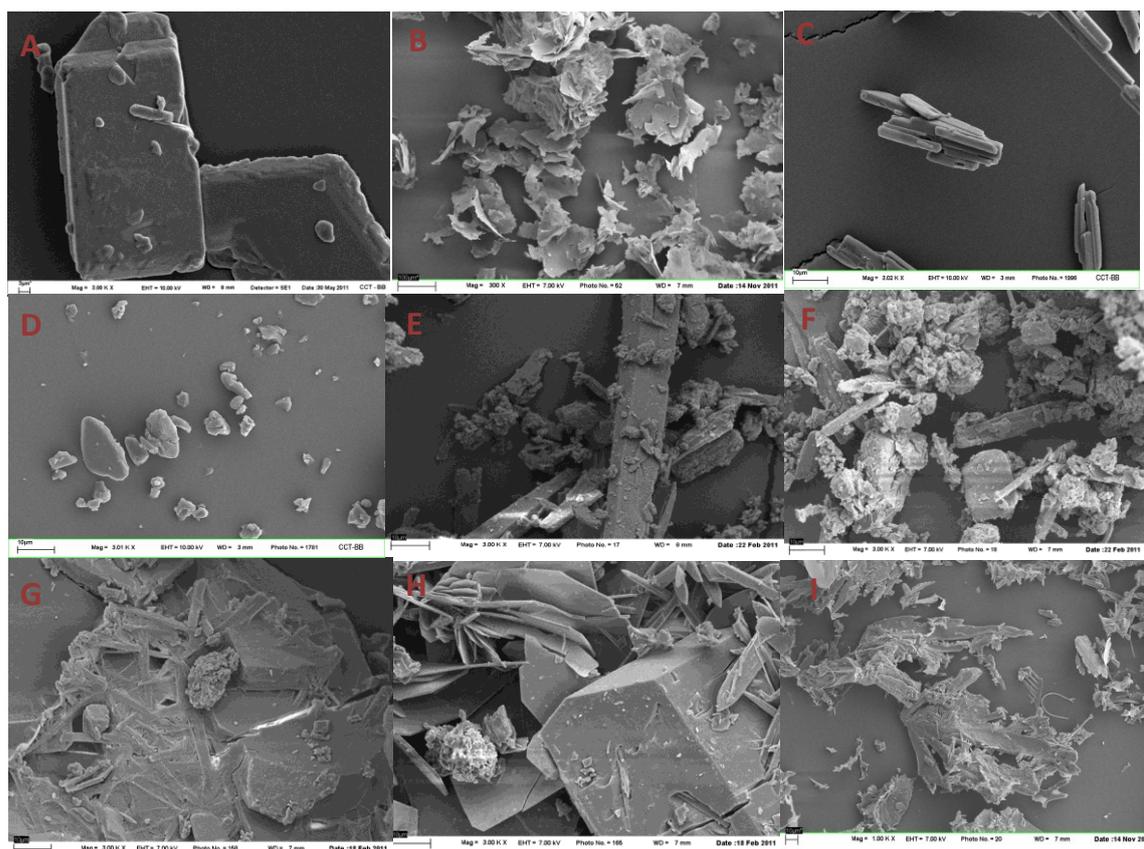


Figura 3. Imágenes SEM de ASP, 3000 X (A); ASP LI, 300X (B); SDZ, 3000 X (C); β CD, 3000 X (D); SDZ: β CD:ASP MF, 3000 X (E); SDZ: β CD:ASP MF, 3000 X (F); SDZ: β CD:ASP CO, 3000 X (G); SDZ: β CD:ASP CO, 3000 X (H) y SDZ: β CD:ASP LI, 1000 X (I).

