

R.11982
T 943

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Escuela de Farmacia
Sevilla, 29-10-96
al libro 60 número 58 del libro
correspondiente.
Sevilla: El Jefe del Negociado de Farmacia.
Reverendísimo

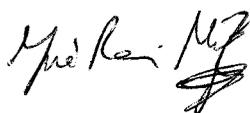
**ESTUDIO DE FENOMENOS DE COMPLEJACION DE
GLICLAZIDA CON DIFERENTES CICLODEXTRINAS.
EVALUACION BIOFARMACEUTICA**

Memoria presentada por José Ramón Moyano Méndez
para optar al grado de Doctor en Farmacia

Sevilla, Octubre de 1996

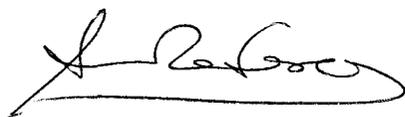
LBS
810955

**Memoria presentada por José Ramón Moyano Méndez
para optar al grado de Doctor en Farmacia**



Fdo.: José Ramón Moyano Méndez

V° B° Los directores de la Tesis Doctoral



**Fdo.: Prof. D. Antonio María Rabasco
Alvarez, Catedrático de Farmacia
y Tecnología Farmacéutica
de la Universidad de Sevilla**



**Fdo.: Prof. D. Juan Manuel Ginés
Dorado, Profesor Asociado de Farmacia
y Tecnología Farmacéutica
de la Universidad de Sevilla**



**Fdo.: Prof. D.ª María José Arias Blanco
Profesor Asociado de Farmacia
y Tecnología Farmacéutica
de la Universidad de Sevilla**



C/ Profesor García González, s/n.
Teléfono: (95) 455 67 24 - 26
Fax: (95) 423 37 65
41012 SEVILLA (ESPAÑA)

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, TECNOLOGIA FARMACEUTICA
Y FARMACOLOGIA
CATEDRA DE FARMACIA GALENICA

ANTONIO MARIA RABASCO ALVAREZ, Doctor en Farmacia, Catedrático de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA: Que la Memoria para optar al Grado de Doctor, presentada por el Licenciado en Farmacia D. José Ramón Moyano Méndez, cuyo título es *Estudio de Fenómenos de Complejación de Gliclazida con Diferentes Ciclodextrinas. Evaluación Biofarmacéutica*, ha sido realizada bajo la dirección de los Dres. Juan Manuel Ginés Dorado, María José Arias Blanco y el que suscribe, y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Para que conste, y a petición del interesado, firmo el presente en Sevilla, a cuatro de Octubre de mil novecientos noventa y seis.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a mis directores, los Drs. D. Antonio María Rabasco Alvarez, D. Juan Manuel Ginés Dorado y D^a María José Arias Blanco por su acertada dirección y ayuda constante.

A los Drs. D. Giampiero Bettinetti, D. Manuel Bueno Martínez, D. Marco Guerrini, D. Angel Justo Rodríguez, D. Enrico Redenti, D. Antonio Ruiz Conde, D. Massimiliano Setti y D. Giacomo Torri por su inestimable asesoramiento y colaboración durante la realización de la presente Memoria. Asimismo agradezco a D. Miguel Angel Garrido Blanco, del Servicio de Resonancia Magnética Nuclear de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, así como a todos los compañeros y amigos del laboratorio de Chimica Farmaceutica Applicata del Dipartimento di Chimica Farmaceutica della Università degli Studi di Pavia (Italia), su desinteresada participación en diversos aspectos de la parte experimental.

A mis compañeros y amigos Purificación Muñoz Fernández, José Ignacio Pérez Martínez y M^a Carmen Morilla Frías, por su continuo estímulo y desinteresada ayuda.

A mi familia y a mis amigos, por el cariño y apoyo que siempre me han manifestado.

A mis padres
A mis hermanos

INDICE

1.2.4.1.1.	Métodos espectroscópicos	17
1.2.4.1.1.1.	Espectrofotometría Ultravioleta (UV)	18
1.2.4.1.1.2.	Resonancia Magnética Nuclear de Protones (¹ H-RMN)	18
1.2.4.1.1.3.	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 (¹³ C-RMN)	19
1.2.4.2.	Métodos de estudio de los complejos en estado sólido	20
1.2.4.2.1.	Métodos térmicos	20
1.2.4.2.1.1.	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	20
1.2.4.2.1.2.	Microscopía de Platina Caliente (HSM)	20
1.2.4.2.1.3.	Termogravimetría (TG)	20
1.2.4.2.1.4.	Microscopía de Platina Caliente (HSM)	21
1.2.4.2.2.	Métodos espectroscópicos	21
1.2.4.2.2.1.	Espectroscopía de Infrarrojos (IR)	21
1.2.4.2.2.2.	Difracción de Rayos X (XRD)	22
1.2.4.2.2.3.	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 en estado sólido (CP/MAS ¹³ C RMN)	22
1.2.4.2.3.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	23
1.2.4.2.4.	Modelización molecular	23
1.3.	APLICACIONES	23
1.3.1.	Importancia en el campo farmacéutico	24
1.3.1.1.	Preformulación	24
1.3.1.2.	Aumento de la solubilidad y de la velocidad de disolución	25
1.3.1.3.	Mejora de la biodisponibilidad	25
1.3.1.4.	Mejora de la estabilidad física y química	26
1.3.1.5.	Reducción de la toxicidad de los fármacos	27
1.3.1.6.	Liberación sostenida	27
1.4.	PRINCIPIO ACTIVO	28
1.4.1.	Propiedades fisico-químicas	28

1.4.2.	Características farmacocinéticas	29
1.4.3.	Farmacología	29
1.4.4.	Elaboración de compuestos de inclusión con gliclazida: interés biofarmacéutico	30
1.5.	OBJETIVOS	31
2.	MATERIAL Y METODOS	33
2.1.	MATERIAL	35
2.1.1.	Principio activo	35
2.1.2.	CDs	35
2.2.	METODOS	36
2.2.1.	Valoración del principio activo	36
2.2.2.	Elaboración de los sistemas binarios y ternarios	37
2.2.2.1.	Amasado (<i>kneading</i>)	37
2.2.2.2.	Atomización (<i>spray-drying</i>)	38
2.2.2.3.	Coprecipitación	38
2.2.2.4.	Neutralización	38
2.2.2.5.	Molienda (<i>co-grinding</i>)	39
2.2.2.6.	Mezcla física	39
2.2.3.	Estudio de la complejación fármaco-CD	39
2.2.3.1.	Estudios en estado líquido	39
2.2.3.1.1.	Solubilidad	39
2.2.3.1.2.	Resonancia Magnética Nuclear de Protones (¹ H-RMN)	40
2.2.3.1.3.	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 (¹³ C-RMN)	42
2.2.3.1.4.	Modelización Molecular	42
2.2.3.2.	Estudio estructural. Caracterización en estado sólido	42
2.2.3.2.1.	Estudio morfológico	42

2.2.3.2.1.1.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) . . .	42
2.2.3.2.2.	Estudio térmico	43
2.2.3.2.2.1.	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Termogravimetría (TG)	43
2.2.3.2.2.2.	Microscopía de Platina Caliente (HSM)	43
2.2.3.2.3.	Estudio espectral	44
2.2.3.2.3.1.	Difracción de Rayos X (XRD)	44
2.2.3.2.3.2.	Espectroscopía de Infrarrojos (IR)	44
2.2.3.2.3.3.	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 en estado sólido (CP/MAS ¹³ C RMN)	45
2.2.4.	Velocidad de disolución	45
2.2.5.	Tratamiento estadístico	46
3.	RESULTADOS Y DISCUSION	47
3.1.	CARACTERIZACION DE LAS MATERIAS PRIMAS	49
3.1.1.	Estudio morfológico	49
3.1.1.1.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	49
3.1.2.	Estudio térmico	56
3.1.2.1.	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	56
3.1.2.2.	Termogravimetría (TG)	63
3.1.2.3.	Termomicroscopía (HSM)	64
3.1.3.	Estudio espectral	71
3.1.3.1.	Estudios en estado sólido	71
3.1.3.1.1.	Difracción de Rayos X (XRD)	71
3.1.3.1.2.	Espectroscopía de Infrarrojos (IR)	77
3.2.	SISTEMAS BINARIOS. ESTUDIO DE LA INTERACCION FARMACO-CD 83	83
3.2.1.	Estudios en estado líquido	83
3.2.1.1.	Estudio de los diagramas de solubilidad de fases	83
3.2.1.2.	¹ H-RMN	88

3.2.1.3.	^{13}C RMN	95
3.2.1.4.	Modelización molecular	98
3.2.2.	Estudios en estado sólido	100
3.2.2.1.	Estudio morfológico	100
3.2.2.1.1.	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	100
3.2.2.2.	Estudio térmico	105
3.2.2.2.1.	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	105
3.2.2.2.2.	Termogravimetría (TG)	113
3.2.2.2.3.	Termomicroscopía (HSM)	114
3.2.2.3.	Estudio espectral	123
3.2.2.4.	Espectroscopía de carbono 13 en estado sólido (CP/MAS ^{13}C RMN)	123
3.2.2.4.1.	Difracción de Rayos X (XRD)	125
3.2.2.4.2.	Espectroscopía de Infrarrojos (IR)	131
3.2.3.	Velocidad de disolución	138
3.2.3.1.	Influencia global de la técnica de elaboración y el tipo de CD	147
3.2.3.2.	Influencia del tamaño de cavidad: estudio de las CDs naturales	149
3.2.3.3.	Estudio sobre derivados de la β -CD: influencia del tipo de sustituyente	150
4.	CONCLUSIONES	153
5.	BIBLIOGRAFIA	159

INTRODUCCION

1.1. CICLODEXTRINAS (CDs)

1.1.1. Historia y concepto

El primer trabajo sobre el aislamiento de una sustancia reconocible como CD se realizó en 1891 por Villiers [Duchêne *et al.*, 1987, p. 213]. Dicho investigador aisló una pequeña cantidad de sustancia cristalina de un medio de cultivo de *Bacillus amylobacter*, el cual fue denominado *celulosina*, debido a su semejanza con la celulosa.

Entre 1903 y 1911, Schardinger profundizó en el estudio sobre la química de las CDs [Szejtli, 1982, p. 15], siendo el primero en aislar el bacilo productor del enzima responsable de la transformación del almidón en CD (*Bacillus macerans*). Schardinger caracterizó esta sustancia cristalina como una mezcla de dos oligosacáridos cíclicos, a los cuales denominó dextrina cristalina α y dextrina cristalina β , publicando la primera descripción detallada de la preparación y aislamiento de estos oligosacáridos cíclicos.

Posteriormente, Pringsheim descubre su poder complejante y su capacidad para formar compuestos de inclusión con diversas moléculas, modificando diferentes propiedades de las mismas, como solubilidad, estabilidad frente a diferentes agentes, etc. [Szejtli, 1982, p. 15].

Las CDs se definen como oligosacáridos cíclicos constituidos por un número variable de unidades de glucosa unidas mediante enlaces $\alpha \rightarrow (1,4)$. La característica estructural más importante de estos compuestos es su conformación toroidal [Saenger, 1980], que delimita una cavidad relativamente apolar, mientras que el exterior presenta naturaleza hidrofílica. Por este motivo, estas moléculas poseen la capacidad de formar compuestos de inclusión con muchos otros productos, tanto en medio líquido como en estado sólido [Szejtli, 1988, p. 1].

En los últimos años, las CDs han acaparado un gran interés dentro del campo farmacéutico, desde el punto de vista de la formación de compuestos de inclusión con moléculas con actividad farmacológica de naturaleza muy diversa. Dichas inclusiones o "encapsulaciones moleculares" pueden ser utilizadas en Tecnología Farmacéutica para la mejora, entre otras características, de la solubilidad acuosa, la estabilidad fisico-química o la biodisponibilidad.

1.1.2. Estructura química

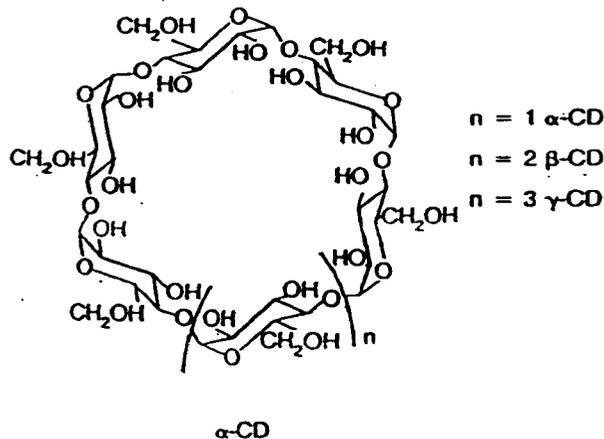
Como se ha comentado anteriormente, las CDs son oligosacáridos cíclicos constituidos por un número variable de unidades de glucosa unidas por enlaces $\alpha \rightarrow (1,4)$. El número de unidades define el nombre de las CDs, siendo las más usuales las de seis, siete y ocho unidades (α -, β - y γ -CD, respectivamente). Asimismo, existen CDs con mayor número de monómeros, como la δ -CD, de 9 unidades, pero aún su uso se encuentra muy limitado.

Debido a la conformación del C_1 de las unidades de α -D-glucopiranososa y la ausencia de libre rotación de los enlaces glucosídicos, estas moléculas no son totalmente cilíndricas, presentando una conformación troncocónica. Esta estructura se caracteriza por una orientación particular de los protones libres C_1 -H, C_2 -H, C_3 -H, C_4 -H y C_5 -H. Los C_1 -H, C_2 -H y C_4 -H se encuentran dirigidos hacia el exterior, mientras que los C_3 -H y C_5 -H lo están respectivamente hacia el interior de la cavidad. Por otra parte, los grupos hidroxilos secundarios (aquellos ligados a los átomos C_2 y C_3 de las unidades de glucosa) se encuentran situados en un polo del anillo, hallándose todos los hidroxilos primarios en el otro [Szejtli, 1988, p. 3]. Esto da lugar a que el exterior de la molécula de CD sea altamente hidrofílico [Duchêne y Wouessidjewe, 1990; Bekers *et al.*, 1991].

Los hidroxilos secundarios pueden formar puentes de hidrógeno entre sí, concretamente entre el hidroxilo secundario portado por el C_2 y el hidroxilo secundario portado por el C_3 del residuo glucopiranosil adyacente. De este modo, en las CDs se puede formar un cinturón completo de uniones de hidrógeno, pudiendo dar lugar a una estructura rígida, tal y como ocurre en la β -CD [Szejtli, 1988, p. 4; Bekers *et al.*, 1991].

De esta manera, la cavidad de la CD esta formada por un anillo de átomos de hidrógeno portados por los C_3 , otro anillo de átomos de oxígeno (los cuales corresponden a los de los enlaces glucosídicos) y un último anillo de átomos de hidrógeno portados por los C_5 , mostrando de esta forma la cavidad un carácter relativamente apolar [Szejtli, 1982, p. 21] (Figura 1).

En cuanto a su estructura cristalina, las moléculas de CD pueden presentar dos tipos de empaquetamiento: en entramado y en canal.



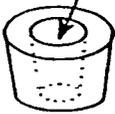
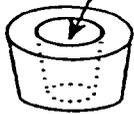
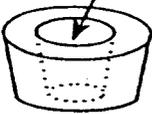
Cavity volume:		
174 \AA^3	262 \AA^3	427 \AA^3
		
$\alpha\text{-CD}$	$\beta\text{-CD}$	$\gamma\text{-CD}$
In one mol:		
104 mL	157 mL	256 mL
In one g:		
0.10 mL	0.14 mL	0.20 mL

Figura 1. Estructura química de las CDs naturales (procedente de J. Szejtli, "Cyclodextrin technology", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1988).

Los diferentes tipos de estructuras cristalinas y de empaquetamientos que presentan las CDs vienen recogidos en la Figura 2. En las estructuras cristalinas tipo entramado, la cavidad de cada molécula de CD se encuentra bloqueada en ambas caras por moléculas adyacentes, dando lugar a la aparición de cavidades aisladas. Dentro de este tipo de estructura, las moléculas de CD pueden presentar dos formas de empaquetamiento: tipo empalizada (Figura 2a) y tipo pared de ladrillos (Figura 2b).

En las estructuras tipo canal (Figura 2c), las moléculas se encuentran apiladas unas sobre otras como en un rollo de monedas, formando las cavidades canales sin fin.

Por otra parte, es importante señalar que las CDs en estado cristalino contienen moléculas de agua, las cuales forman parte de su estructura cristalina, hallándose tanto en el interior como en el exterior de la cavidad de la CD. Asimismo, es de destacar el papel de dichas moléculas de agua como parte integrante de la estructura cristalina de muchos compuestos de inclusión [Vicens *et al.*, 1988].

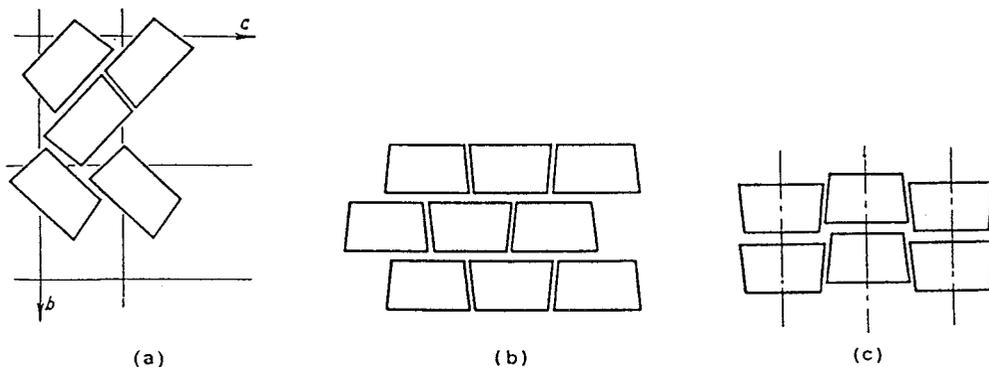


Figura 2. Tipos de estructuras cristalinas de las CDs (procedente de D. Duchêne, "Cyclodextrin and Their Industrial Uses", Editions de Santé, París, 1987).

1.1.3. Derivados de CDs

Muchos de los estudios actuales van encaminados hacia la segunda generación de CDs, con especial atención a la utilización de CDs modificadas químicamente, cuya gran variedad abre numerosas posibilidades [Szejtli, 1992]. La baja solubilidad relativa de las CDs naturales en agua, en especial en el caso de la β -CD, como consecuencia de la presencia de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares entre los grupos hidroxilo, así como la existencia de fenómenos de dimerización y precipitación en medio líquido, en especial para la β -CD y la γ -CD [Coleman *et al.*, 1992], limita considerablemente el campo de aplicación

farmacéutica de estos compuestos, en especial para vía parenteral. De esta forma, con el fin de mejorar algunas de sus características, como por ejemplo aumentar la baja solubilidad en agua de la β -CD o disminución de su toxicidad en aplicación por vía parenteral, se han desarrollado diferentes modificaciones sobre las CDs naturales.

Los grupos hidroxilo de las CDs constituyen los puntos de partida a la hora de realizar modificaciones estructurales, mediante incorporación de diversos grupos funcionales. Según el tipo de sustituyente introducido, pueden diferenciarse distintos tipos de derivados. Los más utilizados se describen a continuación.

1.1.3.1. Metil-CDs

Las metil-CDs constituyen los primeros derivados que han sido estudiados de forma intensiva desde el punto de vista de sus aplicaciones farmacéuticas [Uekama, 1984; Szejtli, 1983]. La introducción de grupos metilo a nivel de los hidroxilos de los C_2 , C_3 y C_6 evita la formación de estos enlaces de hidrógeno intramoleculares estabilizadores, dando lugar a una mayor flexibilidad de la conformación macrocíclica, lo que conduce a cambios importantes en las propiedades fisicoquímicas de las CDs de partida. Entre otras, es de destacar un aumento de la solubilidad en agua y en disolventes orgánicos con respecto a las CDs de partida.

Las CDs metiladas, debido a su mayor capacidad de interaccionar con membranas biológicas y a su carácter tensoactivo, presentan mayor actividad hemolítica que las CDs naturales. Por ello, la dimetil- β -CD o heptakis-(2,6-di-O-metil)- β -CD (DIMEB) y la trimetil- β -CD o heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- β -CD (TRIMEB) presentan una DL_{50} por vía parenteral relativamente alta, del orden de 200 mg/Kg, lo que restringe la aplicación en inyectables de estos derivados a dosis elevadas [Szejtli, 1984; Szeman *et al.*, 1987]. Sin embargo, estas CDs se pueden administrar sin riesgo alguno por vía oral [Rahman *et al.*, 1993].

1.1.3.2. Hidroxipropil-CDs

El objetivo principal de la hidroxipropilación de las CDs ha sido el aumentar la solubilidad acuosa del producto de partida, simultaneando las ventajas de un derivado hidrosoluble y una estructura amorfa [Pitha y Pitha, 1985]. La hidroxipropilación de las CDs

no es una reacción selectiva, sino que conduce a una combinación de productos con diferentes grados de sustitución. La coexistencia de varios tipos de hidroxipropil-CDs en la mezcla final explica su incapacidad para cristalizar y, en consecuencia, la obtención de un producto amorfo [Pitha, 1988].

El principal interés de estos derivados se basa en su aplicación para la administración por vía parenteral, ya que presentan una actividad hemolítica inferior a la de la CD natural correspondiente. Dicha actividad es menor a medida que aumenta el grado de sustitución [Yoshida *et al.*, 1989].

1.2. COMPUESTOS DE INCLUSION

1.2.1. Concepto

El término "einschlussverbindurg" (compuesto de inclusión) fue introducido por Schlenk en 1950; también se conoce en la literatura a través de otras denominaciones, tales como aducto, clatrato, compuesto molecular y complejo [Szejtli, 1988, p. 79].

Los complejos de inclusión son compuestos moleculares que presentan la estructura característica de un clatrato, en el cual la molécula hospedadora envuelve espacialmente a otra. El compuesto encerrado (la molécula huésped), se encuentra situado en la cavidad del hospedador, sin que su estructura se afecte de forma significativa. Aparte de una leve deformación, un hecho característico es que el tamaño y la forma de la cavidad disponible permanecen prácticamente inalterados.

Las CDs presentan la posibilidad de interactuar con una amplia variedad de especies iónicas y moleculares. Los compuestos de inclusión resultantes pertenecen a los complejos del tipo "hospedador-invitado".

1.2.2. Requerimientos para la formación de compuestos de inclusión

Como es bien sabido, la formación de los compuestos de inclusión se puede dividir en 6 etapas:

- (I) Aproximación de la molécula huésped hacia la CD.
- (II) Ruptura del agua de estructura del interior de la cavidad de la CD con eliminación de algunas moléculas de agua fuera del anillo.
- (III) Desordenación de la estructura del agua alrededor de la molécula que va a ser incluida y transporte de algunas moléculas de agua hacia la solución.
- (IV) Interacción de la molécula del sustrato o de algún sustituyente con grupos del borde o del interior de la cavidad de la CD.
- (V) Formación de posibles puentes de hidrógeno entre el sustrato y la CD.
- (VI) Restablecimiento de la estructura del agua alrededor de la parte exterior de la molécula después de la inclusión.

Resulta importante señalar que la formación de los puentes de hidrógeno es un proceso extremadamente rápido, y por lo tanto nunca será una etapa limitante del proceso de complejación. El proceso global se ve esquematizado en la Figura 3. La formación de compuestos de inclusión, sin embargo, debe cumplir una serie de requisitos, los cuales se enumeran a continuación.

1.2.2.1. Factores estéricos

Una de las principales propiedades de las CDs es la capacidad que poseen para formar inclusiones con una gran variedad de compuestos. De esta forma, el primer requerimiento para la formación de un compuesto de inclusión es que la molécula huésped pueda introducirse total o, al menos, parcialmente, en la cavidad de la CD [Hirayama y Uekama, 1987, p. 133]. De las diferentes etapas del proceso de complejación señaladas en el apartado anterior, las etapas 1, 4 y 5 están claramente influenciadas por la compatibilidad geométrica entre la CD y la molécula huésped.