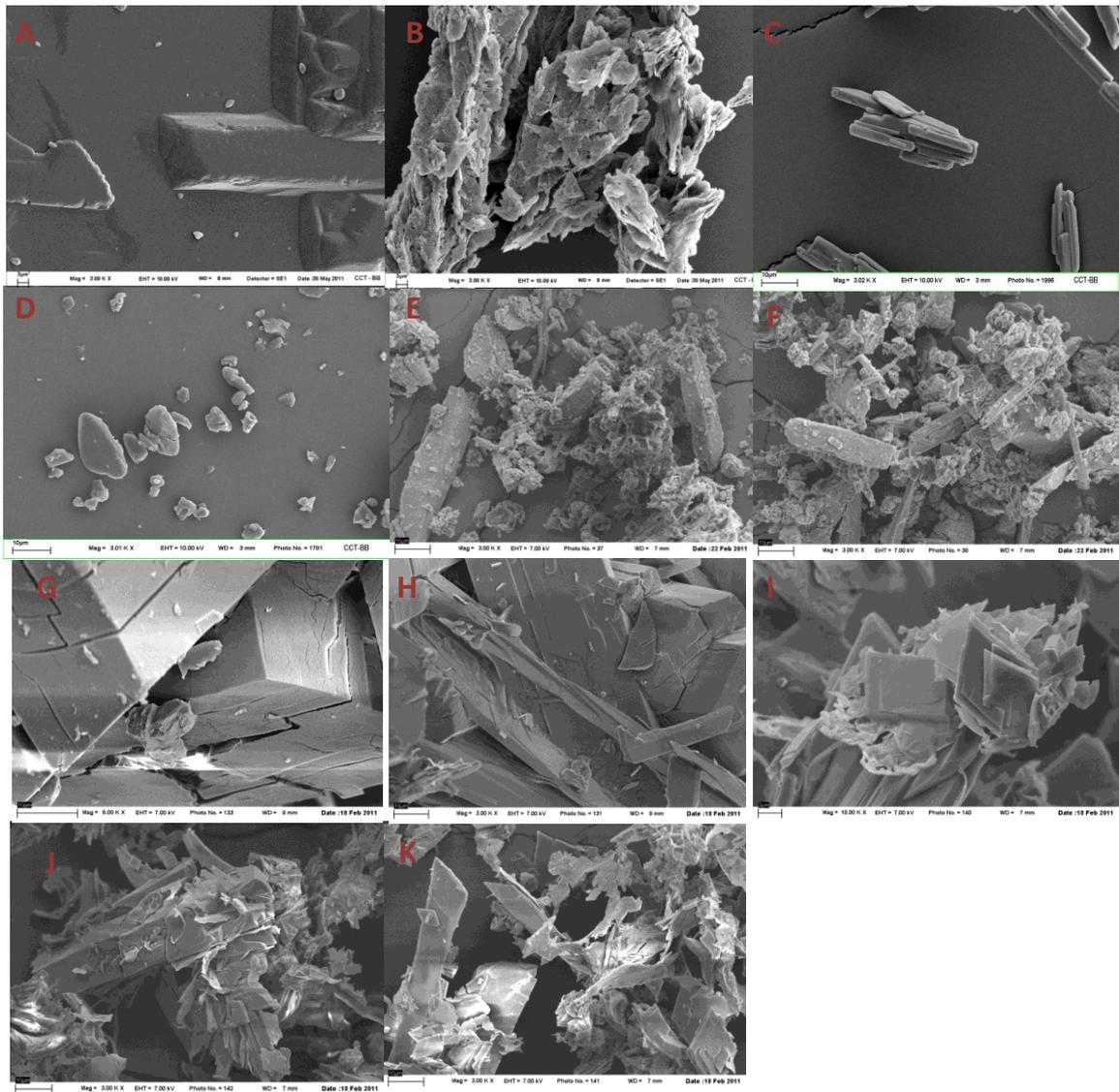


Figura 4. Imágenes SEM de GLU, 3000 X (A); GLU LI, 3000 X (B); SDZ, 3000 X (C); β CD, 3000 X (D); SDZ: β CD:GLU MF, 3000 X (E); SDZ: β CD:GLU MF, 3000 X (F); SDZ: β CD:GLU CO, 6000 X (G); SDZ: β CD:GLU CO, 3000 X (H); SDZ: β CD:GLU LI, 10000 X (I); SDZ: β CD:GLU LI, 3000 X (J) y SDZ: β CD:GLU LI, 3000 X (K).