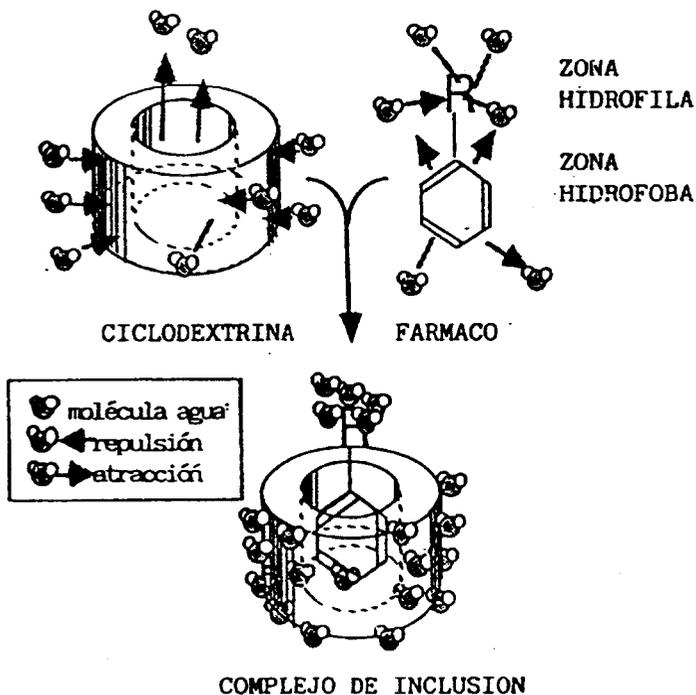


Figura 3. Esquema de la formación de un compuesto de inclusión.

Las diversas CDs presentan cavidades de diferentes dimensiones ($\gamma > \beta > \alpha$), por lo que una buena acomodación de la molécula huésped (o alguna parte de la misma) al tamaño de cavidad de un tipo concreto de CD se traducirá en un mayor número de interacciones entre ambas moléculas, hecho que se traduce en un valor más alto de constante de estabilidad [Blanco *et al.*, 1991]. A este respecto, ha de señalarse que no se formarán compuestos de inclusión estables con moléculas que sean demasiado pequeñas para ser atrapadas dentro de la cavidad de la CD, ya que tenderán a deslizarse fuera de la cavidad.

Tampoco es posible formar compuestos de inclusión de una determinada CD con moléculas que sean demasiado voluminosas, ya que tendrían dificultad para introducirse dentro de la cavidad de la CD. En cualquier caso, sí sería posible la formación del complejo

si penetraran ciertos grupos o cadenas laterales de dichas moléculas dentro de la cavidad de la CD [Bekers *et al.*, 1991].

En este sentido, resulta evidente como moléculas o radicales sustituyentes de pequeño tamaño son adecuadamente complejadas por la α -CD [Liveri *et al.*, 1992; Steffan *et al.*, 1992; Novak *et al.*, 1994; Pérez-Martínez *et al.*, 1995]. Por el contrario, moléculas con varios anillos aromáticos requieren para su complejación CDs con cavidades de mayor tamaño, como la β - y en especial la γ -CD [Vikmon *et al.*, 1985; Matsuyama *et al.*, 1987; Pitha *et al.*, 1987; Uekama *et al.*, 1987b; Giordano *et al.*, 1988; Tan *et al.*, 1991; Van Doorne y Bosch, 1991; Suenaga *et al.*, 1992].

Otro factor a tener en cuenta, respecto a la influencia de factores estéricos en el proceso de complejación, es la posible utilización de derivados de CDs. En general, la utilización de derivados tales como la DIMEB o HP- β -CD mejoran las características de complejación [Backensfeld *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1992; Choudhury y Nelson, 1992; Hirayama *et al.*, 1992; Krenn *et al.*, 1992; Chun y Yun, 1993; Peri *et al.*, 1994; Ventura *et al.*, 1994].

En este sentido, algunos autores han señalado como causa de esta mejora la expansión de la región hidrofóbica de la cavidad de la CD. Así, análisis estructurales de complejos de inclusión elaborados con DIMEB, mostraron que aunque se mantenían muchas de las características estructurales de la CD natural, se producía una extensión de la región toroidal debida a la sustitución de los grupos hidroxilos de la β -CD por grupos metoxilos [Green *et al.*, 1991]. En el caso de los complejos de inclusión de DIMEB con adamantol [Bettineti *et al.*, 1991], la profundidad de la cavidad de la CD se estimó entre 10 y 11 Å, ligeramente mayor a los 9.5 Å, calculados por estos autores para la β -CD.

En algunas ocasiones también se han descrito en la bibliografía situaciones en las cuales el empleo de derivados de CDs dificulta el proceso de complejación [Menard *et al.*, 1988; Moyano *et al.*, 1994a]. Esta disminución en la capacidad complejante de estos derivados parece estar relacionada con impedimentos de tipo estérico provocados por los sustituyentes de la CD.

1.2.2.2. Polaridad y carga

Además de los condicionantes estéricos, la polaridad de las moléculas huéspedes constituye un factor determinante en el proceso de inclusión. De este modo, aquellas moléculas de carácter fuertemente hidrófilo (muy solubles en agua) o grupos fuertemente hidratados e ionizados no se complejan o lo hacen débilmente [Szejtli, 1988, p. 79]. Con frecuencia, los complejos de especies iónicas son mucho menos estables que aquellos donde participan especies no ionizadas, siendo, en definitiva, la estabilidad del complejo proporcional al carácter hidrofóbico del huésped.

1.2.2.3. Medio

En principio, no es necesario ningún tipo de disolvente para que se pueda formar un compuesto de inclusión. Sin embargo, el proceso de complejación se ve favorecido en presencia de agua. La formación de complejos en solución es un proceso muy rápido; sin embargo, por regla general, las sustancias que poseen buena solubilidad se complejan débilmente. Análogamente, las moléculas que presenten una buena complejación suelen poseer baja solubilidad en agua.

En la preparación de complejos de inclusión en medio líquido pueden distinguirse dos etapas claramente diferenciadas. En la primera fase, es necesario que el fármaco pase del estado sólido a la solución acuosa que contiene la CD, es decir que se solubilice.

La segunda fase consiste en la formación en sí del complejo de inclusión tras el rápido establecimiento de un proceso de equilibrio. Por tanto, para optimizar el proceso de complejación se puede actuar incrementando la velocidad de la etapa de transferencia, siendo el método más frecuente la utilización de cosolventes.

Así, en caso de que la primera fase sea un factor limitante para alcanzar el equilibrio en solución entre CD y huésped, este último debe ser disuelto previamente en algún tipo de disolvente orgánico; sin embargo, la elección de este disolvente se encuentra restringida. Salvo algunos disolventes fuertemente hidrófilos de bajo peso molecular, tales como metanol, etanol, 2-metoxietanol, etilenglicol, dietilenglicol, glicerina, etc. [Szejtli, 1988, p. 84], la mayoría no pueden utilizarse, pues se forman complejos estables disolvente-CD.

Por tanto, y aunque la presencia de disolventes orgánicos no es deseable, en muchas ocasiones es necesario su uso, puesto que sin su participación no sería posible la complejación de sustancias muy poco solubles en una concentración o tiempo aceptable. Muchas veces, éstos no pueden ser eliminados en su totalidad, dado que permanecen como parte integral del producto en forma de complejo disolvente-CD, o bien como compuesto ternario (disolvente-huésped-CD) ligado a la cavidad de la CD. Un ejemplo es el caso del etanol: muchas inclusiones se preparan en su presencia y, como consecuencia, se suele encontrar entre un 0.01 y un 2 % de etanol en el producto final.

De entre todos los cosolventes, el etanol ocupa un lugar preponderante en la preparación de compuestos de inclusión. Respecto a la posible influencia del etanol sobre el proceso de complejación destacan los estudios realizados por Pitha y cols. [Pitha y Hoshino, 1992] quienes han estudiado la influencia del etanol en la formación de complejos de inclusión de testosterona y naranja de metilo, entre otras CDs, con la HP- β -CD. Estos autores encontraron que la adición de etanol disminuye y, eventualmente, suprime la formación de complejos de inclusión en solución acuosa. En el caso de la HP- β -CD esto ocurre por dos mecanismos. A bajas concentraciones de etanol (menores del 30 %), éste actúa como agente competidor con la testosterona por la cavidad de la CD. Por el contrario, para altas concentraciones se produce la disociación del complejo por efectos de disolvente no específicos.

A pesar de estos resultados, tras la evaporación de las soluciones etanólicas, que contendrían los complejos totalmente disociados, se obtendrían complejos de inclusión en estado sólido. Estos resultados se explican en base a que el proceso de complejación es rápido y permite que se produzca el proceso inverso, lo que parece indicar que este cosolvente puede ser ampliamente utilizado con éxito, sin interferir de modo apreciable en el proceso de complejación.

Alternativamente al etanol, en aquellas situaciones en las que no se consigue fácilmente la complejación, algunos autores recurren, en caso de sustancias de carácter ácido, a la adición de pequeñas cantidades de hidróxido de amonio, [Senel *et al.*, 1992; Pitha *et al.*, 1992], con el fin de aumentar la solubilidad acuosa del fármaco y favorecer, por tanto, el proceso de complejación.

1.2.3. Métodos de elaboración

No existe un modo universal de preparación para los complejos de inclusión, ya que el método empleado deberá adaptarse a las características del principio activo y a sus requerimientos. Por otra parte, hay que considerar si dicha técnica va destinada a la preparación a pequeña escala en laboratorio o, por el contrario, a una producción a gran escala a nivel industrial. Aunque la bibliografía recoge procedimientos muy diversos para la elaboración de los complejos de inclusión, éstos pueden ser clasificados en dos grandes grupos según su naturaleza.

1.2.3.1. Preparación de complejos en medio líquido

Todos ellos consisten, generalmente, en añadir a una solución acuosa de CD bajo agitación, el principio activo o una solución del mismo en agua u otro disolvente, si el principio activo es insoluble. El complejo se puede obtener por precipitación a partir de una solución, mientras que si no es posible dicha precipitación, el aislamiento del complejo se realizará mediante eliminación del disolvente por distintas técnicas. Las más comunes se tratan a continuación.

1.2.3.1.1. Obtención de complejos por precipitación

1.2.3.1.1.1. Coprecipitación

Este método es uno de los más comunes a la hora de preparar compuestos de inclusión, como se recoge en un trabajo de revisión realizado por nuestro grupo [Moyano *et al.*, 1995a]. La viabilidad de esta técnica viene determinada por el diagrama de fase de solubilidad que presente la sustancia a encapsular con una determinada CD, siendo necesario que pertenezca al tipo B de Higuchi [Higuchi y Connors, 1965], o sea, que el complejo formado en solución posea un límite de solubilidad por encima del cual precipite. Para su realización, se añade el principio activo a una solución acuosa de CD bajo agitación constante, en cantidades definidas por la parte descendente de la curva de solubilidad, pudiendo aplicarse calefacción en ciertos casos. Asimismo, en ocasiones, se puede favorecer la precipitación enfriando la solución. Por otra parte, es importante el ajuste del pH del medio, de tal manera que un fármaco de carácter ácido o básico débil se encuentre en

forma no ionizada, de forma que aumente su afinidad por la cavidad de la CD y por consiguiente se produzca un mayor rendimiento del proceso [Otero-Espinar *et al.*, 1989].

1.2.3.1.1.2. Neutralización

El método de neutralización constituye una variante de la técnica anterior, aplicable a principios activos ionizables. Consiste en adicionar a una solución acidificada o alcalinizada de CD (variable según el caso), el principio activo, con objeto de formar una sal soluble del mismo. Posteriormente, se ajusta el pH del medio a la neutralidad, de forma que el sustrato solubilizado pase a su forma no ionizada. De este modo, se logra una disminución de su polaridad, aumentando su afinidad por la cavidad de la CD y formándose el complejo de inclusión. El precipitado obtenido se aísla por filtración [Çelebi y Nagai, 1988].

1.2.3.1.2. Obtención de complejos mediante eliminación del disolvente

1.2.3.1.2.1. Evaporación

Esta técnica se basa en el empleo de disolventes orgánicos para solubilizar principios activos de baja solubilidad acuosa. Posteriormente, esta solución orgánica de principio activo se mezcla bajo agitación constante con una solución acuosa de CD o, si la CD es soluble en dicho disolvente orgánico puede emplearse éste. Asimismo, hay que tener en cuenta en la elección del disolvente que éste no debe formar complejo con la CD, como ya se ha comentado con anterioridad. El aislamiento del soluto puede llevarse a cabo mediante calefacción [Nakai *et al.*, 1990], evaporación a temperatura ambiente [Tous, 1990] o bien evaporación a presión reducida [Palmieri *et al.*, 1993].

1.2.3.1.2.2. Atomización (*spray-drying*)

Este método se basa en preparar una solución de la CD y del principio activo en agua o bien en una mezcla con otro disolvente orgánico. Esta solución se somete a agitación durante un cierto tiempo, tras el cual ésta se introduce en un atomizador, donde es nebulizada en forma de gotículas finamente divididas a alta temperatura, evaporándose de esta forma el disolvente y recogándose las partículas de soluto [Frijlink *et al.*, 1989; Moyano *et al.*, 1995a].

1.2.3.1.2.3. Liofilización (*freeze-drying*)

En síntesis, se procede exactamente igual que en el caso de la atomización, para posteriormente eliminar el disolvente tras congelación y sublimación a vacío. En aquellos casos donde el principio activo sea de carácter ácido, se puede favorecer su solubilización mediante la adición de una pequeña cantidad de hidróxido de amonio, el cual se elimina durante el proceso de liofilización [Tous, 1990; Torres-Labandeira *et al.*, 1993].

1.2.3.2. Preparación de complejos en medio sólido

Dentro de este grupo se incluyen el amasado, la trituración y el calentamiento en contenedor sellado, como métodos más representativos.

1.2.3.2.1. Amasado

Otro método para la preparación de inclusiones es el llamado amasado. En este caso, la CD no se disuelve, sino que se amasa hasta formar una pasta junto con una pequeña cantidad de cosolvente en un mortero, generalmente agua [Moyano *et al.*, 1995b; Jayachandra-Babu y Pandit, 1995] o mezclas hidroalcohólicas [Giordano *et al.*, 1992], adicionándose a dicha pasta el principio activo de forma paulatina. La mezcla se somete a amasado durante un tiempo variable, secándose la pasta obtenida en estufa o a vacío. Normalmente, esta técnica conduce a un rendimiento de encapsulación bajo [Esclusa-Díaz *et al.*, 1995].

1.2.3.2.2. Molienda

La técnica se basa en someter a una mezcla física fármaco-CD a un proceso de pulverización en un molino, de características variables según el caso, a tiempo variable [Lin y Lee, 1989; Lin y Perng, 1992]. Este método está especialmente indicado para principios activos sensibles a la hidrólisis, ya que no es necesario utilizar cosolventes de ningún tipo [Arias, 1995, p. 37].

1.2.3.2.3. Contenedor Sellado

Se basa en la introducción de una mezcla física de CD y principio activo previamente pulverizados en un recipiente hermético (de acero o vidrio), sometiéndola a continuación a calentamiento a una temperatura definida durante un tiempo establecido [Rahman *et al.*, 1993]. En este caso, la obtención de buenos rendimientos de complejación dependen tanto de una correcta elección de los parámetros de temperatura y tiempo, así como del contenido en agua [Nakai *et al.*, 1989; Anguiano-Igea *et al.*, 1992].

1.2.4. Métodos de estudio

En el transcurso de la formación del complejo de inclusión, pueden estar implicadas diferentes interacciones moleculares (interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno) entre el principio activo y el hospedador, que se producen independientemente o en cooperación [Giordano y La Manna, 1991]. Estas interacciones pueden modificar las propiedades fisicoquímicas de los componentes, siendo el estudio de estas alteraciones lo que permitirá seguir la inclusión y determinar la naturaleza del complejo formado. Existe una gran diversidad de métodos de estudio de los complejos de inclusión. Para su aplicación hay que tener en cuenta que éstos pueden presentarse en solución o en estado sólido.

1.2.4.1. Métodos de estudio de los complejos en solución

Aunque la formación de complejos de inclusión en solución puede ser detectada por varios métodos, en este capítulo sólo se considerarán los más utilizados:

1.2.4.1.1. Métodos espectroscópicos

Todos ellos poseen el mismo principio general. Se trata de realizar el espectro de cada componente aislado (principio activo y CD) y por otra parte el del compuesto de inclusión. Las modificaciones observadas permitirán constatar la inclusión y, en ciertos casos, determinar la constante de estabilidad (K_c) de los complejos formados.

1.2.4.1.1.1. Espectrofotometría Ultravioleta (UV)

Por medio de esta técnica (método de desplazamiento espectral), se estudia el efecto de la concentración de CD sobre el espectro UV de una determinada sustancia. La presencia de un desplazamiento del máximo de absorción del espectro, normalmente de tipo batocrómico, (aunque también puede darse de tipo hipsocrómico [Leroy-Lechat *et al.*, 1992]), acompañada de una variación en la intensidad del máximo de absorción, indica la formación de un compuesto de inclusión en solución [Connors y Mollica, 1966; Cramer *et al.*, 1967; Uekama y Otagiri, 1984; Vikmon *et al.*, 1985; Rajagopalan *et al.*, 1986; Si-Nang *et al.*, 1987; Bettinetti *et al.*, 1989; Puglisi *et al.*, 1990; Ismail, 1991; Ismail, 1992; Cotta-Ramusino *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993].

1.2.4.1.1.2. Resonancia Magnética Nuclear de Protones (^1H -RMN)

La espectroscopía de ^1H -RMN constituye actualmente una de las técnicas más utilizadas para el estudio de la estabilidad, estequiometría y geometría de los compuestos de inclusión, sobre todo en aquellos casos donde técnicas alternativas muestran resultados contradictorios entre sí [Djedaini y Perly, 1990, pp. 124-129]. En el caso de las CDs, si la molécula huésped se acomoda en la cavidad de la CD, los átomos de hidrógeno localizados en el interior de la cavidad (H_3 y H_5) mostrarán considerables variaciones en sus valores de desplazamientos químicos en presencia de cantidades crecientes de fármaco, unido a variaciones mínimas de los desplazamientos de los protones localizados en la parte externa del anillo (H_1 , H_2 y H_4), lo cual evidenciará el proceso de inclusión [Ikeda *et al.*, 1975; Otagiri *et al.*, 1976; Si-Nang 1989; Vanhoeve *et al.*, 1989; Mullers y Albers, 1992].

Por otra parte, cada vez se halla más extendido el uso de la espectroscopía de ^1H -RMN para el cálculo de la estequiometría de los compuestos de inclusión, mediante la realización de la técnica de los puntos de Job [Job, 1928], donde se representa la variación de los valores de desplazamiento químico para un determinado protón frente a la fracción molar fármaco:CD en una disolución fármaco-CD. El punto de variación máximo indicará el valor de fracción molar de máxima interacción y, por tanto, la estequiometría del compuesto de inclusión [Djedaini y Perly, 1991b; Guo *et al.*, 1994]. Asimismo, en muchos casos será posible el cálculo de la constante de estabilidad aparente mediante la aplicación de las ecuaciones de Scott [Scott, 1956] o de Benesi-Hildebrand [Benesi y Hildebrand, 1949],

basándose en los valores de variación de los desplazamientos químicos [Djedaini *et al.*, 1990; Ganza-González *et al.*, 1994].

Asimismo, es de destacar la aplicación cada vez mas frecuente de técnicas avanzadas de espectroscopía de ^1H -RMN para la caracterización de los compuestos de inclusión con CDs, como el estudio del efecto nuclear *Overhauser* (nOe). Este efecto se produce cuando dos núcleos con spin, tales como los protones, se encuentran muy próximos entre sí ($\approx 4 \text{ \AA}$), comportándose como dipolos. De esta forma, al saturar la señal de un protón, se observará un aumento de la señal del o de los protones que se hallen vecinos al protón saturado. En nuestro caso, la saturación de la señal de uno de los protones de la cavidad (H_3 o H_5), dará lugar al aumento de la señal de aquellos protones del fármaco próximos a dichos protones, es decir, situados en el interior de la cavidad. Ello permite identificar los átomos que interaccionan entre las dos moléculas (CD y huésped), constituyendo una poderosa herramienta para la elucidación de la estructura del complejo de inclusión en medio líquido [Bekers *et al.*, 1991b; Fronza *et al.*, 1992; Hirayama *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1992; Mulinacci *et al.*, 1993; Ndou *et al.*, 1993].

1.2.4.1.1.3. Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 (^{13}C -RMN)

Esta técnica espectroscópica proporciona una gran información sobre el entorno individual de cada carbono y de sus interacciones moleculares y es uno de los métodos mas útiles en el análisis de la estructura y la dinámica molecular de complejos de inclusión en CDs, a partir de la medida de los valores de desplazamientos químicos y de los tiempos de relajación (τ), indicativos de la movilidad de la moléculas, siendo diferente entre la forma libre y la forma complejada [Inoue *et al.*, 1987]. Esta espectroscopía también se aplica de forma análoga a la RMN de protones para el cálculo de la estequiometría de los compuestos de inclusión [Bettinetti *et al.*, 1991]. Asimismo, al igual que en el caso de la espectroscopía de protones, es frecuente el estudio conjunto de las espectroscopías de ^{13}C -RMN y ^1H -RMN, también conocido como espectroscopía de correlación (^{13}C - ^1H -COSY) para una correcta asignación de los diferentes picos de las señales de C e H correspondientes tanto al fármaco como a la CD y al complejo. Numerosos autores han utilizado esta técnica para investigar el modo de inclusión de distintos complejos de inclusión [Uekama *et al.*, 1984; Inoue *et al.*, 1987b; Nakai *et al.*, 1987; Parrot-López *et al.*, 1990; Claudy *et al.*, 1991; Hirayama *et al.*, 1992].

1.2.4.2. Métodos de estudio de los complejos en estado sólido

La detección de la presencia de posibles compuestos de inclusión de CDs en estado sólido, puede llevarse a cabo por diferentes técnicas. A continuación se tratarán las más usuales en este campo.

1.2.4.2.1. Métodos térmicos

1.2.4.2.1.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Estas técnicas se basan en la medida de la cantidad de calor absorbida o liberada por una muestra sometida a un programa de temperaturas, representándose en ordenadas el calor intercambiado, frente a la temperatura en abscisas. El estudio comparado de los termogramas obtenidos para el principio activo, CD, las mezclas físicas molécula huésped-CD y las del teórico compuesto de inclusión, permitirá en muchos casos confirmar o descartar la presencia de dicho complejo [Fujioka *et al.*, 1983; Uekama *et al.*, 1983c; Çelebi y Nagai, 1987; Nakai *et al.*, 1987; Giordano *et al.*, 1988; Lin *et al.*, 1988; Vincieri *et al.*, 1988; Kitamura *et al.*, 1990; Claudy *et al.*, 1991; Uekama *et al.*, 1992; Hanawa *et al.*, 1993].

1.2.4.2.1.2. Termogravimetría (TG)

Esta técnica se basa en el estudio de la variación de peso de una muestra mientras es sometida a un programa de temperaturas, siendo útil para el estudio de la complejación de aquellas sustancias que presenten fenómenos de descomposición o volatilización por debajo de la temperatura de descomposición de las CDs (a partir de 250 °C). De esta forma, el análisis termogravimétrico se convierte en un complemento ideal de los estudios por DSC, permitiendo asignar los diversos intercambios de calor registrados por DSC a diferentes procesos, tales como fusión, sublimación, evaporación, transiciones sólido-sólido o fenómenos de deshidratación, etc., siendo una técnica muy utilizada para la caracterización de compuestos de inclusión de CDs con sustancias volátiles [Uekama *et al.*, 1979; Szafranek y Szafranek, 1983; Mazzi *et al.*, 1988; Nakai *et al.*, 1988; Claudy *et al.*, 1991].

1.2.4.2.1.3. Microscopía de Platina Caliente (HSM)

Aunque la utilización de la termomicroscopía de platina caliente en el campo de las inclusiones con CDs está bastante limitada, puede resultar una técnica de utilidad, en especial para aquellos sistemas en los cuales el fármaco presenta un punto de fusión superior al de las CDs [Arias, 1995, p. 121].

En efecto, cabe esperar que los verdaderos compuestos de inclusión presenten un único efecto de fusión, tras el cual se obtenga un fluido homogéneo constituido por una sola fase correspondiente a dicho complejo. Por contra, en una simple mezcla física, cabe esperar que tras la fusión del componente de menor punto de fusión, se obtenga un sistema bifásico, donde el producto de mayor punto de fusión permanece aún en estado sólido.

Cuando el principio activo funde a menor temperatura que la CD, resulta difícil de detectar su cambio de estado visualmente, puesto que su porcentaje en peso en la mezcla suele ser minoritario respecto al de la CD, por lo que sería muy difícil de confirmar que se tratase de un verdadero compuesto de inclusión.

Muy recientemente, se ha aplicado esta técnica con éxito para poner en evidencia el proceso de transformación sólido-sólido que registra la β -CD a 220 °C [Kohata *et al.*, 1993; Novak *et al.*, 1994; Bettinetti *et al.*, 1994].

1.2.4.2.2. Métodos espectroscópicos

1.2.4.2.2.1. Espectroscopía de Infrarrojos (IR)

Esta técnica espectroscópica también es empleada para determinar el tipo de interacción entre las CDs y la molécula huésped en estado sólido. Se basa en el estudio del desplazamiento de las bandas características de los grupos funcionales de la molécula huésped, pues la vibración y/o rotación de los enlaces en una molécula incluida en la cavidad de la CD se encuentran restringidas. Esto se traducirá en un desplazamiento o disminución de las bandas características de los grupos funcionales de dicha molécula, en comparación con el espectro de la molécula pura [Uekama *et al.*, 1983a; Vila-Jato *et al.*, 1987; Erden y Çelebi, 1988; Ghandi y Karara, 1988; Giordano *et al.*, 1988; Glomot *et al.*,

1988; Szejtli, 1988, p. 190; Russell y McNamara, 1989; Lin, 1990; Rahman *et al.*, 1991].

1.2.4.2.2.2. Difracción de Rayos X (XRD)

La XRD de polvos se presenta como un método idóneo para la detección de compuestos de inclusión de CDs en polvo o de estados microcristalinos [Vanhoeve *et al.*, 1989]. Si existe un verdadero compuesto de inclusión, debido a los cambios en los picos de difracción, los patrones de difracción del compuesto de inclusión se distinguen claramente de la superposición de cada componente en una mezcla física. El estudio del patrón de difracción permite determinar, además, el grado de cristalinidad de la muestra [Gelb *et al.*, 1978; Corrigan y Stanley, 1982; Sekikawa *et al.*, 1983; Uekama *et al.*, 1984; Si-Nang *et al.*, 1989; Nozawa *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1992; Shangraw *et al.*, 1992].

Por otra parte, la difracción de rayos X de cristal simple se muestra como una poderosa herramienta a la hora de abordar un estudio profundo de la estructura y conformación del compuesto de inclusión formado (sistema de cristalización, grupo espacial de simetría, constantes de la celda unidad, etc.) [Harata *et al.*, 1988; Caira *et al.*, 1994]. Sin embargo, posee el inconveniente de que se trata de una técnica laboriosa, siendo además necesario la obtención del complejo puro en forma de un cristal de dimensiones y características aceptables [Hirayama y Uekama, 1987, p. 156].

1.2.4.2.2.3. Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 en estado sólido (CP/MAS ¹³C RMN)

Las técnicas de RMN en estado sólido son de gran interés para el estudio de complejos de inclusión y otros clatratos. Así, la espectroscopía de ¹³C RMN se caracteriza por el hecho de que los apantallamientos de los núcleos reflejan no sólo cambios de tipo químico, sino también inequivalencias cristalográficas en la celda unidad. De esta forma, la existencia de un complejo en estado sólido puede confirmarse mediante la observación de las líneas de la molécula huésped en el espectro. Asimismo, multiplicidades de las señales que puedan aparecer en el espectro en estado sólido y no en solución indicarán una asimetría en la posición de los átomos de carbono de la CD, proporcionando información sobre la estructura cristalina, siendo especialmente útil en muestras que no pueden ser estudiadas por cristalografía de rayos X [Ripmeester, 1983; Imai *et al.*, 1988; Gidley y Bociek, 1988].

Esta técnica va destinada a la caracterización de compuestos de inclusión y otros clatratos aislados en estado puro [Ripmeester, 1986].

1.2.4.2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La SEM se utiliza en el estudio de aspectos microscópicos de las materias primas puras (CDs y principios activos), así como los productos obtenidos por diversos métodos (coprecipitación, atomización, molienda, etc.). Aunque exista una clara diferencia entre el estado de cristalización del material de partida y el del producto final, este método no es el idóneo para confirmar la presencia de un verdadero compuesto de inclusión; sin embargo, sí es útil para determinar la existencia de un único componente en el producto final [Erden y Çelebi, 1988; Torres-Labandeira *et al.*, 1991a; Ginés *et al.*, 1992b; Ginés *et al.*, 1992c; Krenn *et al.*, 1992; Arias *et al.*, 1994, Moyano *et al.*, 1994a, Moyano *et al.*, 1995c].

1.2.4.2.4. Modelización molecular

El empleo de la simulación por ordenador alcanza actualmente diferentes campos de la Ciencias, entre las que destacan la Bioquímica y la Química Orgánica. Esta técnica permite determinar la compatibilidad geométrica del fármaco con las cavidades de las diferentes CDs empleadas, estudiando las diferentes posibilidades de orientación, tanto de la molécula de fármaco como la/s de CD/s, poniendo de manifiesto la posibilidad de penetración en la cavidad de la CD del fármaco o bien de algunos de sus sustituyentes. De esta forma, la modelización molecular se presenta como una herramienta de enorme utilidad a la hora de racionalizar los resultados obtenidos por técnicas de RMN, tanto en solución como en estado sólido, y técnicas de cristalografía de rayos X, siendo objeto de estudio, a partir de los tipos de interacciones posibles entre ambas moléculas en las diferentes orientaciones propuestas en función de los átomos o grupos funcionales que se encuentren más próximos [Cabral-Marques *et al.*, 1990; Djedaini y Perly, 1990b, pp. 217-296; Wiese *et al.*, 1991; Amato *et al.*, 1992].

1.3. APLICACIONES

Las aplicaciones prácticas de las CDs han ido ganando importancia con el paso de los años. Las ventajas de sus distintos usos potenciales y su cada vez más fácil disponibilidad

en el mercado juegan un papel decisivo en el interés manifiesto por las mismas. Las aplicaciones prácticas son numerosas. Así, las CDs son utilizadas en los campos de la Alimentación, Cosmética y Perfumería, Pesticidas, Farmacia, Tecnología Química, Química Analítica, etc. [Uekama *et al.*, 1979; Baeyens *et al.*, 1988; Szejtli, 1988, p. 186].

1.3.1. Importancia en el campo farmacéutico

Las propiedades fisicoquímicas de las moléculas huésped pueden verse alteradas al ser rodeadas por el entorno hidrofóbico de la cavidad de la CD. Estas modificaciones pueden ser útiles para la formulación de medicamentos. De esta forma, un fármaco puede aumentar su solubilidad y su velocidad de disolución, presentar una mayor biodisponibilidad, reducir posibles efectos secundarios, además de mejorar su estabilidad [Fröming y Szejtli, 1994, pp. 105-115].

1.3.1.1. Preformulación

El empleo de CDs proporciona mejoras en los procesos tecnológicos de elaboración de formas farmacéuticas [Bekers *et al.*, 1991]. Así, un fármaco líquido puede ser transformado en polvo, mejorando de este modo su manipulación y manufactura [Anguiano-Igea *et al.*, 1992]. También es de destacar las buenas características de las CD para su utilización como excipientes de compresión directa [Pitha y Pitha, 1985; Ismail, 1993].

Por otra parte, la dosificación uniforme de pequeñas cantidades de fármaco puede mejorarse mediante formulación de complejos microcristalinos. Asimismo, pueden prepararse inyectables de preparación extemporánea mediante la elaboración de compuestos de inclusión con CDs, obtenidos por liofilización.

Asimismo, el empleo de la complejación con CDs permite en muchas ocasiones el enmascaramiento de características organolépticas desagradables del fármaco complejado, como en el caso del antiinflamatorio fenbufeno, tras complejación con la α -CD [Miyaji *et al.*, 1992].

1.3.1.2. Aumento de la solubilidad y de la velocidad de disolución

El compuesto de inclusión de un fármaco poco soluble es, por norma general, más hidrofílico que el fármaco en forma libre. Ello se traduce en una humectación más fácil y en una disolución del fármaco más rápida y completa [Szente y Szejtli, 1987]. El aumento de la solubilidad puede ponerse de manifiesto a partir del estudio de diagramas de solubilidad, mientras que la velocidad de disolución puede ser determinada mediante estudios cinéticos [Duchêne *et al.*, 1987, p. 235].

En general, puede llegarse a la conclusión de que el aumento de la velocidad de disolución de moléculas de fármaco formuladas junto con CDs es el resultado de varios factores: incremento de la solubilidad, mejora de la humectabilidad, disminución de la cristalinidad, dispersión molecular y aumento de la superficie disponible para disolución [Corrigan y Stanley, 1982; Chow y Karara, 1986; Ghandi y Karara, 1988; Hassan *et al.*, 1990; Çelebi y Erden, 1992].

Sin embargo, ha de señalarse que no siempre es necesario preparar verdaderos compuestos de inclusión para mejorar las velocidades de disolución. Las mezclas físicas de principios activos poco solubles o insolubles presentan a menudo mejores velocidades de disolución que los fármacos solos [Ling *et al.*, 1991].

1.3.1.3. Mejora de la biodisponibilidad

Dentro de este apartado, se hace hincapié en la vía oral, por ser esta la forma de administración del fármaco objeto de nuestro estudio. Para aquellos principios activos cuya velocidad de disolución limite la velocidad de absorción, es posible aumentar aquélla mediante la formación de compuestos de inclusión con CDs. Como ejemplos, se puede citar el caso del ácido 4-bifenilacético, cuya biodisponibilidad oral es mejorada sensiblemente tras su complejación con β -CD [Puglisi *et al.*, 1991], así como el fenbufeno tras complejación con la α y γ -CD [Miyaji *et al.*, 1992].

Sin embargo, también debe tenerse en cuenta la importancia de la constante de estabilidad del complejo formado. De esta forma, complejos con bajos valores de constantes de estabilidad, al ser administrados, tienden a una rápida liberación del fármaco, pudiendo

llegar a la concentración de saturación y precipitando, reduciéndose de esta manera el efecto que la complejación posee sobre la biodisponibilidad del fármaco.

Por el contrario, si la constante de estabilidad del complejo es alta, la velocidad de liberación del fármaco tiende a ser lenta y la concentración de fármaco libre en las proximidades del área donde se produce la absorción tiende a ser baja.

Se ha establecido que solamente aquellos compuestos de inclusión que posean valores de constante de estabilidad entre 200 y 5000 L·mol⁻¹ pueden utilizarse para mejorar la biodisponibilidad de fármacos hidrofóbicos [Pitha *et al.*, 1992c]. En este último caso, la administración de un compuesto de inclusión junto con otra molécula que compita con el fármaco por la cavidad de la CD puede mejorar la biodisponibilidad de ese fármaco. Esto ha sido demostrado por Tokumura y cols. [Tokumura *et al.*, 1986] en el estudio de la biodisponibilidad oral del complejo cinarizina- β -CD con DL-fenilalanina como agente competidor. Las CDs sólo pueden actuar como portadores que transfieren el fármaco desde el medio acuoso a la membrana lipófila gastrointestinal, no pudiendo absorberse los compuestos de inclusión debido a su tamaño y carácter hidrófilo.

1.3.1.4. Mejora de la estabilidad física y química

El contenido de principio activo en distintas formulaciones puede disminuir con el tiempo debido a procesos de degradación tales como hidrólisis, oxidación, volatilización, sublimación, descomposición por el calor o la luz, reacción con excipientes de la formulación, etc..

Muchos fármacos pueden ser estabilizados frente a estas reacciones mediante complejación con CDs. Se han realizado múltiples investigaciones sobre este tema, de las cuales se comentarán, a modo de ejemplo, sólo algunas de ellas; así, el melfalán y el ácido acetilsalicílico aumentan su estabilidad frente a la hidrólisis mediante inclusión en la HP- β -CD y en la DIMEB [Loftsson *et al.*, 1990].

Szjetli y cols. han estudiado la inclusión de diferentes sustancias volátiles, tales como aromas vegetales, esencias, anetol, alcanfor, mentol y timol [Gialne-Fuzy *et al.*, 1984; Szente *et al.*, 1985], observando una disminución de pérdidas por volatilización (tanto de la

evaporación en líquidos como de la sublimación en sólidos) y una mejora en su manipulación (en particular en aquellos casos en que existe transformación de líquidos en sólidos), permitiendo la mejora de la calidad de formas de dosificación donde se encuentren incorporados, en especial supositorios [Szente *et al.*, 1985] e inhalaciones [Gialne-Fuzy *et al.*, 1984].

También es importante tener en cuenta la estabilidad del fármaco en el pH del medio gástrico. Así, la proscillaridina, por inclusión en β - y γ -CD [Uekama *et al.*, 1983b], aumenta su resistencia al medio gástrico. Por otra parte, la hidrólisis del benzoato de metronidazol se reduce por complejación con β -CD [Andersen y Bunggaard, 1984].

1.3.1.5. Reducción de la toxicidad de los fármacos

La inclusión puede disminuir los efectos secundarios derivados de la administración de medicamentos. Esto ha sido demostrado mediante la disminución del efecto ulcerogénico de varios antiinflamatorios no esteroideos, como por ejemplo el naproxeno [Otero-Espinar *et al.*, 1991], por inclusión con β -CD.

Por otra parte, la disminución de la irritación local en músculo y/o de los efectos hemolíticos inducidos por fármacos administrados por vía parenteral o tópica mediante complejación con CDs no metiladas, como la clorpromacina [Uekama e Irie, 1985], confirman este hecho. Por último, la capacidad complejante de las CDs también puede emplearse en la disminución de la toxicidad de determinados fármacos, tales como la gentamicina [Uekama *et al.*, 1993].

1.3.1.6. Liberación sostenida

Además de diferentes derivados hidrofílicos, particularmente utilizados para mejorar la solubilidad y/o la velocidad de disolución de fármacos poco solubles, se han desarrollado derivados de CDs de tipo hidrofóbico. De esta forma, la introducción de grupos etilo en la molécula de β -CD como sustituyentes de los grupos hidroxilo, da lugar a un descenso de su solubilidad acuosa en proporción a su grado de sustitución. Estos derivados hidrofóbicos, como por ejemplo heptakis (2,6-di-O-etil)- β -CD (DE- β -CD) y heptakis (2,3,6-tri-O-etil)- β -CD (TE- β -CD), son candidatos a ser empleados como portadores de fármacos para obtener

liberación sostenida. En los trabajos de Uekama y cols. se recogen diferentes ejemplos de la posibilidad del empleo de derivados etilados para conseguir liberación sostenida de ciertos fármacos, como el diltiazem [Horiuchi *et al.*, 1990] y el dinitrato de isosorbide [Uekama *et al.*, 1987a; Hirayama *et al.*, 1988]. Para finalizar este apartado, es de destacar el diseño de formas farmacéuticas de liberación controlada donde se combinan el uso de CDs hidrosolubles para la elaboración de un compuesto de inclusión de alta solubilidad, cuya liberación se halla modulada mediante el empleo de matrices de diferente naturaleza, como por ejemplo el control de la liberación del nifedipino mediante el empleo mixto de HP- β -CD e hidroxipropilcelulosa [Wang *et al.*, 1993], así como del diazepam, mediante elaboración de matrices erosionables que incluyen el complejo con la HP- β -CD [Conte *et al.*, 1993]. Por último, comentar que se están realizando distintos estudios sobre la combinación entre complejos de inclusión con CDs y liposomas [McCormack y Gregoriadis, 1994].

1.4. PRINCIPIO ACTIVO

La gliclazida (1-(1-azabicyclo(3,3,0)octil)-3-(p-tolilsulfonil)urea) es una sulfonilurea de segunda generación utilizada como hipoglucemiante oral en el tratamiento de la diabetes mellitus no insulino dependiente, perteneciendo al mismo grupo que la glibenclamida. Su estructura química se recoge a continuación:

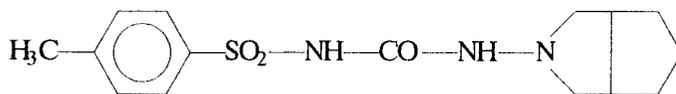


Figura 4. Formula química de la gliclazida.

1.4.1. Propiedades fisico-químicas

El principio activo se presenta como polvo cristalino, blanco, inodoro, no higroscópico, presentando cierta inestabilidad a la luz. Su punto de fusión se sitúa en torno a los 169 °C.

Desde el punto de vista químico, la molécula se comporta como un ácido débil ($pK_a = 5.8$). Es prácticamente insoluble en agua, siendo soluble en alcohol etílico y metílico y en

la mayoría de disolventes orgánicos usuales, debido a la alta liposolubilidad que posee por la presencia de los grupos azabiciclooctilo y tolilo [Winters *et al.*, 1994]. Asimismo, debido a su carácter de ácido débil, es soluble en soluciones acuosas de amoníaco, hidróxido sódico e hidróxido potásico. Su peso molecular es de 323.4 [Reynolds, 1993, pp. 279-280 ; Winters *et al.*, 1994].

1.4.2. Características farmacocinéticas

Tras la administración por vía oral de la gliclazida, las concentraciones plasmáticas máximas (2.8 y 3.9 mg/L) y los valores de t_{max} (0.4 y 4.8 horas) muestran una gran variabilidad en estudios en humanos, aunque se sabe que una vez disuelta, la gliclazida se absorbe rápidamente desde el tracto gastrointestinal. Su relativamente bajo volumen de distribución (de 15.9 a 17.4 L) sugiere una limitada distribución a tejidos, la cual viene explicada en parte por la alta unión a proteínas plasmáticas que presenta, especialmente a la albúmina (85 al 97 %) [Kobayashi *et al.*, 1984].

Como sucede en el caso de otras sulfonilureas, la gliclazida se metaboliza parcialmente a nivel hepático a metabolitos hidroxilados o N-oxigenados, así como en forma de alcohol y ácido carboxílico, siendo todos ellos inactivos.

En cuanto a la eliminación, sobre la dosis administrada, el 60-70 % se elimina por vía renal, de la cual sólo un porcentaje inferior al 20 % se halla en forma inalterada. Asimismo, del 10 al 20 % del fármaco se elimina en heces. La semivida de eliminación puede variar entre sexos, situándose alrededor de 8 horas para varones y sobre 11 horas para mujeres [Holmes *et al.*, 1984]. Asimismo, es de destacar que la insuficiencia renal sólo presenta un leve efecto sobre el perfil farmacocinético de la gliclazida [Palmer y Brogden, 1993].

1.4.3. Farmacología

La gliclazida actúa reduciendo los niveles de glucosa en sangre mediante un mecanismo múltiple, estimulando la secreción de insulina y reduciendo la resistencia periférica a la misma, la cual es muy frecuente en pacientes con diabetes mellitus no insulino dependiente. Asimismo, aumenta la sensibilidad de las células β del páncreas a los niveles de glucosa en sangre [Veneman *et al.*, 1991; Cuéllar, 1996, pp. 132-133].

La gliclazida actúa como transportador de iones calcio hacia el interior de las células β del páncreas, los cuales intervienen en el proceso de secreción de la insulina [Holmes *et al.*, 1984; Winters *et al.*, 1994].

Es importante señalar que la gliclazida también presenta efectos beneficiosos a nivel cardiovascular, al poseer acción antiagregante plaquetaria y además retrasar la aparición de retinopatías, siendo ello muy interesante desde el punto de vista de los pacientes diabéticos, los cuales presentan con mucha frecuencia este tipo de problemas [Palmer y Brogden, 1993].

La gliclazida, como ya se ha comentado, se emplea en el tratamiento de la diabetes mellitus no insulino dependiente estable, no complicada con cetoacidosis en aquellos casos que no pueda controlarse únicamente con la dieta. La dosis en adultos oscila entre 40 y 80 mg/día, pudiendo aumentarse gradualmente hasta 320 mg/día repartida en dos tomas diarias [Catálogo de Especialidades Farmacéuticas, 1996, p. 370].

1.4.4. Elaboración de compuestos de inclusión con gliclazida: interés biofarmacéutico

La elección de este principio activo para su formulación con CDs se ha basado en las siguientes premisas:

- La administración de antidiabéticos orales está indicada para enfermedades que afectan a amplios sectores de la población y por ello, es de gran importancia práctica la mejora y optimización de nuevas formulaciones sobre las ya existentes en el mercado.

- La gliclazida presenta una biodisponibilidad relativamente baja por vía oral, con grandes variaciones interindividuales [Holmes *et al.*, 1984]. Esto puede atribuirse, con toda seguridad, a su baja solubilidad acuosa, que haría que el proceso de disolución fuera el factor limitante de la absorción; por lo cual la gliclazida podría beneficiarse de su formulación con CDs.

- Igualmente su elevada t_{\max} (hasta 4.8 h) seguramente está relacionada con la lenta absorción que presenta el fármaco desde el tracto gastrointestinal, debido igualmente a su baja velocidad de disolución en fluidos acuosos. Así, el empleo de la complejación con CDs se presenta *a priori* como una técnica válida para la aceleración del proceso de absorción.

- Favoreciendo la absorción del fármaco, de forma que ésta se produzca totalmente, se puede contemplar la disminución de la dosis de principio activo necesaria para lograr un efecto terapéutico óptimo.

1.5. OBJETIVOS

Una de las técnicas más ampliamente utilizadas en los últimos tiempos para lograr un aumento de la biodisponibilidad de los fármacos es la elaboración de compuestos de inclusión con CDs.

La irregular absorción de la gliclazida, debida a sus bajos valores de solubilidad y velocidad de disolución, orienta esta Memoria hacia la elaboración de compuestos de inclusión de este fármaco con el fin de mejorar sus características de biodisponibilidad, lo que podría dar paso a una disminución de la dosis necesaria para alcanzar el efecto terapéutico deseado.

Los objetivos que se pretenden conseguir con este trabajo se centran en dos grandes apartados. En primer lugar, la puesta a punto de una técnica útil para la elaboración de complejos de inclusión de gliclazida con diferentes CDs: α -, β -, HP- β - y β -CD parcialmente metilada (PMCD).

Una vez obtenidos los diferentes preparados, a continuación se procederá al estudio de la influencia de distintos factores sobre los perfiles de liberación:

- Tipo de CD empleado, estudiando tanto la influencia del tamaño de cavidad como los tipos de sustituyentes para los derivados de CDs.
- Técnica de elaboración.

En segundo lugar, se hace obligatoria la realización de una amplia caracterización físico-química de los sistemas elaborados por diferentes técnicas (estudio de solubilidades, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, SEM, DSC, TG, HSM, CP/MAS ^{13}C -RMN, XRD e IR).

Estudio de complejación de gliclazida con diferentes ciclodextrinas

Con este estudio, se pretende profundizar en el estudio de las interacciones existentes entre fármaco y CD, así como poner de manifiesto la posible presencia de compuestos de inclusión, con un estudio pormenorizado de la estructura de los mismos.