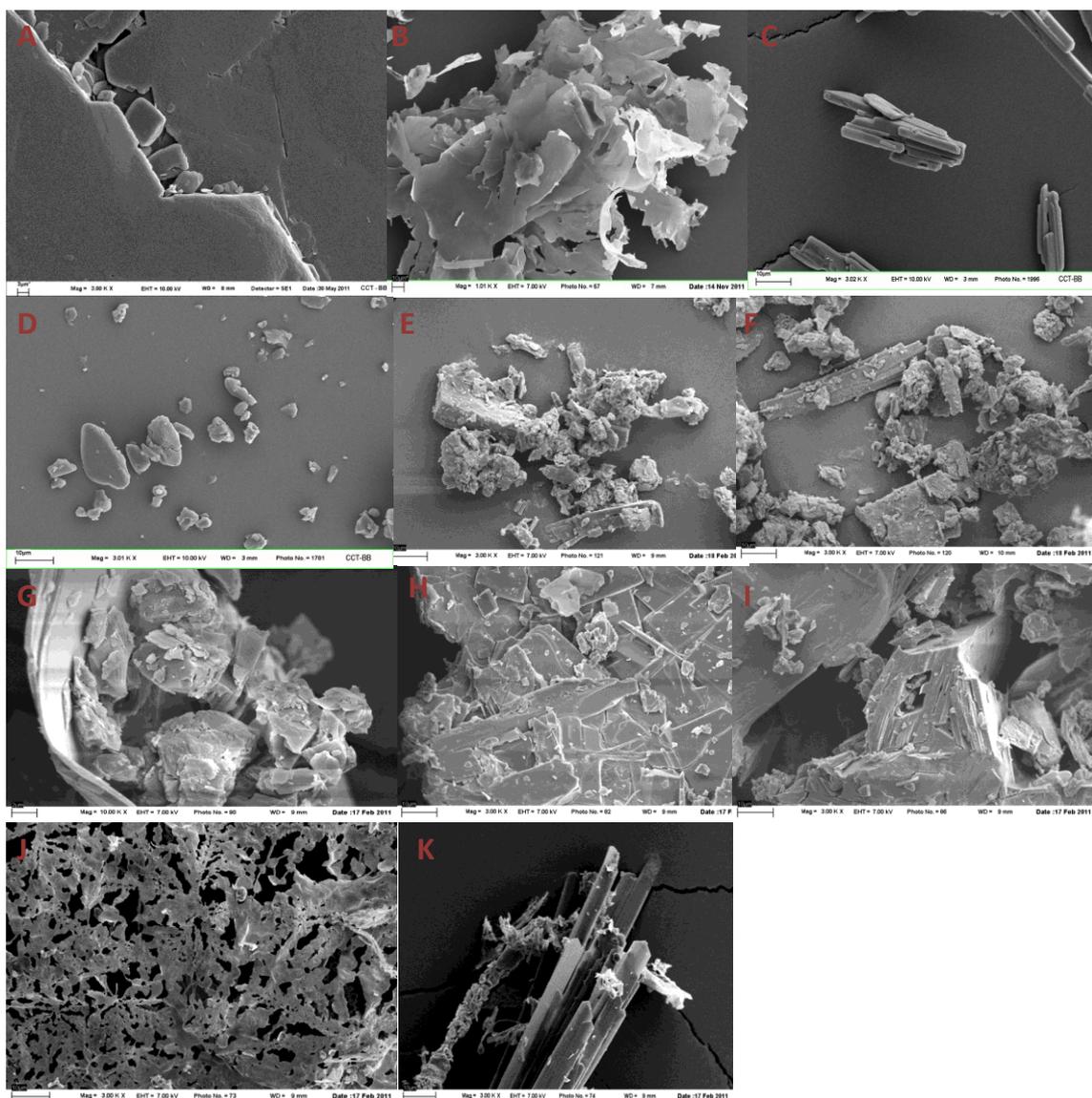
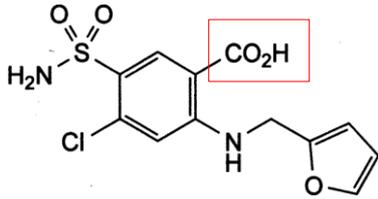
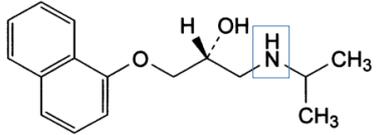
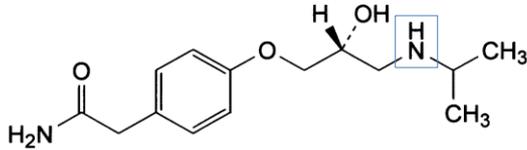
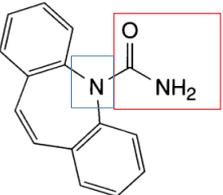
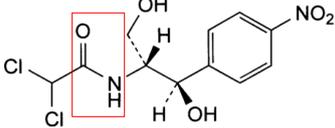
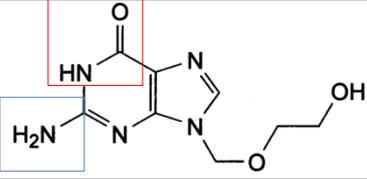
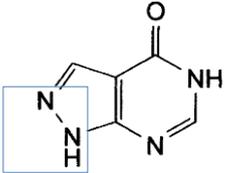
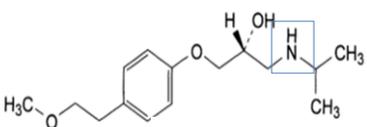
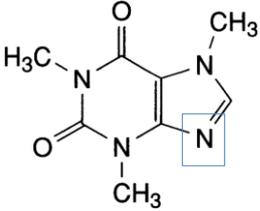
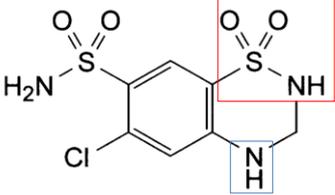
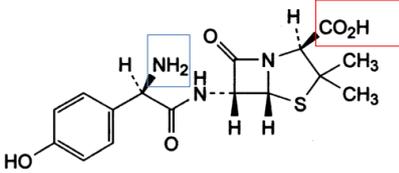
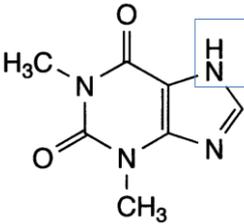
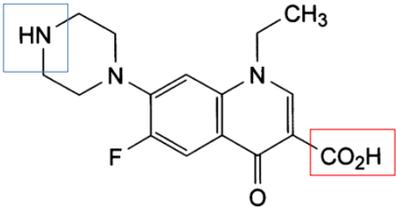
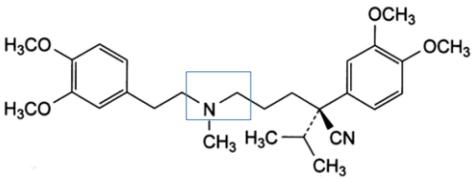
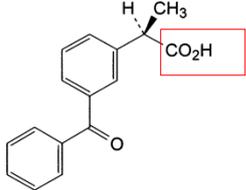