MATERIAL Y METODOS

2.1. MATERIAL

Los productos utilizados en la elaboración de nuestras formulaciones han sido:

- Fármaco: gliclazida
- Vehículos: α -, β -, HP- β - (grado de sustitución molar aproximado (MS) = 0.590) y PMCD (grado de sustitución aproximado (DS) = 2.07)

2.1.1. Principio activo

La gliclazida utilizada se presentó como polvo blanco fino microcristalino, procedente de Oril (Francia) y fue cedido por Laboratorios Servier S.A. (E-Madrid).

2.1.2. CDs

La primera dificultad que se presenta a la hora de abordar la elaboración de complejos de inclusión es la elección adecuada de la CD, ya que es prácticamente imposible, conociendo tan sólo la estructura de un fármaco, predecir su comportamiento. Por otra parte, debido a la gran variedad de CDs que existen actualmente en el mercado, únicamente la realización de ensayos experimentales permitirá determinar la CD más idónea para este principio activo. En nuestro caso concreto, la gliclazida posee dos radicales de tamaño relativamente pequeño, como son el toliil y el azabicclooctil, los cuales pueden ser fácilmente complejables con CDs de pequeño tamaño de cavidad. En consecuencia, decidimos probar las CDs naturales con los dos diámetros de cavidad interna más pequeños, correspondientes a la α - y la β -CD, así como desechar la γ -CD, por considerar que su diámetro de cavidad es excesivamente grande como para obtener una complejación efectiva. Por otra parte, dada la baja solubilidad acuosa de la β -CD natural, decidimos utilizar dos de sus derivados más solubles (HP- β - y PMCDs). Las sustancias empleadas provenían de:

- Ringdex (F-París) la α -CD y la PMCD
- Roquette (F-Lestrem) la β -CD
- Rhône-Poulenc (F-París) la HP- β -CD

2.2. METODOS

2.2.1. Valoración del principio activo

Basándonos en datos bibliográficos sobre compuestos relacionados [Clarke, 1974, p. 576] y tras la realización del espectro de absorción ultravioleta-visible, se escogió como longitud de onda más adecuada los 228 nm, por ser aquella en la que el fármaco ha mostrado su máxima absorción.

Posteriormente, se ha establecido la linealidad del método propuesto, tanto en agua como en medio gástrico artificial. Los parámetros de regresión de mayor interés de las rectas obtenidas, se recogen en las Tablas I y II, respectivamente. Paralelamente a esta determinación, se estableció la estabilidad del fármaco mediante espectrofotometría a la misma longitud de onda (228 nm), no existiendo variaciones significativas en los valores de absorbancia respecto al tiempo de soluciones de gliclazida en agua y en medio gástrico artificial sin enzimas. También se puso de manifiesto en dicha longitud de onda que las diferentes CDs no presentaban absorción, incluso a concentraciones muy superiores a las que aparecerían en la realización de nuestras experiencias.

Coef. determinación: 0.9982			Término independiente: -0.4104		
Coef. correlación: 0.9991			Error estándar: 0.1357		
Fuente	G.L.	Suma de Cuadrados	Varianza	F	Prob.
Regresión	1	82.3526	82.3526	4470.35	< 0.0001
Residuales	8	0.1474	0.0184		
Total	9	82.5000			
Coef. regresión		Coef. estándar	Error estándar	T	Prob.
23.5192		0.9991	0.3518	66.8607	< 0.0001

Tabla I. Principales parámetros estadísticos de la recta de calibrado de gliclazida en agua.

Coef. determinación: 0.9987			Término independiente: 0.0858		
Coef. correlación: 0.9993			Error estándar: 0.1168		
Fuente	G.L.	Suma de Cuadrados	Varianza	F	Prob.
Regresión	1	82.3908	82.3908	6037.63	< 0.0001
Residuales	8	0.1092	0.0136462		
Total	9	82.5000			
Coef. regresión		Coef. estándar	Error estándar	T	Prob.
10.3247		0.9993	0.1329	77.7022	< 0.0001

Tabla II. Principales parámetros estadísticos de la recta de calibrado de gliclazida en medio ácido.

2.2.2. Elaboración de los sistemas binarios

Se han empleado cinco métodos para efectuar la preparación de los compuestos de inclusión: dos de ellos en estado sólido (amasado o *kneading* y molienda o *co-grinding*) y tres en medio líquido (coprecipitación, neutralización y atomización o *spray-drying*). En todos los casos, se prepararon en una proporción molar 1:2 fármaco:CD, deducida tras la realización de los diferentes estudios del proceso de complejación en medio líquido.

2.2.2.1. Amasado (*kneading*)

Para la realización de dicha técnica, una vez pesadas las cantidades necesarias de fármaco y CD (balanza monoplato *Mettler AE 50*), procedemos a colocar la CD en un mortero, amasándola junto a una pequeña cantidad de agua destilada, con ayuda de un pistilo. Posteriormente, se adiciona poco a poco el fármaco, amasando la mezcla durante 45 min. Para mantener la consistencia de la mezcla, durante el proceso se adicionaron pequeñas cantidades de agua destilada. Por último, el producto obtenido se deseca en estufa (*Selecta 204*) a 37 °C durante 24 h.

2.2.2.2. Atomización (*spray-drying*)

En este caso, en primer lugar se preparan por una parte una solución alcohólica de gliclazida (400 mL) y por otra una solución acuosa de la CD (300 mL), mediante adición del disolvente y baño de ultrasonidos (*Selecta A09*) durante 5 min. Los pesos del fármaco y la CD, mantienen, como siempre, una proporción estequiométrica 1:2. Una vez obtenidas las disoluciones, éstas se mezclan y la solución resultante se somete a baño por ultrasonidos durante 20 min. Por último, se procede a eliminar el disolvente, atomizando la solución en un Mini Spray-Dryer (*Büchi 190M*), bajo las siguientes condiciones: temperatura de entrada: 152 °C; temperatura de salida: 85 °C; velocidad de flujo del aire: 400 NL·h⁻¹; velocidad de bombeo de la solución hidroalcohólica: 800 mL·h⁻¹.

2.2.2.3. Coprecipitación

La preparación del compuesto de inclusión se lleva a cabo mediante la adición a una solución 0.012 M de β -CD en agua (100 mL), bajo agitación magnética constante, de una cantidad de fármaco equivalente a una relación molar 1:2 fármaco-CD (0.1940 g). Se mantiene en agitación durante 7 días a temperatura ambiente. Es necesario señalar que dicho proceso se realizó en oscuridad, debido a que el fármaco es fotolábil. Por último, el precipitado obtenido se separa mediante filtración a vacío y posteriormente se seca a temperatura ambiente, con objeto de evitar la pérdida del agua de cristalización o estructural del mismo.

2.2.2.4. Neutralización

Esta técnica se basa en la preparación de una solución de gliclazida en una solución 0.012 M de β -CD, alcalinizada previamente con una pequeña cantidad de solución de hidróxido amónico (25 %) con objeto de solubilizar la gliclazida. Una vez disuelto el fármaco y obteniéndose una solución límpida, se procedió a neutralizar la misma con solución de ácido clorhídrico 1N bajo agitación magnética, hasta alcanzar el punto de equivalencia. La aparición de un precipitado blanco corresponde a la formación del compuesto de inclusión. La separación y secado de dicho precipitado sigue los mismos pasos que la técnica de coprecipitación.

2.2.2.5. Molienda (*co-grinding*)

Se pesan los componentes y se someten a mezclado durante 15 min. Al cabo de este tiempo, la mezcla física así obtenida se introduce en el molino oscilatorio (*Herzog HSM 100*). El volumen del mismo es de 300 cm³, utilizándose solamente una tercera parte de la capacidad del aparato. La molienda se efectuó en un intervalo de tiempo de 5 min.

Para todos estos métodos, el sólido obtenido se sometió a trituración y posterior tamizado (tamizadora eléctrica *Retsch vibro*) y tamices (*Cisa*) colocados en cascada, seleccionándose la fracción granulométrica comprendida entre 50 y 200 μ m.

2.2.2.6. Mezcla física

Con el fin de lograr unos productos que sirvieran de referencia a la hora de comparar los resultados obtenidos mediante las distintas técnicas de elaboración, se prepararon también las correspondientes mezclas físicas de los mismos. Estas se obtuvieron por simple homogeneización de los dos componentes previamente tamizados en idénticas condiciones que lo fueron los sistemas binarios y ternarios, estando sus pesos igualmente en proporción molar 1:2.

2.2.3. Estudios de complejación fármaco-CD

2.2.3.1. Estudios en estado líquido

2.2.3.1.1. Solubilidad

Esta técnica tiene como objetivo poner de manifiesto el efecto de la concentración del vehículo complejante (CD) en la solubilidad de nuestro fármaco, para lo cual se determina su solubilidad en función de cantidades crecientes de CD.

De este modo, sobre matraces erlenmeyers de 50 mL que contenían 10 mL de agua a temperatura ambiente y concentraciones variables de CD, se adicionó un exceso de fármaco correspondiente a unos 10 mg del mismo. Con el fin de evitar toda posible interacción en estado sólido de los componentes, la adición del principio activo se realizó tras la

solubilización total del vehículo.

Estos matraces así preparados se mantuvieron cerrados y en agitación (*Selecta Rotatorm*) durante 7 días en oscuridad hasta alcanzar el equilibrio total del sistema. A continuación, se procedió a su valoración espectrofotométrica (*Hitachi U-2000*) ajustando la longitud de onda a 228 nm, previa filtración de las muestras con objeto de eliminar la fase sólida presente. Esta se realizó mediante jeringa y filtros de nitrocelulosa (*Millipore®*) de 0.22 μm de diámetro de poro. Igualmente, se realizaron diluciones adecuadas de las soluciones obtenidas, con el fin de conseguir la concentración apropiada del fármaco para proceder a su valoración. Los ensayos se realizaron por triplicado. De acuerdo con el método propuesto por Higuchi y Connors [Higuchi y Connors, 1965], se procedió al cálculo de la constante de estabilidad aparente. Dicho cálculo se realizó a partir de los valores de pendiente de la porción ascendente y ordenada en el origen de los diagramas de solubilidad (S_o), mediante la siguiente expresión:

$$K_c = \frac{\text{pendiente}}{S_o (1 - \text{pendiente})}$$

Por último, se estimó el valor de eficacia solubilizante, que se define como el aumento de solubilidad relativo del fármaco observado a una determinada concentración de CD, a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Eficacia solubilizante} = \frac{S_{CD}}{S_o}$$

donde S_{CD} representa la solubilidad aparente del fármaco a una concentración dada de CD.

2.2.3.1.2. Resonancia Magnética Nuclear de Protones (^1H -RMN)

Para abordar el estudio de la posible interacción entre la gliclazida y las CDs se obtuvieron los espectros de ^1H -RMN mediante un equipo de RMN (*Bruker ACF-200*),

utilizando un campo magnético de 4.7 T a 200.13 MHz. En primer lugar, se registraron los espectros correspondientes a la gliclazida y a la β -CD, para luego proceder al registro del sistema binario gliclazida-CD. Con objeto de solubilizar la gliclazida, los estudios se realizaron en una solución 0.2 N de NaOD (*Merck*) en agua deuterada (*Merck*). Las concentraciones de las soluciones fueron de 5 mg/mL para la gliclazida, 35 mg/mL para la CD y 40 mg/mL para la mezcla física 1:2. Para la obtención de los espectros, la señal del agua fue presaturada previamente. Los desplazamientos químicos se han referido a la señal del trimetilsililpropanosulfonato, sal sódica (DSS) (*Merck*) como referencia externa a 0 partes por millón. El tiempo de adquisición fue de 3.49 μ s, siendo la duración del impulso de 2 μ s. El dominio temporal (TD) fue de 16 K, siendo procesados los espectros también con un tamaño de 16K. La ventana espectral (SW) fue de 2347 Hz.

En segundo lugar, se realizó un estudio del efecto nuclear *Overhauser* (nOe) tipo *steady-state* monodimensional, mediante saturación no selectiva del protón H₃ de la CD, con el objetivo de investigar la proximidad de protones de algún radical del fármaco que se encuentre dentro de la cavidad de la CD, como ya se mencionó en la sección de introducción. Todos los ensayos se realizaron a 310 °K (37 °C). Asimismo, todas las muestras fueron previamente degasificadas mediante burbujeo con nitrógeno, con objeto de eliminar el oxígeno disuelto en las mismas.

Por último, se llevó a cabo un estudio de la estequiometría en medio líquido mediante la técnica de los puntos de Job [Job, 1928]. Para ello, se empleó un equipo de RMN (*Bruker AC-200*), empleando condiciones análogas a las de los ensayos anteriores. Se realizaron los espectros de una serie de soluciones en las cuales la suma de las concentraciones de las dos especies se mantuvo constante ($[gliclazida] + [\beta\text{-CD}] = 15.46 \text{ mM}$), pero donde la fracción molar de cada componente ($r = [gliclazida] / ([gliclazida] + [\beta\text{-CD}])$ o $r = [\beta\text{-CD}] / ([gliclazida] + [\beta\text{-CD}])$) osciló entre 0 y 1. En estas condiciones, si un parámetro físico directamente relacionado con la concentración de complejo se representa en función de r , el valor máximo de dicho parámetro se registrará para el valor de $r = m / m + n$, siendo m y n las proporciones estequiométricas de fármaco y CD en el complejo, respectivamente. En nuestro caso, el parámetro empleado fue el valor de variación de desplazamiento químico observado ($\Delta\delta_{\text{obs}}$), siendo $\Delta\delta_{\text{obs}}$ la diferencia entre el δ de un protón del fármaco o de la β -CD en forma libre y forma complejada. Para que dicho parámetro sea válido, debe existir un rápido intercambio en el equilibrio entre la forma libre y complejada del fármaco

en solución, de forma que los picos correspondientes a la forma libre y complejada no puedan distinguirse individualmente, visualizándose una media de ambos; dicho requerimiento se cumple en nuestro caso.

2.2.3.1.3. Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 (^{13}C -RMN)

Las posibles interacciones moleculares que se producen entre el fármaco y las CDs han sido estudiadas mediante un aparato *Bruker ACF-200*, que operaba a un campo magnético de 4.7 T a 50.32 MHz. La adquisición de datos se realizó utilizando una ventana espectral de 12500 Hz. El tiempo de adquisición fue de 0.655 μs , siendo la duración del impulso de 3 μs . El resto de condiciones son análogas a las del apartado anterior.

2.2.3.1.4. Modelización Molecular

El estudio de la hipotética estructura del compuesto de inclusión formado se llevó a cabo mediante el programa de modelización molecular SYBYL [Moyano *et al.*, 1996a]. El procedimiento de ajuste se realizó a través del comando DOCK de SYBYL [SYBYL Theory Manual, p. 61] y campo de fuerza Tripos 5.2. Dicho procedimiento incluyó el cálculo de las energías de interacción, tanto de tipo electrostático como de Lennard-Jones, entre el ligando y el sustrato. Las coordenadas iniciales para la gliclazida fueron tomadas a partir de la estructura del compuesto de inclusión con el fenoprofeno [Hamilton y Chen, 1988]. La molécula de gliclazida se emplazó en el espacio existente entre las dos moléculas de β -CD, hallándose un mínimo en el valor de energía de interacción posicional mediante rotación y traslación de aquélla. Asimismo, se llevó a cabo un proceso de minimización, con objeto de obtener un mínimo de energía conformacional para el compuesto de inclusión.

2.2.3.2. Estudio estructural. Caracterización en estado sólido

2.2.3.2.1. Estudio morfológico

2.2.3.2.1.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se estudiaron las características morfológicas de los productos comerciales de partida y de los distintos sistemas utilizando un microscopio electrónico de barrido (*Philips XL-30*).

La tensión de voltaje (de 10 a 20 kV) y el *spot* (de 3 a 5) empleados fueron los adecuados a cada caso en particular para obtener la mejor calidad de imagen.

Para su correcta observación, las sustancias de partida se depositaron sobre una cinta adhesiva de doble cara, que se encontraba previamente fijada a un portaobjetos de aluminio. Una vez así preparadas, estas muestras se sometieron a metalización mediante baño de grafito u oro (*Edwards auto 306*) con el fin de hacerlas conductoras. En cuanto a los aumentos empleados para obtener las fotografías fueron alrededor de 1000x, suficientes para obtener una visión global de la forma y contorno de las partículas bajo estudio. Cuando fue necesario apreciar con mayor resolución los detalles de las superficies de las muestras analizadas se recurrió a la utilización de mayores aumentos.

2.2.3.2.2. Estudio térmico

2.2.3.2.2.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y termogravimetría (TGA)

Los estudios por DSC y el análisis termogravimétrico se llevaron a cabo mediante un aparato *Mettler TA 4000*, equipado con un horno *DSC 25* y una termobalanza *TG 50*. Las muestras fueron pesadas (*microbalanza Mettler M3*) en pocillos de aluminio abiertos (DSC, peso: 4-7 mg) o en pocillos de alúmina (TGA, peso: 11-12 mg). En el caso del DSC, las muestras se sometieron a un calentamiento previo desde 40 a 80 °C, seguido de una isoterma de 10 min a 80 °C, finalizando con un enfriamiento hasta 40 °C, con objeto de deshidratar las muestras para una mejor evaluación del pico de fusión del fármaco. Posteriormente, se realizó un barrido desde 40 a 250 °C. En todos los casos la velocidad de calentamiento fue de 10 °C·min⁻¹, en atmósfera de aire estática.

En el caso del estudio por TGA, las muestras bajo estudio se sometieron a un calentamiento desde 40 a 250 °C a una velocidad de 10 °C·min⁻¹, utilizando nitrógeno como gas de purga.

2.2.3.2.2.2. Microscopía de Platina Caliente (HSM)

La observación microscópica del proceso de fusión de las muestras se realizó mediante una platina caliente *Mettler FP 82HT*, acoplada a un microscopio *Olympus BH-2* (objetivo

10x) con un dispositivo de registro fotográfico. La regulación de la velocidad de calentamiento se realizó mediante una unidad de control *Mettler FP 80HT*.

La temperatura inicial de programación fue de 30 °C y la final, variable dependiendo del tipo de muestra. La velocidad de calentamiento general fue de 5 °C·min⁻¹ y de 1 °C·min⁻¹ en las zonas de mayor interés.

Una pequeña cantidad de la sustancia bajo estudio se situó entre un porta y cubreobjetos, introduciéndose ambos en la platina. Posteriormente, se sometió el sistema al ciclo de temperatura previamente establecido, donde el aporte calorífico se realizó de forma lenta y gradual, tomándose registros fotográficos de las imágenes más interesantes.

2.2.3.2.3. Estudio espectral

2.2.3.2.3.1. Difracción de Rayos X (XRD)

Los difractogramas correspondientes a las distintas muestras en polvo se obtuvieron mediante un equipo de XRD (*Siemens Kristalloflex D-500*) equipado con un contador de centelleo y unidad discriminadora. Se utilizó radiación Cu·K α filtrada por Ni, empleando 36 kV y 26 mA. La velocidad de barrido fue de 1 ° (2θ) min⁻¹, la velocidad de carta de 1 cm·min⁻¹ y la sensibilidad, la adecuada, generalmente 2·10⁴ cps. Las muestras orientadas al azar se exploraron entre 2 y 65 ° (2θ). Los difractogramas se realizaron por duplicado. Los espectros de difracción de los productos de partida han sido comparados con las muestras patrones recogidas en las fichas JCPDS.

En el caso de los sistemas gliclazida- β -CD, se realizó un segundo estudio más detallado, empleando para ello un equipo *Philips PW 1800*. Se utilizó en este caso radiación Cu K α filtrada por cristal de grafito, aplicando 50 KV y 30 mA. La velocidad de barrido fue de 1 ° (2θ)·min⁻¹, explorándose las muestras entre 2 y 50 ° (2θ).

2.2.3.2.3.2. Espectroscopía de Infrarrojos (IR)

Los espectros de IR de las sustancias de partida y de los sistemas binarios se obtuvieron mediante transformadas de Fourier de los espectros obtenidos para muestras preparadas en

forma de discos de KBr. Para ello se utilizó un instrumento de IR *Bomem MB-120*. El intervalo de longitud de onda empleado se mantuvo entre 600 y 4000 cm^{-1} , con 10 barridos por espectro y una resolución de espectro de 4 cm^{-1} .

2.2.3.2.3.3. Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 en estado sólido (CP/MAS ^{13}C RMN)

Los espectros de ^{13}C RMN en estado sólido de las muestras se obtuvieron mediante un aparato *Bruker CXP-300*, operando según la técnica de polarización cruzada y rotación en el ángulo mágico (CP/MAS). El campo magnético utilizado fue de 7.04 T, junto a una frecuencia de 75.47 MHz para el núcleo de carbono. El ángulo de impulso fue de 3.1 μs y el tiempo de contacto para las condiciones de *Hartmann-Hann* es de 1 ms. El tiempo de adquisición fue de 23 ms, el mismo valor que para el tiempo de desacoplamiento, siendo el dominio temporal (TD) de 1K. Los espectros fueron procesados con un tamaño de 8K. La ventana espectral (SW) empleada fue de 22000 Hz (300 ppm). Los desplazamientos están referidos al tetrametilsilano (TMS) como estándar.

Respecto a la muestra de gliclazida, se realizaron dos espectros en las mismas condiciones, pero con diversa velocidad de rotación, con objeto de asignar los picos debidos a la rotación (*sidebands*), identificados sobre el espectro registrado a 3.9 KHz de velocidad de rotación. Todos los espectros restantes se registraron a 4.5 KHz. El número de barridos fue variable, debido a las diferentes respuestas de las muestras.

2.2.4. Velocidad de disolución

De los métodos propuestos por las distintas Farmacopeas para realizar este ensayo, se ha utilizado el del cestillo rotatorio, recogido en USP 23 [USP 23, 1995, pp. 1791-1792]. Para realizar el ensayo de liberación *in vitro*, se utilizó un aparato de disolución (*Turu Grau D-6*) que cumplía las especificaciones recogidas en USP 23 [USP 23, 1995, pp. 1791-1792]. La velocidad de rotación se reguló a 50 rpm, utilizando cápsulas del número cero.

Para estos ensayos, se preparó medio gástrico artificial sin enzimas [USP 23, 1995, p. 2053], siendo el volumen de medio empleado de 1000 mL. El ensayo se realizó a una temperatura de 37 ± 0.5 °C, tomándose muestras de 3 mL a intervalos de tiempo

previamente establecidos (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 60 min), con el fin de poder efectuar la determinación cuantitativa del fármaco liberado en función del tiempo. Para ello, se siguió la técnica espectrofotométrica puesta a punto en nuestro laboratorio. Los ensayos se efectuaron por triplicado.

Una vez representados los perfiles de liberación del fármaco, se prosiguió con el análisis de los mismos, con objeto de completar el estudio que tratamos de llevar a cabo sobre la mejora conseguida en la disolución para nuestras formulaciones respecto a las mezclas físicas y fármaco puro. Para ello, se procedió a la determinación de una serie de parámetros que nos ayudarían en nuestro cometido, y que proveerían de suficiente información acerca del proceso de disolución. Estos fueron la eficacia de disolución en los primeros 60 min (DE_{60}) y porcentaje de fármaco disuelto en los primeros 60 min (DP_{60}).

2.2.5. Tratamiento estadístico

Una vez obtenidos los datos experimentales correspondientes a los diferentes ensayos realizados, éstos son sometidos a las pertinentes pruebas estadísticas. Para ello, se han utilizado programas comerciales (*Abstat. Anderson-Bell Co., 1985* y *SYSTAT for Windows 3.1* para ordenadores personales).

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. CARACTERIZACION DE LAS MATERIAS PRIMAS

3.1.1. Estudio morfológico

3.1.1.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La gliclazida de partida se presenta mediante SEM como un polvo micronizado, apareciendo en forma de pequeños cristales de forma irregular (10-50 μm) (Figura 5).