Figura 5. Imágenes SEM de LEU, 3000 X (A) LEU LI, 10000 X (B); SDZ, 3000 X (C); β CD, 3000 X (D); SDZ: β CD:LEU MF, 3000 X (E); SDZ: β CD:LEU CO, 3000 X (F); SDZ: β CD:LEU CO, 10000 X (G); SDZ: β CD:LEU CO, 3000 X (H); SDZ: β CD:ASP LI, 3000 X (I); SDZ: β CD:ASP LI, 3000 X (J) y SDZ: β CD:ASP LI, 3000 X (K).

Tabla 1. Datos de los Ingredientes Farmacéuticos Activos utilizados como compuestos estándar.

IFA	Estructura Química	pKa	Dosis Usual (mg/250mL)
Furosemida		3,9	40
Propranolol		9,5	40
Atenolol		9,6	100
Carbamazepina		2,3	200
Cloranfenicol		5,5	250
Aciclovir		9,3 2,3	200
Allopurinol		9,4	100
Metoprolol		9,7	100

Cafeina		0,6 > 14	100
Hidroclorotiazida		7,0 9,2	25
Amoxicilina		2,4 9,6	250
Teofilina		8,6 3,5	100
Norfloxacin		6,34 8,75	400
Verapamilo		8,9	80
Ketoprofeno		4,8	200

Trabajos de investigación publicados durante el desarrollo de este trabajo de tesis

-  Zoppi A, Quevedo M, Delrivo A, Longhi MR. Complexation of sulfonamides with β -cyclodextrin studied by experimental and theoretical methods. *J Pharm Sci* 2010; 99 (7): 3166-76.
-  Delrivo A, Zoppi A, Longhi MR. Interaction of sulfadiazine with cyclodextrins in aqueous solution and solid state. *Carbohydr Polym* 2012; 87: 1980-88.