El producto obtenido tras el tratamiento por amasado presenta cristales de morfología similar al compuesto comercial. En el caso de la gliclazida sometida a molienda (Figura 6), se observan partículas de muy heterogéneo tamaño, sin morfología definida, formadas por agregados de partículas más pequeñas.

Para el sistema obtenido mediante atomización (Figura 7), se observa una importante reducción del tamaño de partícula, estando constituida la muestra por cristales de tamaño sensiblemente inferior al fármaco de partida. Resulta interesante destacar que en esta ocasión las partículas no adquieren forma esférica, como es habitual cuando se emplea esta técnica de procesado.

Hay que tener en cuenta que esta modificación en el tamaño de partícula de nuestro principio activo, en los casos de la molienda y el atomizado, se puede traducir en un importante aumento en el área superficial, lo que al menos, *a priori*, puede suponer modificaciones trascendentales en algunas de sus propiedades, en especial la velocidad de disolución. Estas modificaciones se discutirán en un apartado posterior de la presente Memoria.

El estudio de las CDs bajo SEM se ha efectuado en función de sus semejanzas y diferencias morfológicas, las cuales se describen a continuación. Las CDs naturales aparecen como partículas cristalinas de forma prismática. Junto a estos cristales coexisten otros de menor tamaño, algunos de ellos adheridos a la superficie de los mayores. A modo representativo, en la Figura 8 se recoge el aspecto de la β -CD comercial.



Figura 5. Microfotografía por SEM correspondiente a la gliclazida comercial.

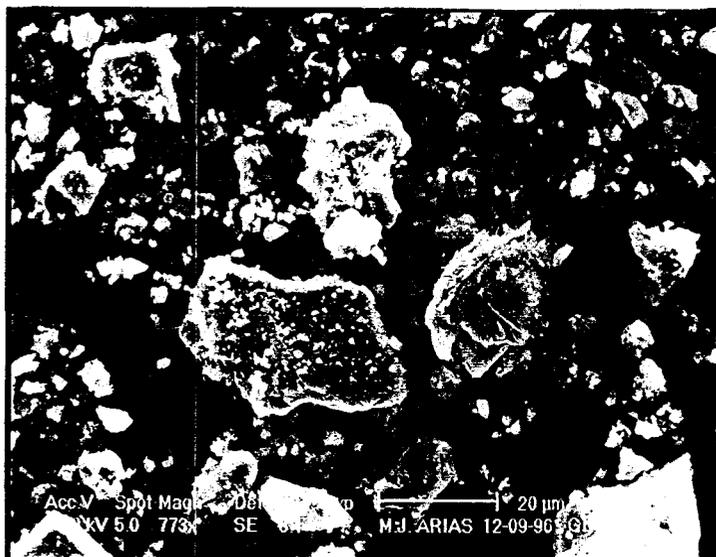


Figura 6. Microfotografía por SEM correspondiente a la gliclazida molida.

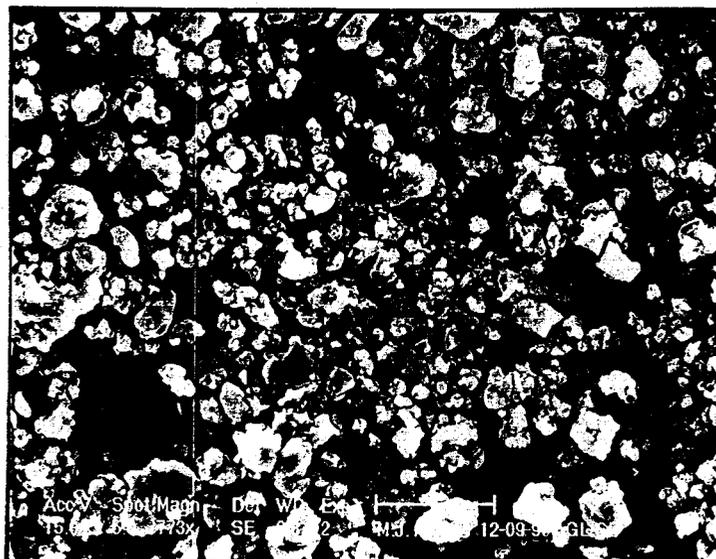


Figura 7. Microfotografía por SEM correspondiente a la gliclazida atomizada.

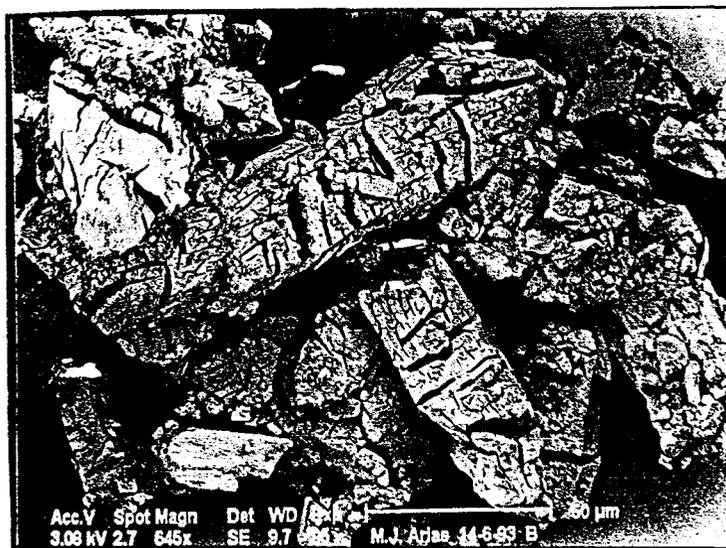


Figura 8. Microfotografía por SEM correspondiente a la β-CD comercial.

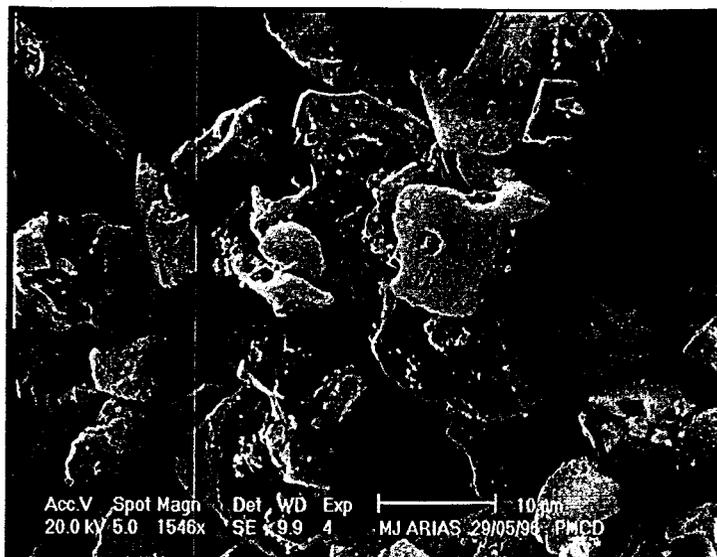


Figura 10. Microfotografía por SEM correspondiente a la PMCD comercial.

Respecto a los productos obtenidos por amasado, hemos de señalar que no sufren cambios morfológicos de importancia con las CDs de origen, excepto en el caso de la HP- β -CD, donde se observa una modificación significativa en su aspecto, consistente en la ruptura de las formas esféricas y fusiformes, apareciendo estructuras laminares de dimensiones relativamente grandes, junto con partículas amorfas de pequeño tamaño (Figura 11).

Las CDs tratadas por molienda se caracterizan en general por la presencia de partículas con los bordes erosionados, debido al efecto triturador del molino coloidal. Este hecho se revela claramente en la fotografía correspondiente a la β -CD tratada por molienda (Figura 12).

En cuanto a los derivados atomizados de las CDs, debemos señalar que la aplicación de esta técnica a las mismas conduce, en todos los casos e independientemente del tipo de CD, a partículas de morfología muy similar. Estas se presentan en formas esféricas amorfas de tamaño muy pequeño (diámetro comprendido entre 1 y 5 μm). En el caso de la PMCD (Figura 13) se observa que las partículas esféricas huecas han sufrido un efecto de "deshinchamiento", que podemos atribuir al calor generado por el haz de electrones del microscopio al incidir sobre las muestras, dado que esta CD es la que presenta menor punto de fusión, tal y como se verá en la sección de caracterización térmica.

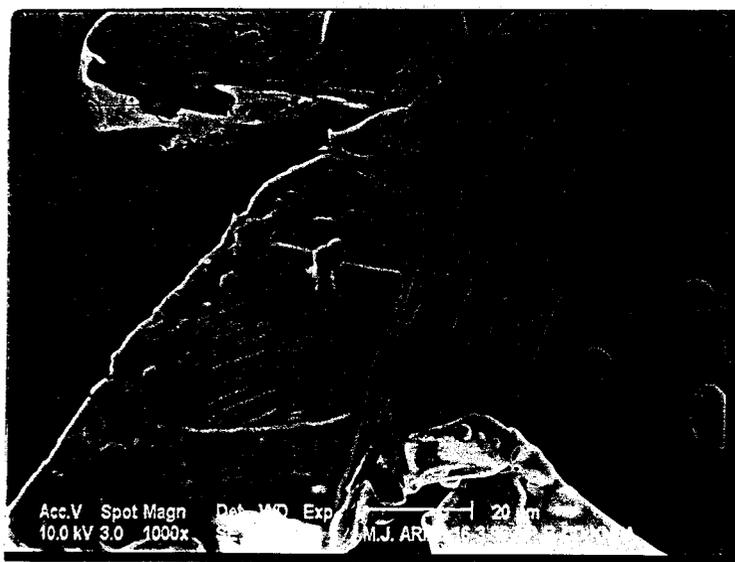


Figura 11. Microfotografía por SEM correspondiente a la HP- β -CD amasada.

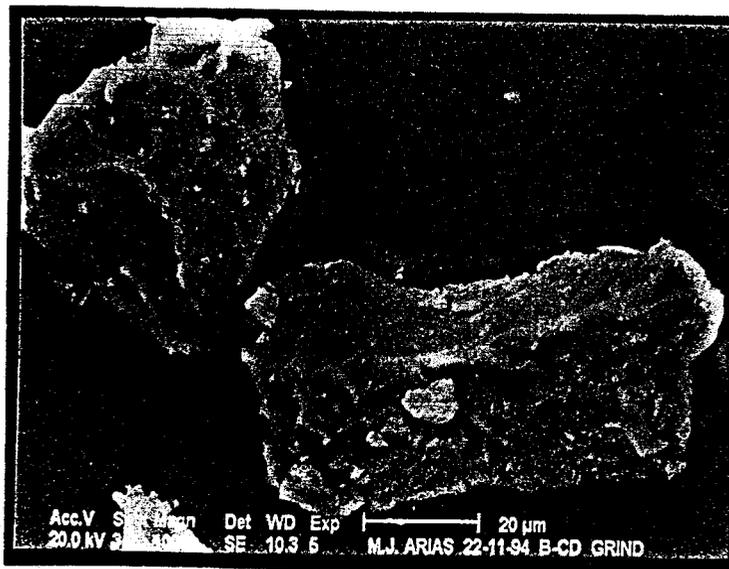


Figura 12. Microfotografía por SEM correspondiente a la β -CD molida.

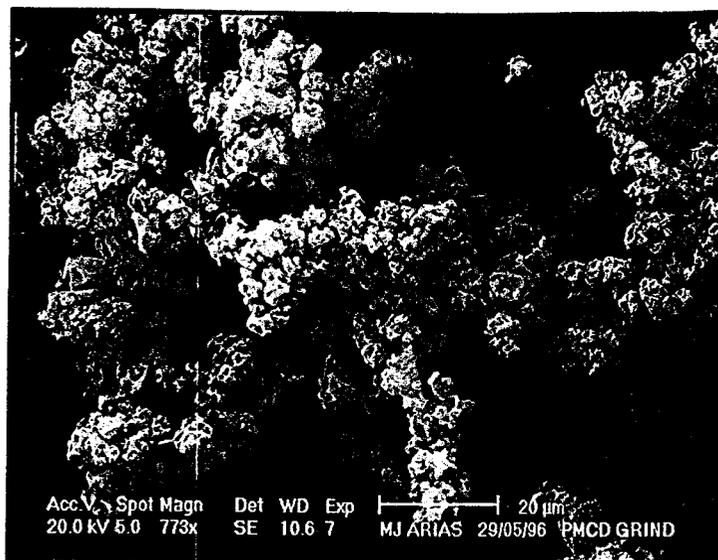


Figura 13. Microfotografía por SEM correspondiente a la PMCD atomizada.

3.1.2. Estudio térmico

3.1.2.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los termogramas por DSC correspondientes a la gliclazida comercial y tras ser sometida a calentamiento previo se recogen en la Figura 14. De igual forma y a título de ejemplo, en la Figura 15 se muestran los termogramas del fármaco tras ser sometido a los tratamientos de molienda y atomización. Dichos termogramas ponen en evidencia la estabilidad del fármaco frente a las diversas técnicas de procesado utilizadas, a la vez que suministran información sobre el punto y entalpía de fusión del fármaco (ΔH_f). Asimismo, procedimos a la evaluación de la cristalinidad en las muestras a partir de los valores de ΔH_f . El porcentaje de fármaco amorfo se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$\% \text{ Amorfo} = 100 - \frac{\Delta H_f \text{ muestra}}{\Delta H_f \text{ comercial}} \cdot 100$$

Dichos datos se encuentran recogidos en la Tabla III. Debemos señalar que, en ningún caso, el calentamiento previo de las muestras ejerce influencia alguna sobre los parámetros térmicos determinados mediante la técnica de DSC.

	Técnica de Procesado	PF (°C)	ΔH_f (J/g)	% Amorfo
Gliclazida	Comercial	169.4	121.0	-
	Amasado	168.8	116.3	4.1
	Molienda	166.8	107.6	11.4
	Atomización	165.9	107.0	11.6

Tabla III. Evaluación térmica de la gliclazida sometida a las diferentes técnicas de procesado bajo estudio (PF: punto de fusión; ΔH_f : entalpía de fusión).

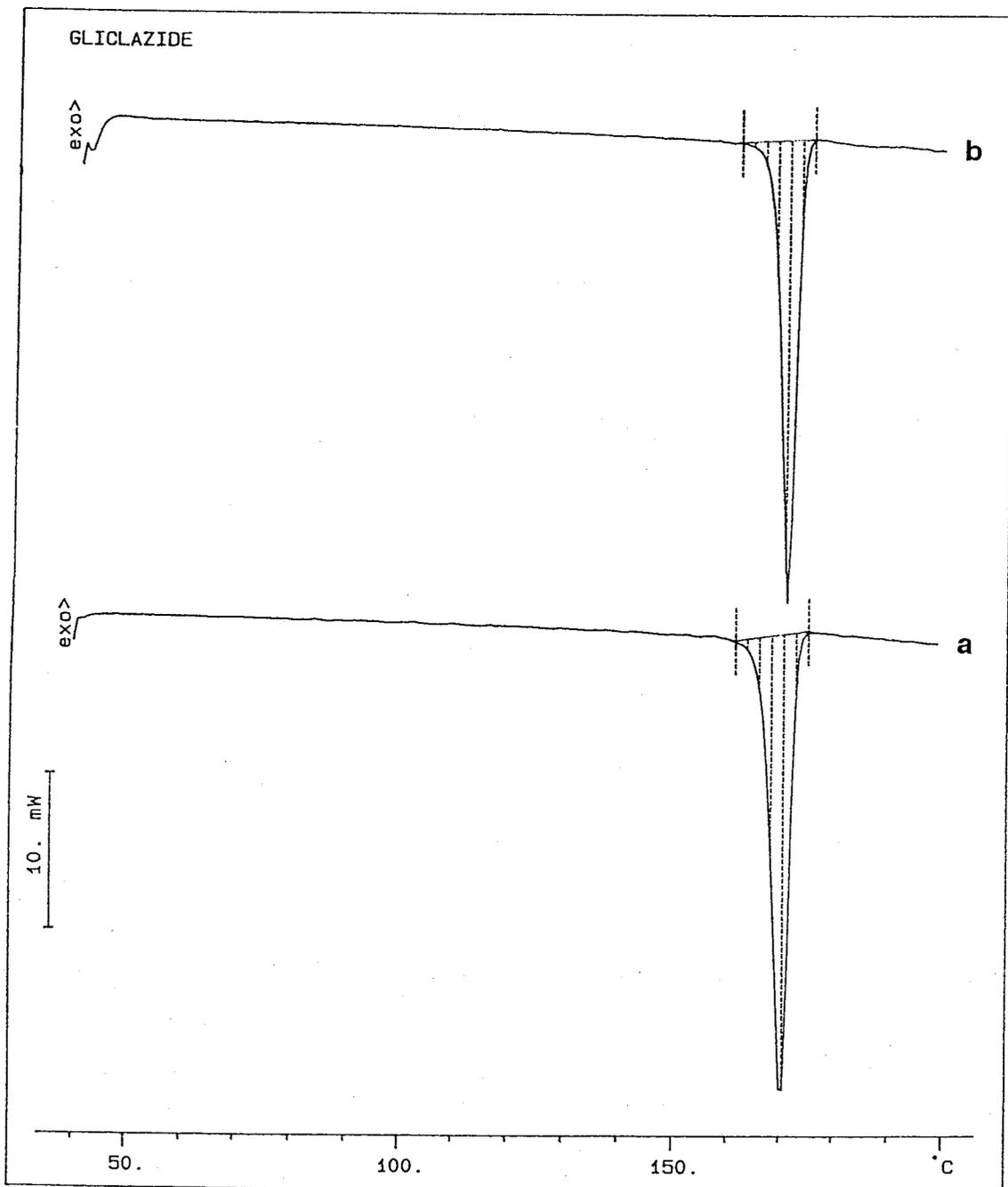


Figura 14. Termogramas por DSC correspondientes a la gliclazida comercial: (a) sin precalentamiento, (b) con precalentamiento.

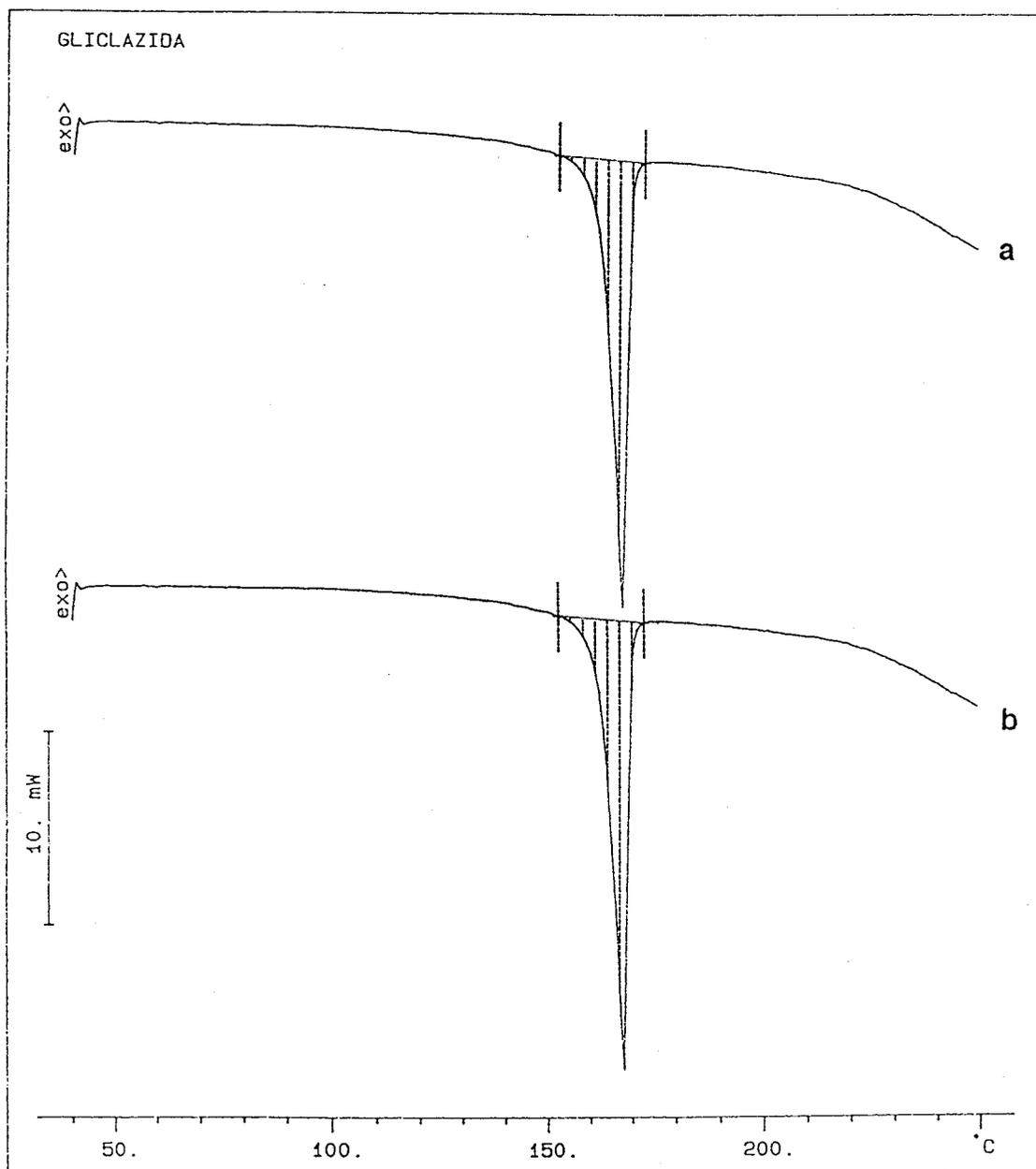


Figura 15. Termogramas por DSC correspondientes a la gliclazida: (a) molida, (b) atomizada.

Los resultados ponen de manifiesto una leve disminución en el punto de fusión del fármaco, sobre todo al ser sometido a las técnicas de atomización y molienda. Más significativa es la disminución en el valor de ΔH_f , situación que podemos interpretar como una posible amorfización parcial del fármaco, siendo ésta más patente cuanto más drástico es el método de procesado. Así, la molienda y atomización son las técnicas que conducen a un mayor descenso en la cristalinidad del fármaco (alrededor del 11 %). Esta hipótesis se verá confirmada al aplicar otras técnicas de caracterización, como por ejemplo la difracción de rayos X.

Los termogramas por DSC de las diferentes CDs comerciales se recogen en las Figuras 16 a 19. Los resultados indican que, mientras la α -CD la comercial (Figura 16) muestra tres efectos endotérmicos bien definidos a 62, 89 y 105 °C, respectivamente, en el termograma de la α -CD sometida a un proceso de calentamiento previo, únicamente se registran los efectos endotérmicos de mayor temperatura. Estos resultados indican que sólo las moléculas de agua muy fuertemente ligadas a la CD son capaces de resistir el proceso de precalentamiento aplicado. Algunos autores han evaluado estos efectos endotérmicos, determinando que se corresponden con la pérdida de 2.3, 1.6 y 2.8 moles de agua, respectivamente [Kohata *et al.*, 1993]. También resulta evidente un leve desplazamiento en las temperaturas de pico de dichos efectos endotérmicos, situación que podemos atribuir al efecto que el proceso de calentamiento previo pudiera ejercer sobre las fuerzas que ligan las moléculas de agua a la cavidad de la CD. Una disminución en estas fuerzas sería la causa de la liberación de las moléculas de agua con un menor aporte energético y, por tanto, a una menor temperatura.

Respecto a la β -CD (Figura 17), se observa la presencia de un ancho efecto endotérmico entre 60 y 100 °C, el cual es debido a la deshidratación de la misma. Aunque se aprecia un primer hombro muy ligero en la endoterma de deshidratación de la CD hacia los 70 °C, este proceso se produce en una única etapa, según han constatado diversos autores. Este hombro se corresponde con la liberación del agua adsorbida sobre la β -CD (aproximadamente 4 moléculas de H₂O), mientras que el segundo pico endotérmico se debe a la liberación de las moléculas de agua más fuertemente ligadas a la CD, es decir, aquéllas contenidas en su cavidad. Por otra parte, en el caso de la muestra sometida a calentamiento previo, dicha endoterma de deshidratación desaparece completamente.

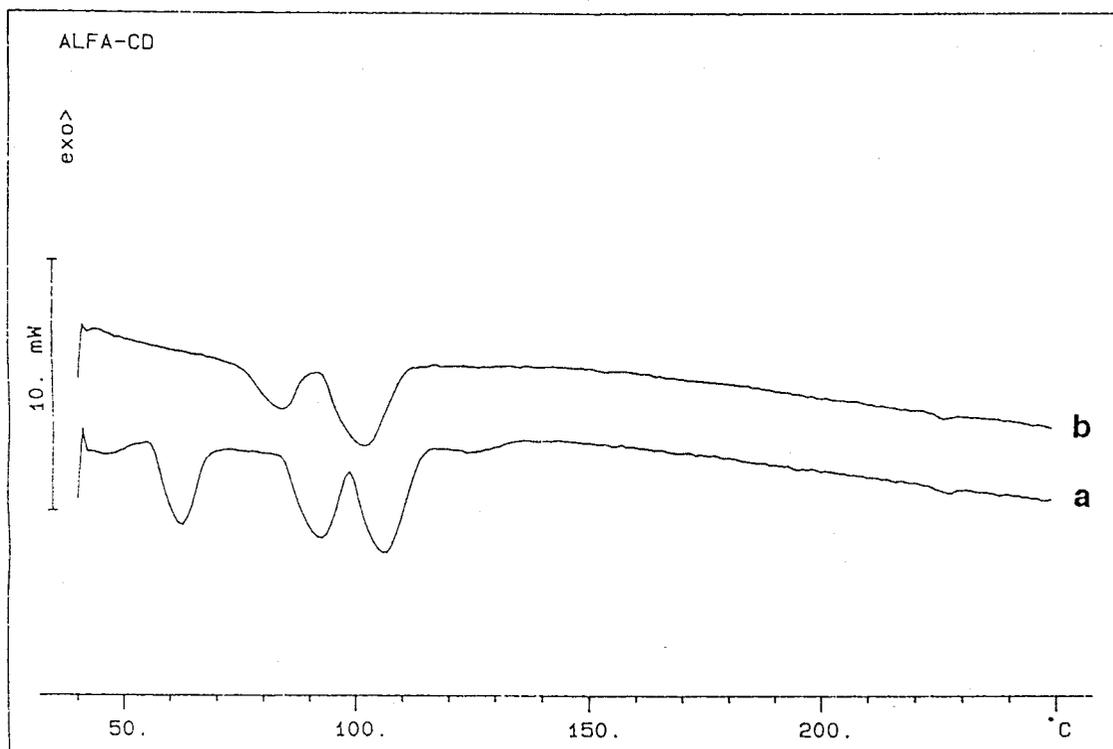


Figura 16. Termogramas por DSC correspondientes a la α -CD: (a) comercial sin precalentamiento, (b) comercial con calentamiento.

Kohata y cols. [Kohata *et al.*, 1993] demostraron en sus experiencias que las moléculas de agua adsorbidas en la CD escapan por debajo de los 64 °C, mientras las contenidas en la cavidad lo hacen entre 64 y 100 °C, confirmando así que las primeras interactúan con menos fuerza con el anillo de la CD. Además, verificaron que el proceso de deshidratación de la β -CD es total por encima de los 100 °C. Estas observaciones coinciden igualmente con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, aunque a temperatura ligeramente superior que en el caso del hombro, siendo el proceso de precalentamiento suficiente tanto para eliminar el agua adsorbida como la incluida en el interior de la cavidad.

Por otra parte, se observa un segundo efecto endotérmico a 220 °C, correspondiente a la transición sólido-sólido de la CD comercial, de naturaleza irreversible [Novak *et al.*, 1994; Bettinetti *et al.*, 1994]. Dicho efecto endotérmico permanece en la muestra sometida a precalentamiento, lo cual es un hecho lógico si tenemos en cuenta que dicha transición se produce sin pérdida de peso [Kohata *et al.*, 1993], siendo un proceso asignado a la presencia de "microcracks" en la estructura cristalina de la β -CD, no estando relacionado en ningún caso a la presencia de moléculas de agua en la CD [Bettinetti *et al.*, 1994].

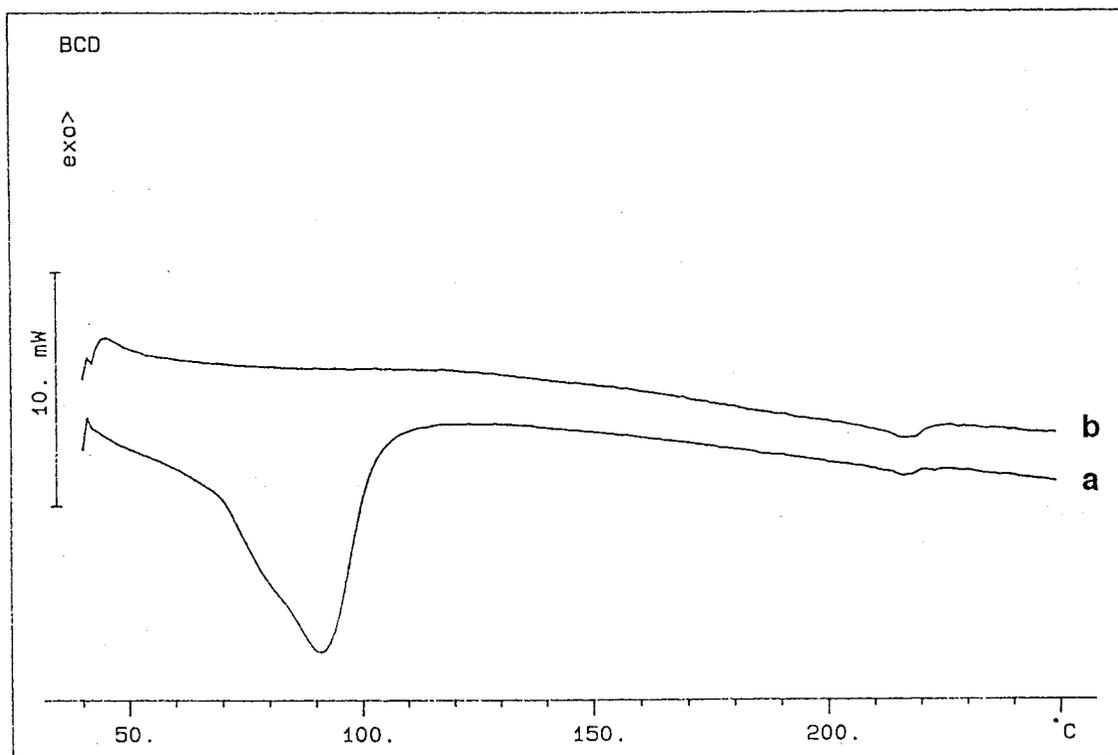


Figura 17. Termogramas por DSC correspondientes a la β -CD: (a) comercial sin precalentamiento, (b) comercial con calentamiento.

En el caso de la HP- β -CD comercial (Figura 18), el estudio por DSC muestra la presencia de un ancho efecto endotérmico entre los 40 y 80 °C, correspondiente a la deshidratación de la misma, proceso que se produce también en una única etapa. En el termograma de la muestra sometida a precalentamiento dicho efecto ha desaparecido completamente, por lo que podemos concluir que las fuerzas de unión de las moléculas de

agua a la cavidad de esta CD son de naturaleza relativamente débil, ya que el tratamiento de precalentamiento aplicado resulta suficiente para producir su completa deshidratación.

En el caso de la PMCD (Figura 19), se observa que el precalentamiento no produce alteraciones de ningún tipo en el comportamiento térmico de la CD, dado que ésta no muestra ninguna endoterma correspondiente a fenómenos de deshidratación. Estos resultados son totalmente lógicos, si tenemos en cuenta el bajo grado de hidratación que presenta esta CD, según el informe analítico de la empresa suministradora. Por otra parte, se detectó un ancho fenómeno endotérmico situado en el intervalo aproximado de 150-200 °C, el cual puede ser debido a la fusión de la CD. Dicho punto se tratará ampliamente en la sección de Termomicroscopía.

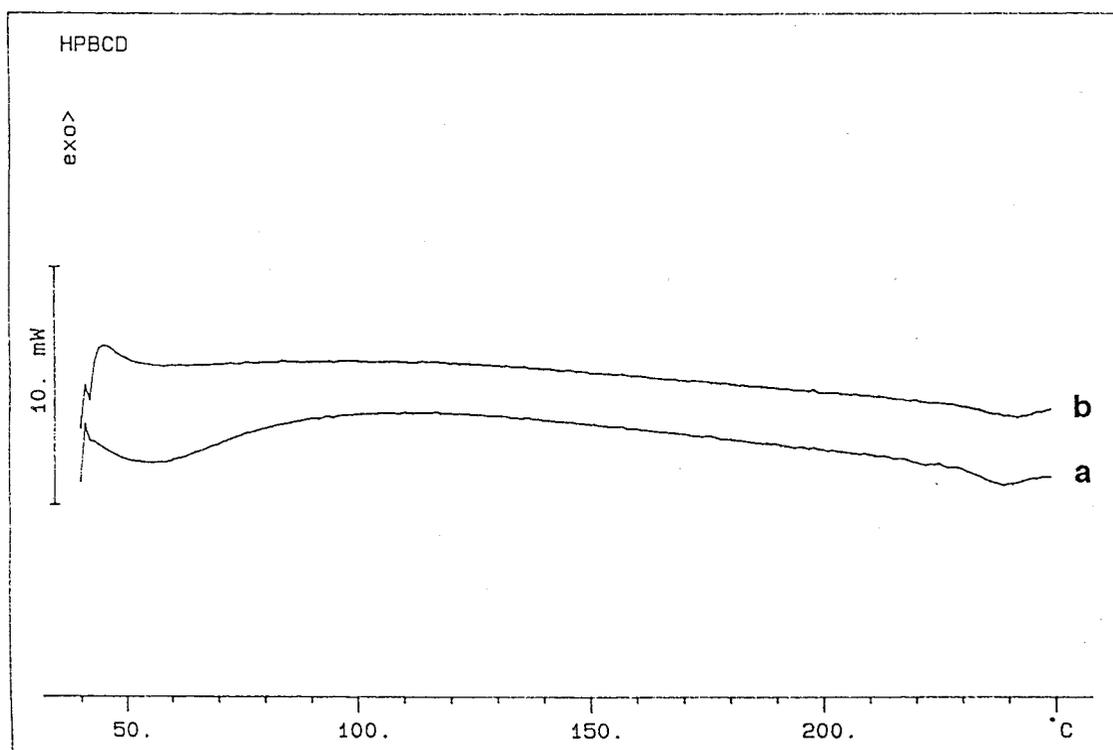


Figura 18. Termogramas por DSC correspondientes a la HP- β -CD: (a) comercial sin precalentamiento, (b) comercial con calentamiento.

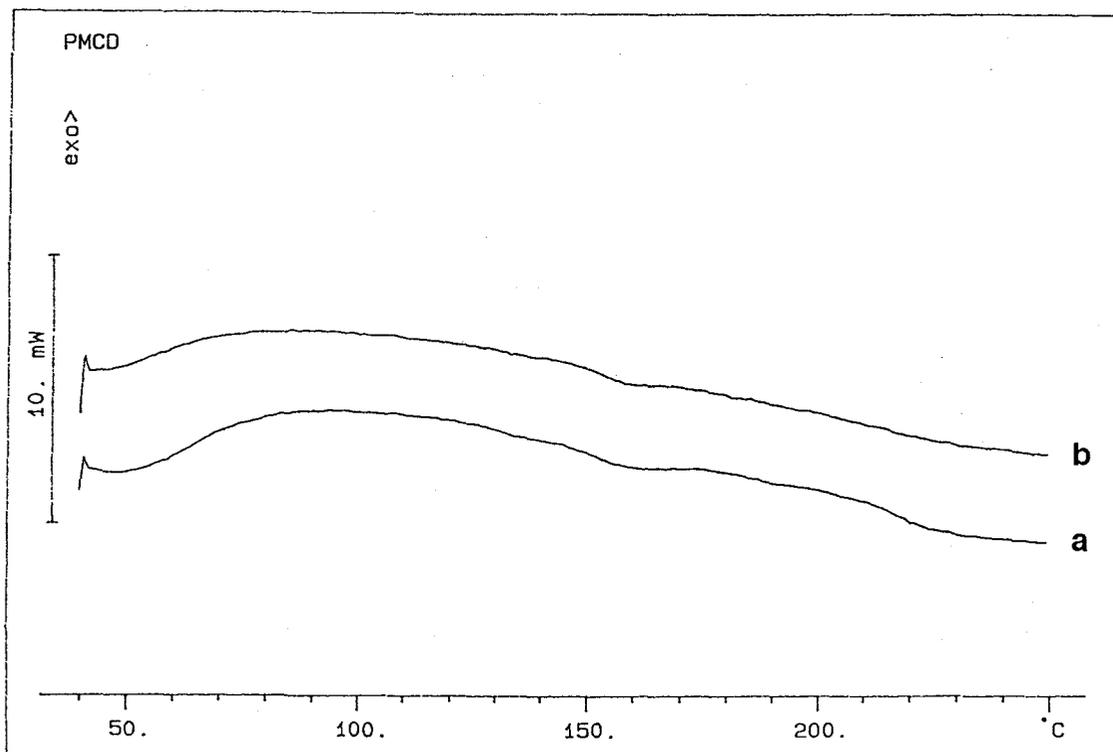


Figura 19. Termogramas por DSC correspondientes a la PMCD: (a) comercial sin precalentamiento, (b) comercial con calentamiento.

3.1.2.2. Termogravimetría (TG)

Con el fin de complementar los estudios de caracterización de nuestro fármaco procedimos a realizar su estudio mediante técnicas termogravimétricas. En la Figura 20 se recoge el termograma por TG correspondiente a la gliclazida. Dicho termograma reveló una leve pérdida de peso (1.35 %) hasta la fusión de la misma, hecho que podemos relacionar con la pérdida del agua de hidratación del producto. Tras la fusión del fármaco, se produce una notable pérdida de peso, debida a la volatilización de productos durante su descomposición. Los resultados ponen de manifiesto la estabilidad del fármaco en las condiciones en que realizamos el proceso de precalentamiento.

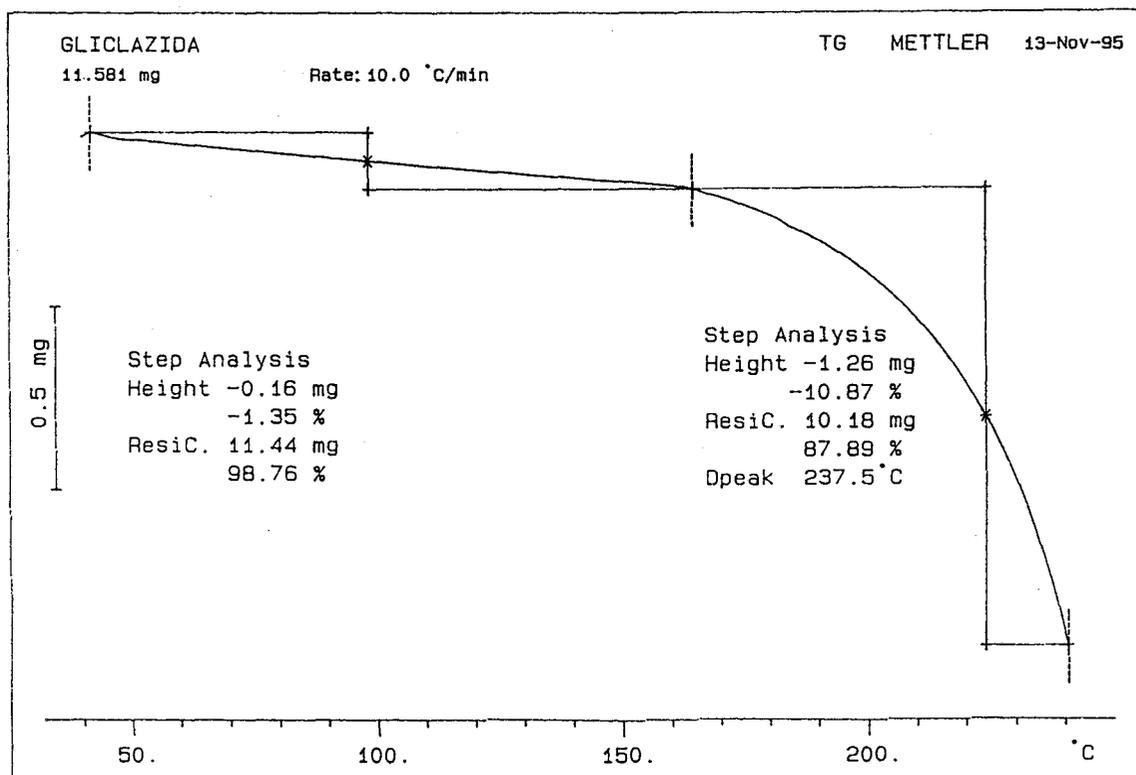


Figura 20. Termograma por TG correspondiente a la gliclazida.

3.1.2.3. Termomicroscopía (HSM)

Las diferentes materias primas fueron sometidas a un estudio termomicroscópico hasta una temperatura máxima de 360 °C, con el fin de establecer su comportamiento y evidenciar su estabilidad térmica. Se ha considerado como temperatura de inicio de fusión aquella en la cual se observó la aparición de la primera gota de líquido en la muestra.

Puesto que el aspecto morfológico de las materias primas fue tratado en los estudios por SEM, en este apartado nos centraremos fundamentalmente en las modificaciones que experimentan estos productos en el curso de su calentamiento, intentándolos correlacionar con los resultados obtenidos por DSC.

La gliclazida se presenta al microscopio óptico como partículas heterogéneas en cuanto a su forma y tamaño. (Figura 21). A los 165 °C, se registran simultáneamente dos procesos. Por una parte, un fenómeno muy patente visualmente, consistente en una deformación progresiva de las partículas del fármaco (Figura 22), que conduce posteriormente a su fusión total a los 175 °C, obteniéndose unas vesículas de líquido (Figura 23). Por otra parte, se produce conjuntamente un fenómeno de volatilización del fluido obtenido, lo que se traduce en un oscurecimiento gradual del campo de visión, debido a que dichos productos resultan condensados en un portaobjetos que se encuentra colocado en la parte superior de la platina y que separa la muestra en estudio del objetivo del microscopio. Si retiramos dicho portaobjetos, observamos el campo visual perfectamente nítido (Figura 24).

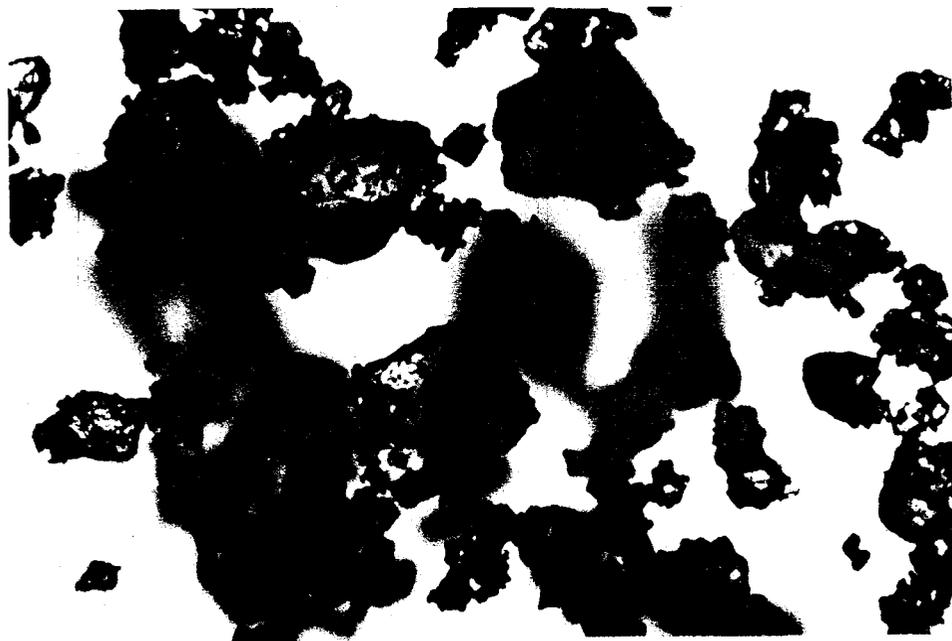


Figura 21. Fotografía mediante HSM correspondiente a la gliclazida (temperatura ambiente).

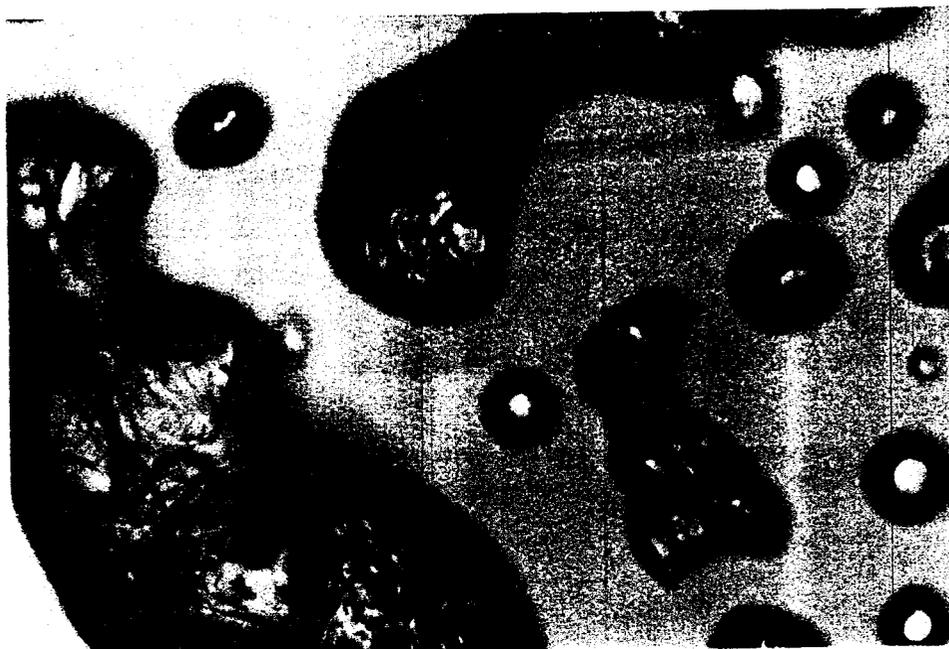


Figura 22. Fotografía mediante HSM correspondiente a la gliclazida (165 °C).

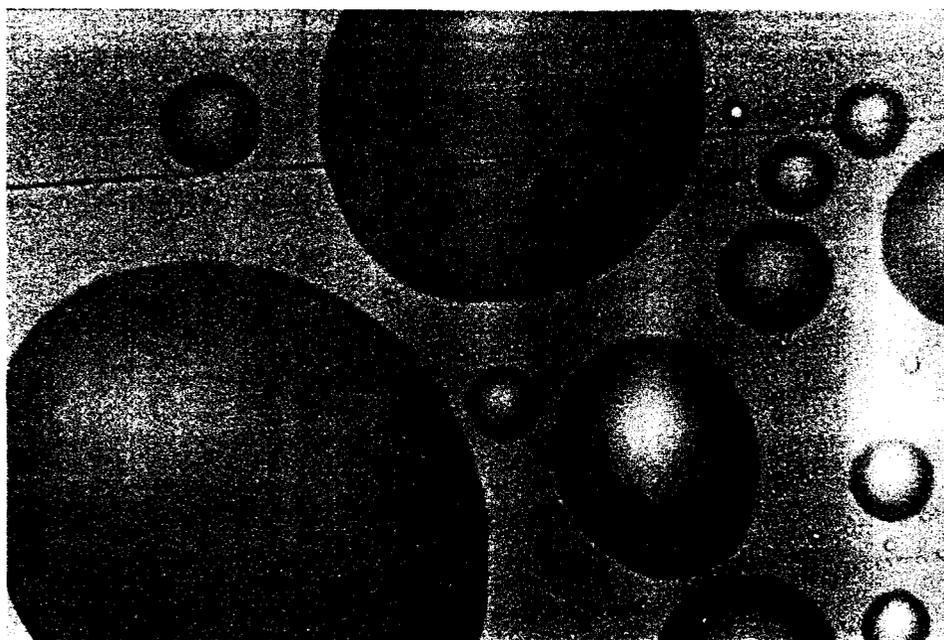


Figura 23. Fotografía mediante HSM correspondiente a la gliclazida (175 °C).

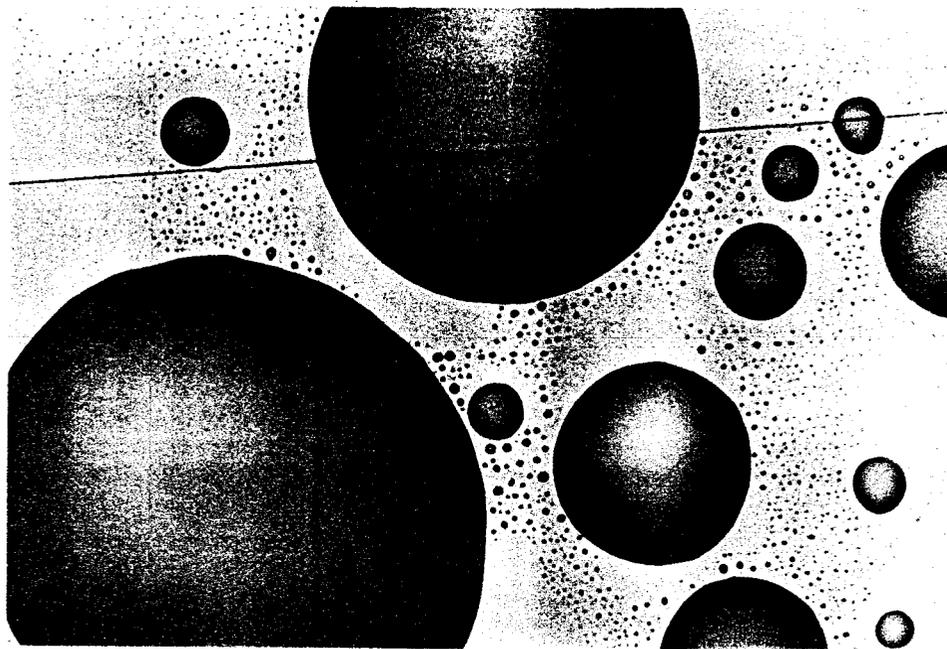


Figura 24. Fotografía mediante HSM correspondiente a la gliclazida (175 °C, sin portaobjetos).

Un examen detallado con luz polarizada del producto recogido en el portaobjetos, mostró que presentaba una estructura cristalina (Figura 25). Por último, el posterior calentamiento de la muestra conduce a un oscurecimiento gradual de las vesículas, situación que podemos asignar a la descomposición del fármaco.

Para las CDs empleadas en nuestro trabajo, la utilización de un sistema de luz polarizada confirmó la naturaleza cristalina de las CDs naturales α - y β -CDs, mientras que puso de manifiesto el carácter amorfo del derivado hidroxilado HP- β -CD y de la PMCD.

Los estudios mediante HSM de la β -CD mostraron que las partículas de esta CD sufrían un proceso de expansión con ruptura de su estructura cristalina al ser calentada a 220 °C, lo que confirma que el pequeño efecto endotérmico registrado en los termogramas por DSC a esta temperatura se corresponde con una transición sólido-sólido, como ya habían señalado diversos autores [Bettinetti *et al.*, 1994].

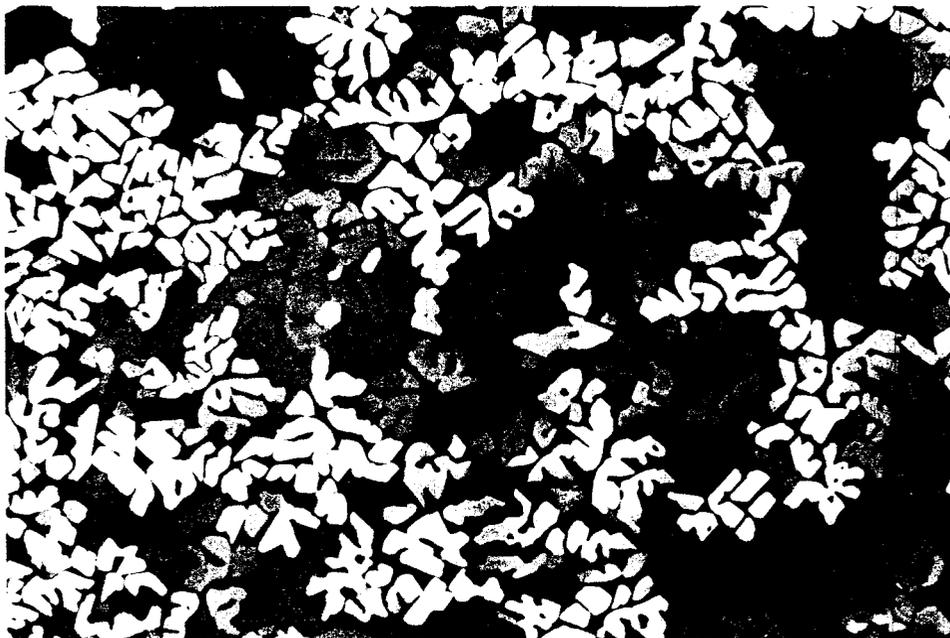


Figura 25. Fotografía mediante HSM correspondiente a la gliclazida evaporada y solidificada en el portaobjetos a la luz polarizada (175 °C).

Por otra parte, los estudios térmicos de las diferentes CDs mostraron que todas las CDs experimentaban un proceso de fusión con descomposición alrededor de 290 °C, con excepción de la PMCD cuyo proceso de fusión comienza alrededor de los 160 °C (Figuras 26 a 29). Por tanto, la utilización de esta técnica de caracterización permite poner en evidencia este fenómeno, que sólo se registra muy débilmente en el correspondiente termograma por DSC de dicha CD, dado su carácter prácticamente amorfo. Por otra parte, dada la similitud entre las temperaturas de fusión de esta CD y del fármaco, podemos esperar una posible interferencia a la hora de estudiar los sistemas binarios gliclazida-PMCD, situación que no se produce con el resto de las CDs.

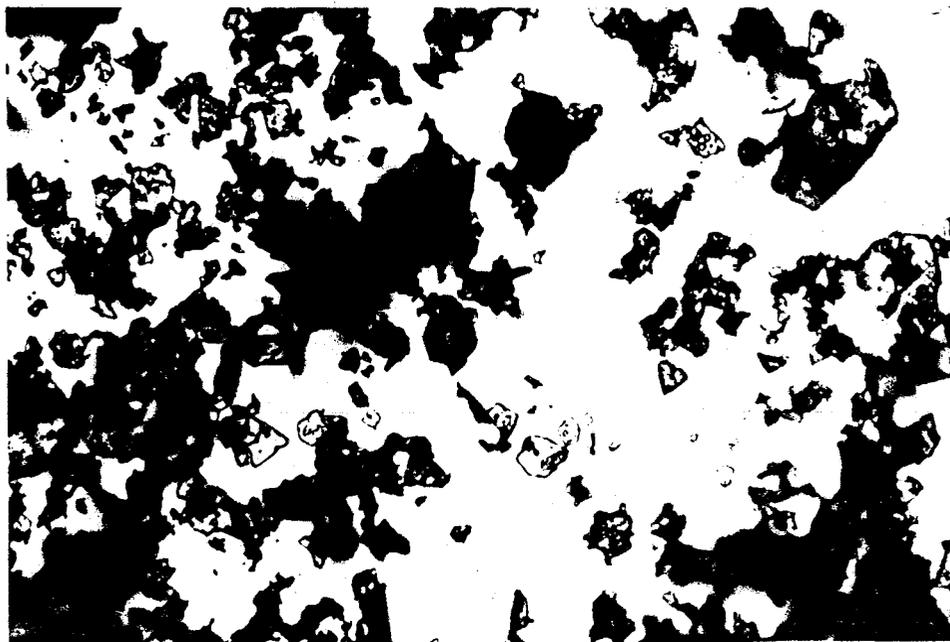


Figura 26. Fotografía mediante HSM correspondiente a la PMCD (temperatura ambiente).

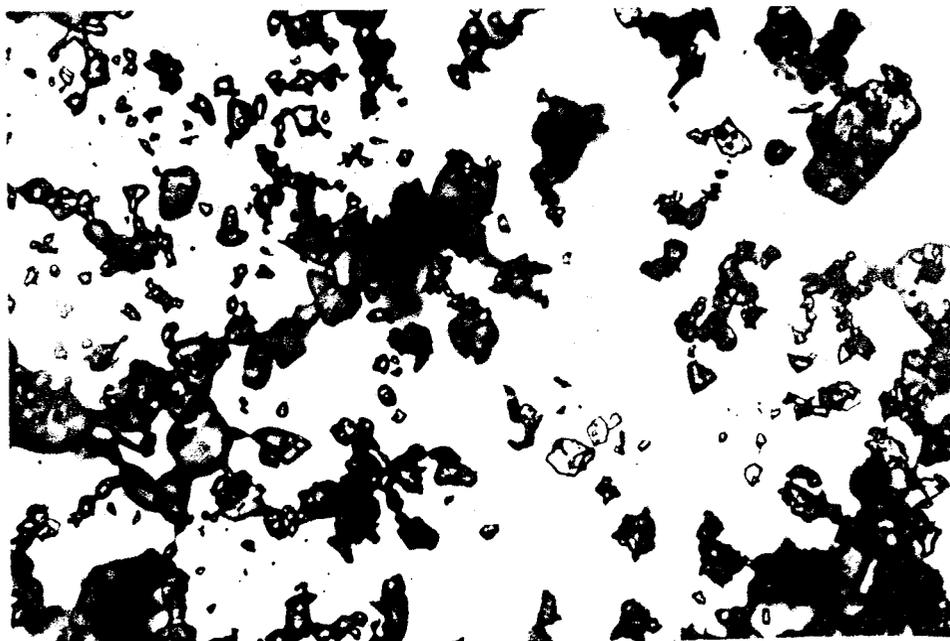


Figura 27. Fotografía mediante HSM correspondiente a la PMCD (155 °C).

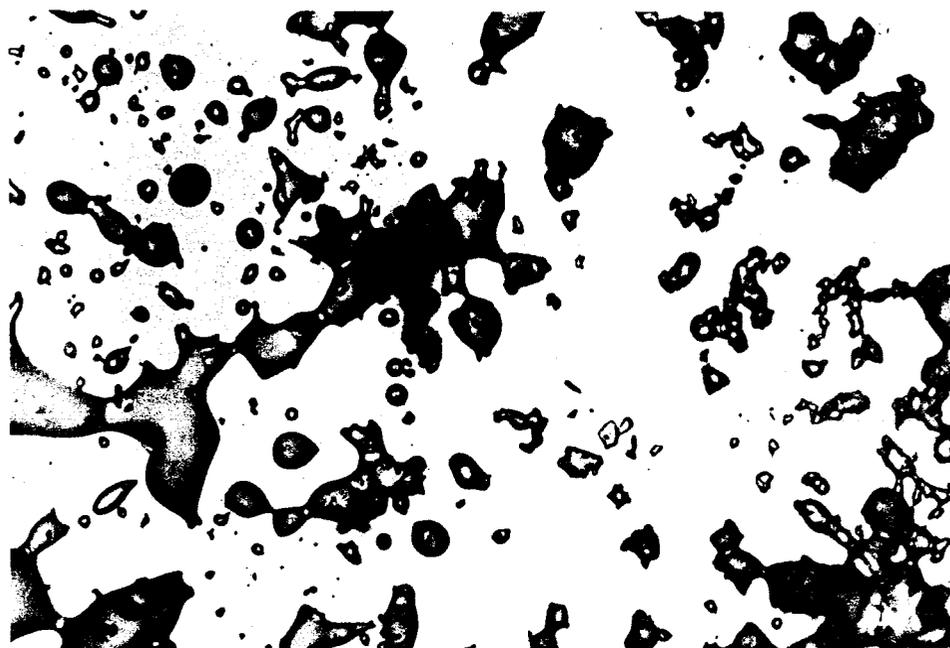


Figura 28. Fotografía mediante HSM correspondiente a la PMCD (165 °C).

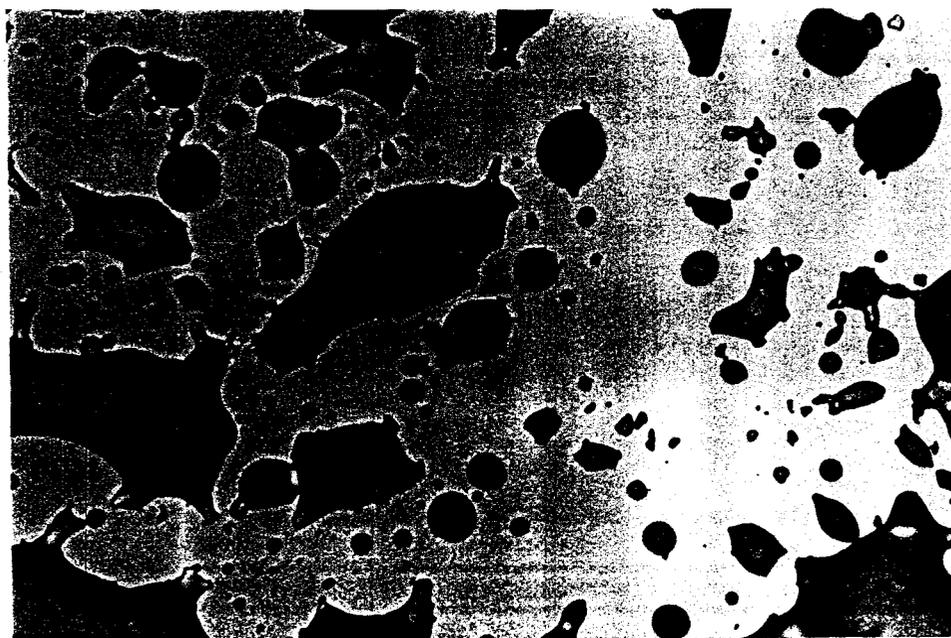


Figura 29. Fotografía mediante HSM correspondiente a la PMCD (180 °C).

3.1.3. Estudio Espectral

3.1.3.1. Estudios en Estado Sólido

3.1.3.1.1. Difracción de Rayos X (XRD)

Con el fin de confirmar la estabilidad del fármaco a las diferentes técnicas de procesado a las que es sometido, empleamos el estudio espectral mediante XRD.

Los difractogramas correspondientes a la gliclazida comercial y tras ser sometida a atomización y molienda se recogen en la Figura 30. En el caso del producto comercial, se observa claramente un elevado número de picos de difracción en el espectro, indicativo de la elevada cristalinidad del fármaco.

La práctica coincidencia de los picos de difracción en los espectros del producto comercial (Figura 30a) y tras ser sometido a molienda (Figura 30b) pone de manifiesto la estabilidad del producto a dicha técnica de procesado, confirmando que la gliclazida sigue manteniendo su estructura cristalina, desechando de esta forma la posibilidad de lograr la amorfización del fármaco por dicho método.

En el caso del fármaco tratado mediante atomización (Figura 30c), se observa un comportamiento muy similar al caso de la molienda, no afectando de forma significativa a la cristalinidad del producto, corroborando de esta forma los resultados obtenidos por DSC, donde la entalpía de fusión del fármaco no sufre cambios significativos tras ser sometido a dichos tratamientos.

Los espectros de XRD de las diferentes CDs comerciales (Figuras 31 a 34) muestran claramente la naturaleza amorfa de la HP- β -CD y la PMCD, en contraste con el carácter cristalino del resto de las CDs ensayadas. Dichas observaciones coinciden plenamente con los resultados del estudio por SEM realizados para las diversas CDs, donde quedaron patentes las diferencias en cuanto a la estructura cristalina de las distintas CDs (ver páginas 49 a 53).

Con el fin de estudiar las posibles modificaciones que puedan experimentar las distintas CDs tras ser sometidas a la técnica de atomización y molienda, se compararon los espectros de XRD de los productos originales con los atomizados y los molidos. Los resultados pusieron de manifiesto que el proceso de atomización al ser aplicado sobre CDs naturales, conduce, en todos los casos, a una disminución de la cristalinidad de las muestras, que se traduce, en los espectros de XRD, en una desaparición de los picos de difracción.

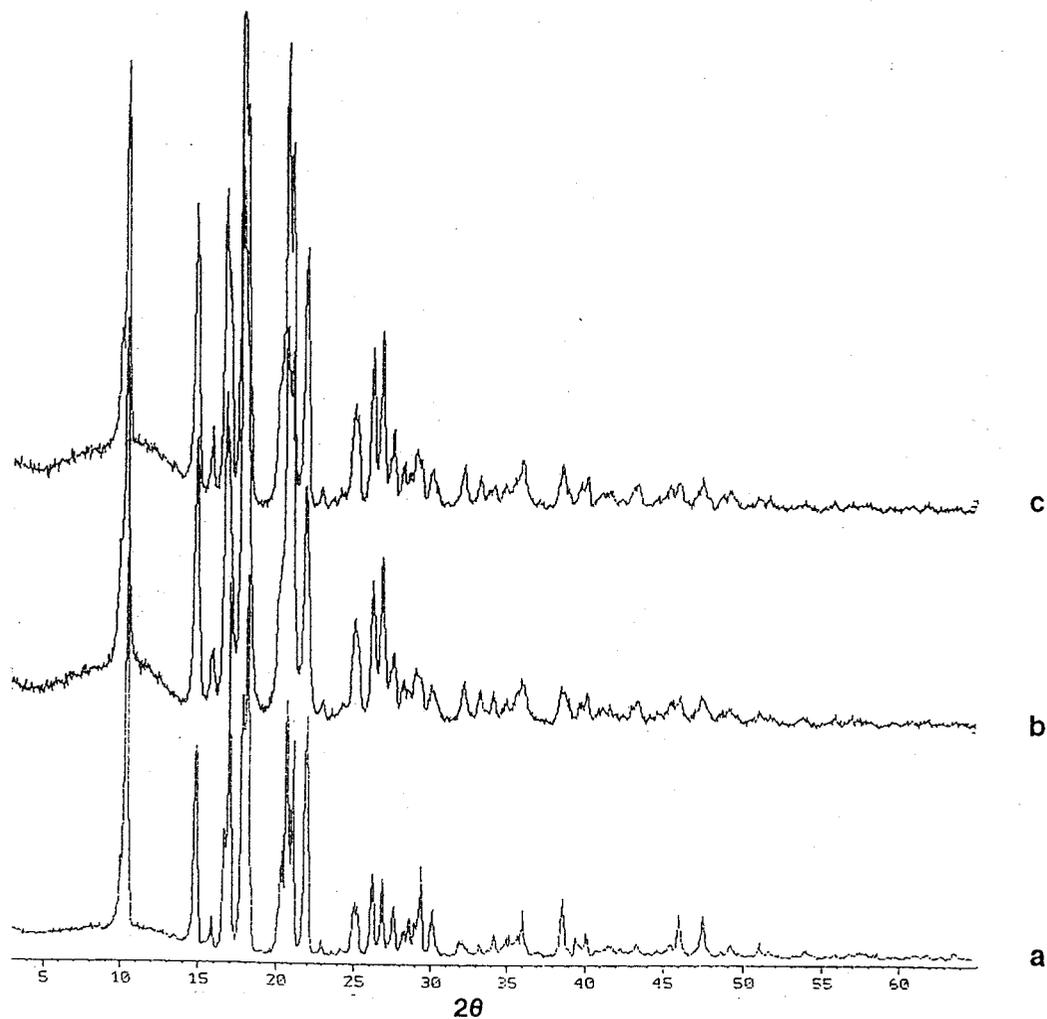


Figura 30. Difractogramas correspondientes a la gliclazida: (a) comercial, (b) molida y (c) atomizada.

Es necesario señalar que la pérdida de cristalinidad que conlleva el tratamiento por atomización no lleva implícita la descomposición de las CDs, ya que técnicas tales como la SEM o DSC confirmaron la estabilidad de las CDs a dicho tratamiento.

Por último, puede apreciarse claramente cómo el procesado por molienda conlleva igualmente a una amorfización de las CDs, siendo éste un método bien conocido y utilizado por algunos autores para conseguir productos absolutamente amorfos [Bettinetti *et al.*, 1995]. Ello puede observarse claramente en los diagramas de XRD representados en las Figuras 31b a 34b.

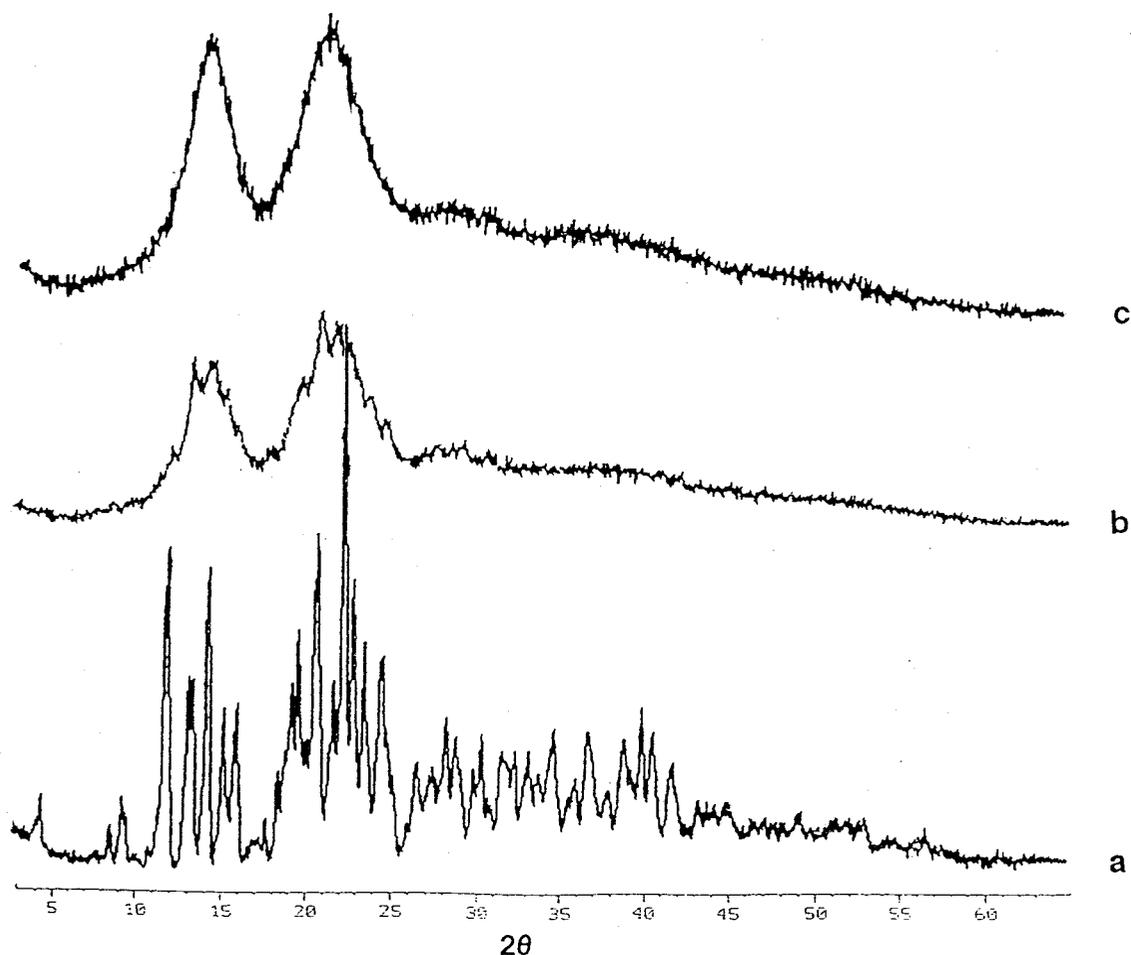


Figura 31. Difractogramas correspondientes a la α-CD: (a) comercial, (b) molida y (c) atomizada.

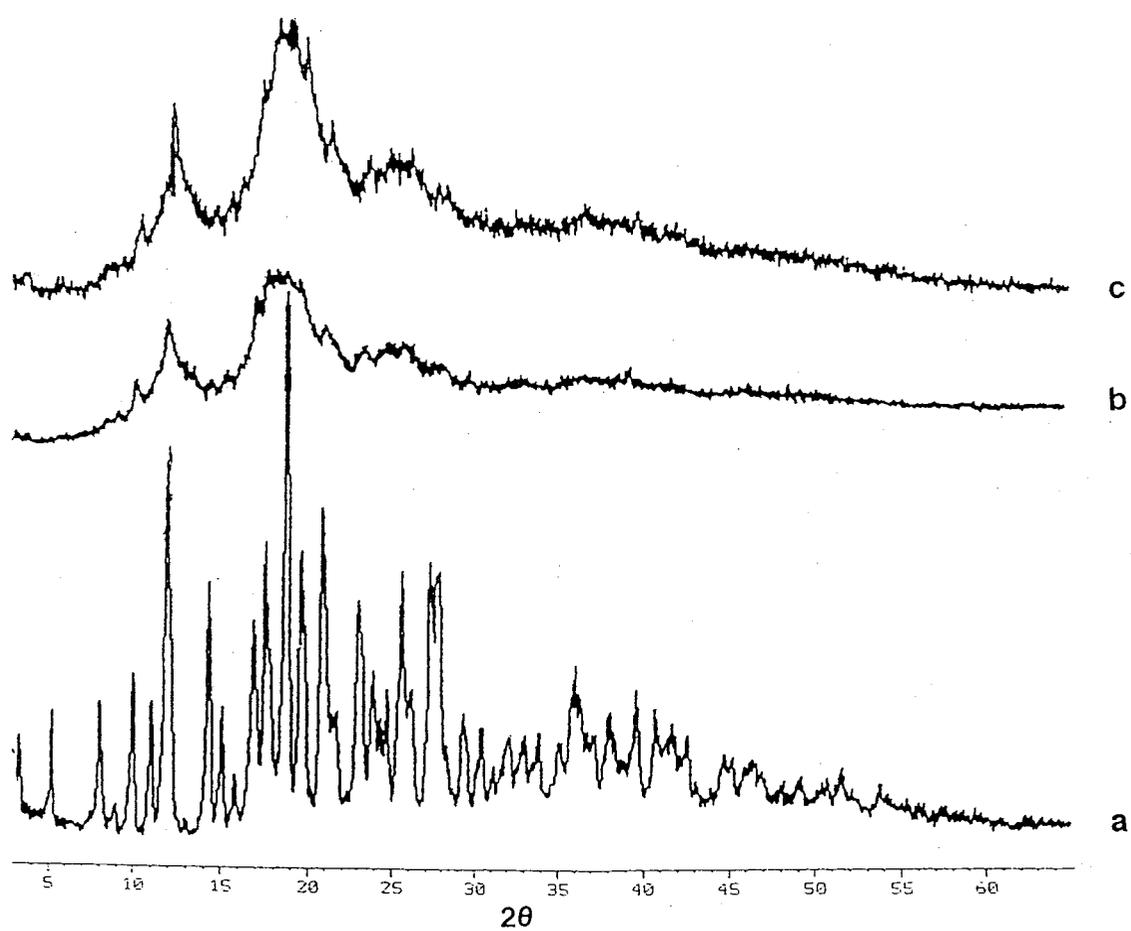


Figura 32. Difractogramas correspondientes a la β -CD: (a) comercial, (b) molida y (c) atomizada.

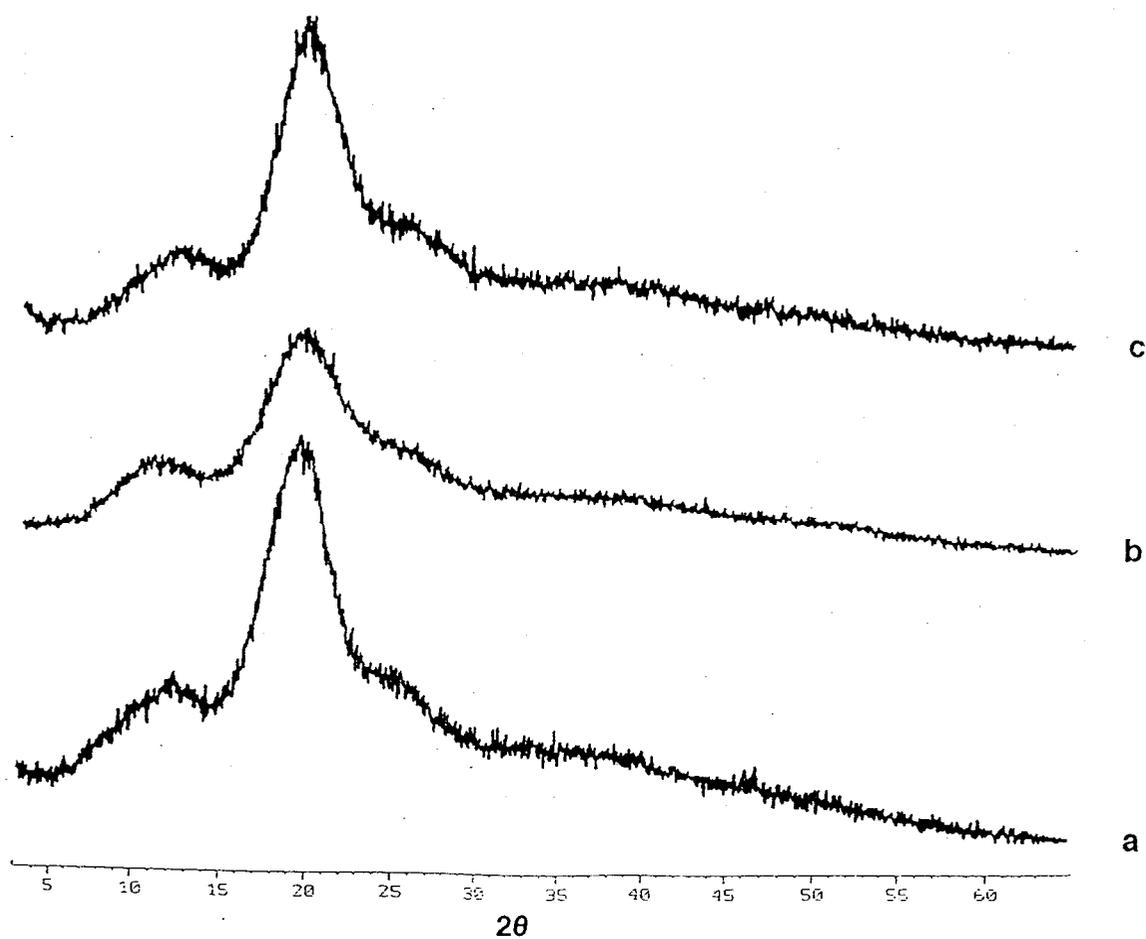


Figura 33. Difractogramas correspondientes a la HP- β -CD: (a) comercial, (b) molida y (c) atomizada.

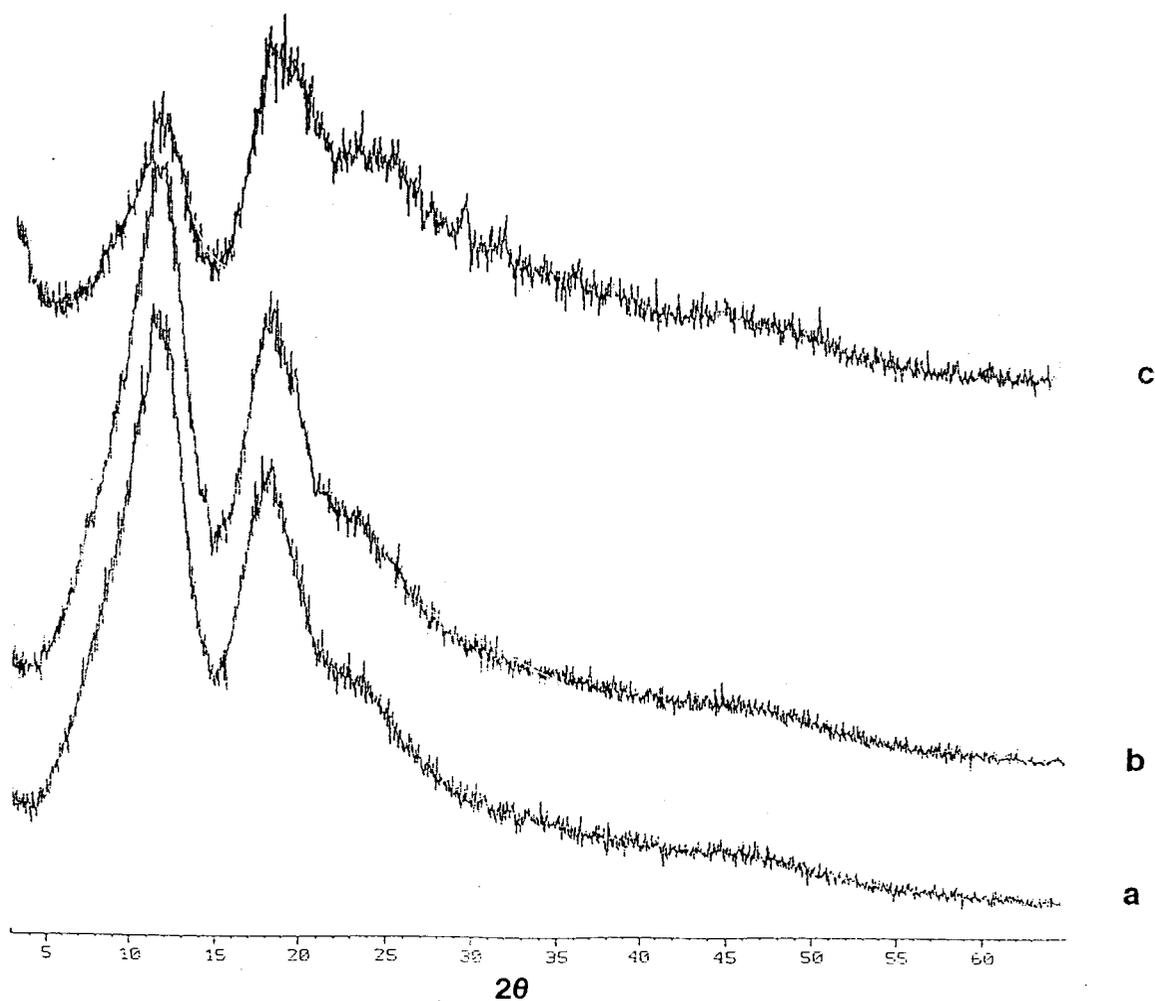


Figura 34. Difractogramas correspondientes a la PMCD: (a) comercial, (b) molida y (c) atomizada.

3.1.3.1.2. Espectroscopía de Infrarrojos (IR)

El espectro de IR del principio activo se encuentra recogido en la Figura 35. En dicho espectro se observan una serie de bandas en la zona de 3300 a 3000 cm^{-1} , asociadas a la absorción de los grupos amino de la gliclazida, provocadas por las vibraciones extendidas de los enlaces N-H. Las bandas más próximas a 3000 cm^{-1} vienen dadas por la presencia de enlaces de H intermoleculares entre el grupo carbonilo de una molécula de gliclazida y los grupos amino de otra molécula, habiéndose observado este fenómeno en moléculas con semejante estructura química [Ghandi y Karara, 1988]. Sin embargo, las bandas de mayor interés corresponden a la intensa absorción debida a la vibración del grupo carbonilo, observable a 1709 cm^{-1} [Ghandi y Karara, 1988; Kedzierewicz *et al.*, 1990], así como las bandas características de las vibraciones de alargamiento simétricas y asimétricas del grupo sulfonilo, que se hallan a 1348 cm^{-1} y 1163 cm^{-1} . Por último, entre 1200 y 600 cm^{-1} se hallan una serie de bandas, las cuales pueden venir dadas, entre otras, por las vibraciones de los enlaces C-H de los carbonos del grupo toloilo.

En cuanto a los espectros de las CDs puras, éstos son bastantes similares entre sí, como consecuencia de su naturaleza química tan similar (Figuras 36 a 39). La intensa banda que aparece en la región de 3500 a 3300 cm^{-1} corresponde a la vibración de alargamiento de los grupos hidroxilo de la CD. En este punto, es de destacar el caso de la PMCD, donde esta banda se encuentra muy atenuada. Este hecho es debido a la importante reducción del número de grupos hidroxilo que se produce como consecuencia de la metilación de los mismos.

Por otra parte, la banda correspondiente a los enlaces de H de los grupos -OH se localiza aproximadamente en la zona de los 2900 cm^{-1} [Glomot *et al.*, 1988]. Asimismo, se observan una serie de bandas agudas e intensas de 1030 a 1060 cm^{-1} , relacionadas con la vibración de los enlaces C-OH de los hidroxilos primarios o secundarios.

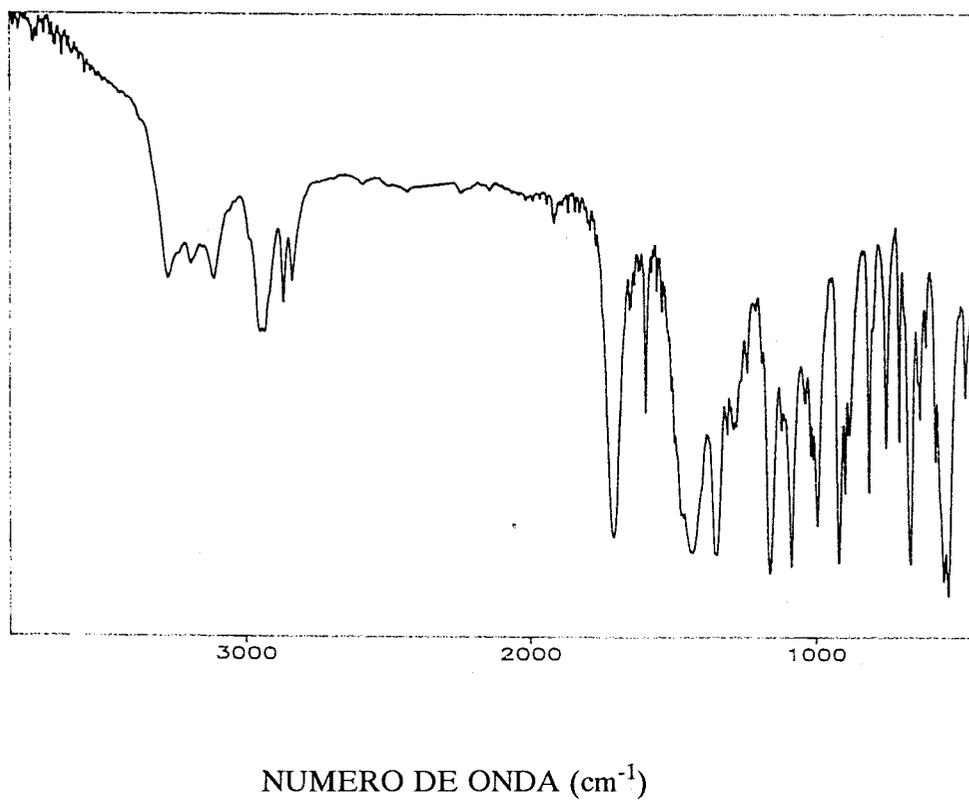


Figura 35. Espectro de IR correspondiente a la gliclazida comercial.

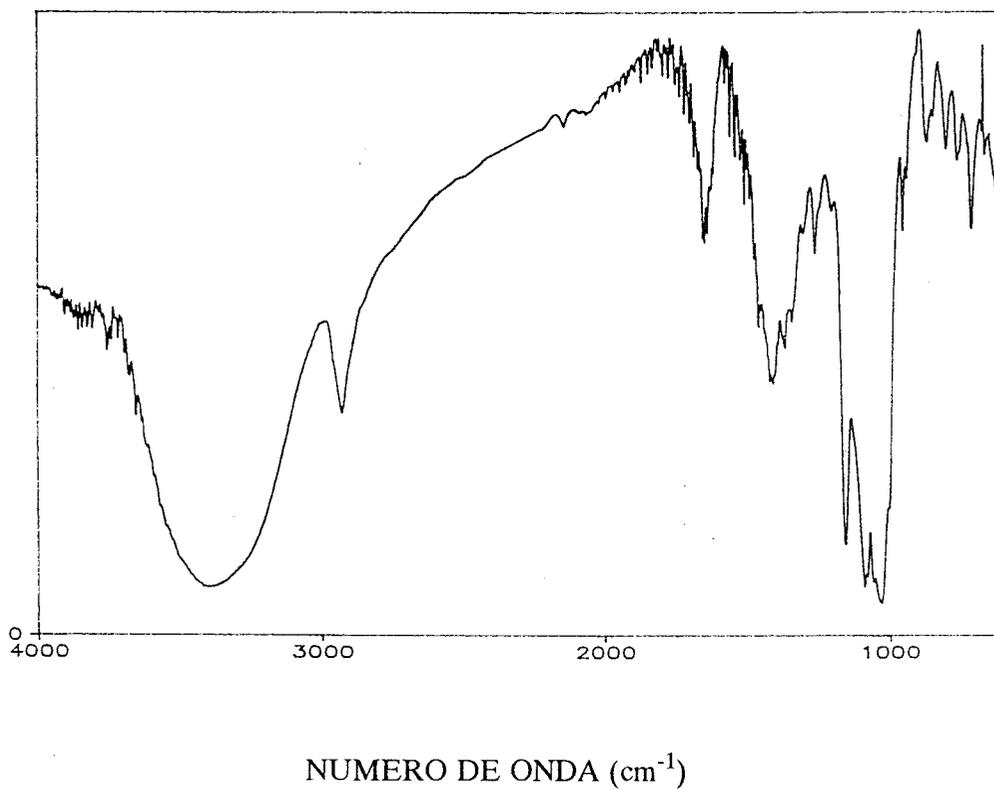
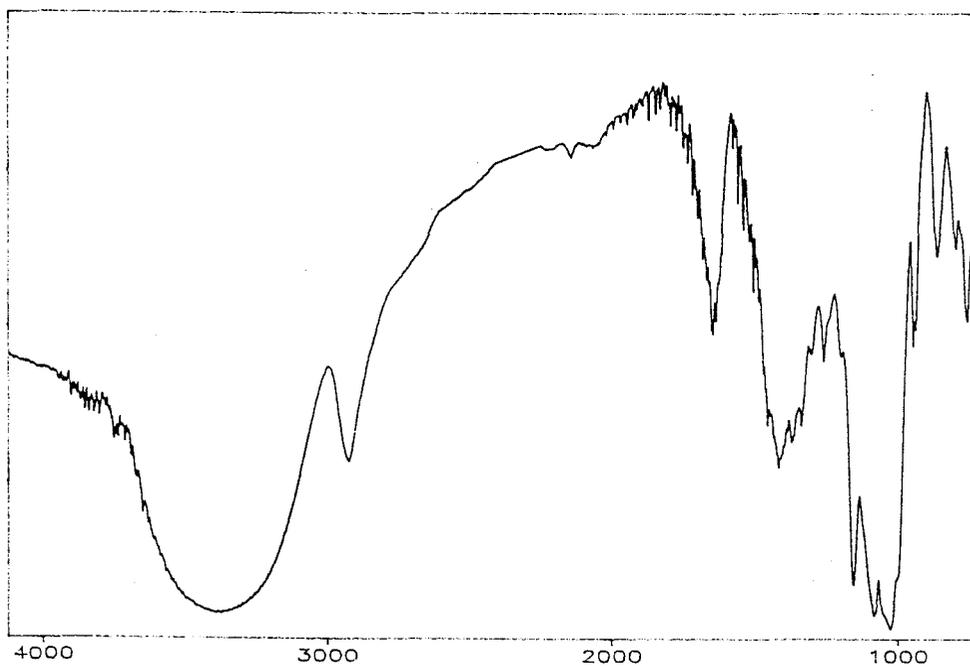


Figura 36. Espectro de IR correspondiente a la α -CD comercial.



NUMERO DE ONDA (cm⁻¹)

Figura 37. Espectro de IR correspondiente a la β-CD comercial.

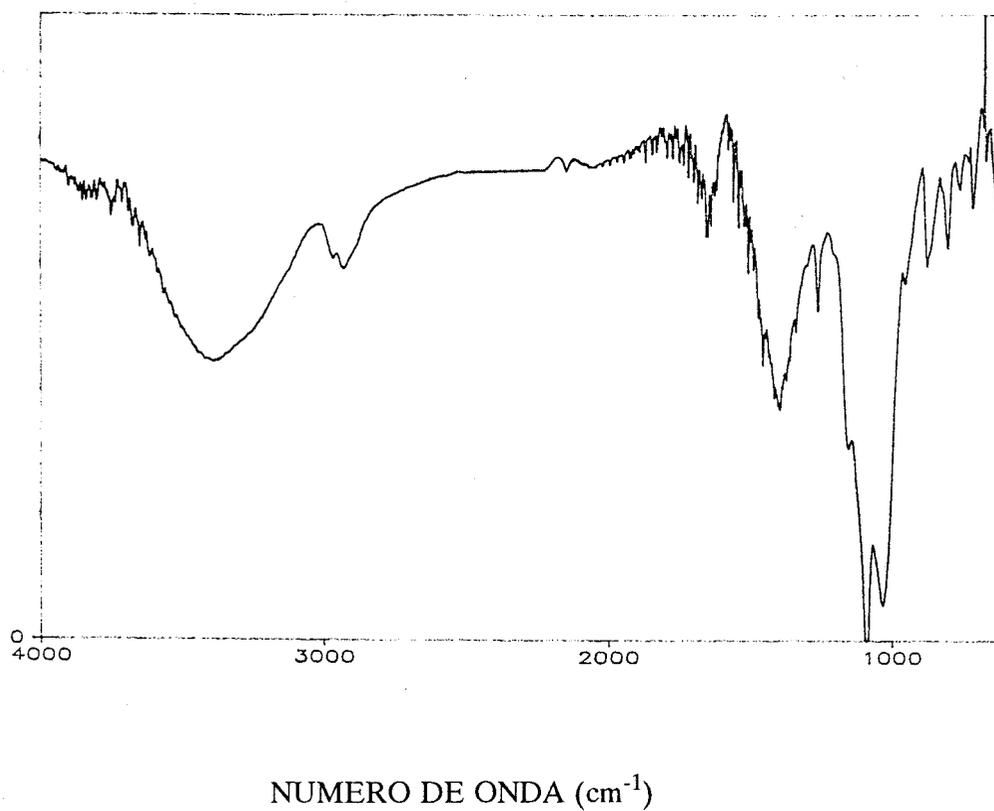


Figura 38. Espectro de IR correspondiente a la HP-β-CD comercial.

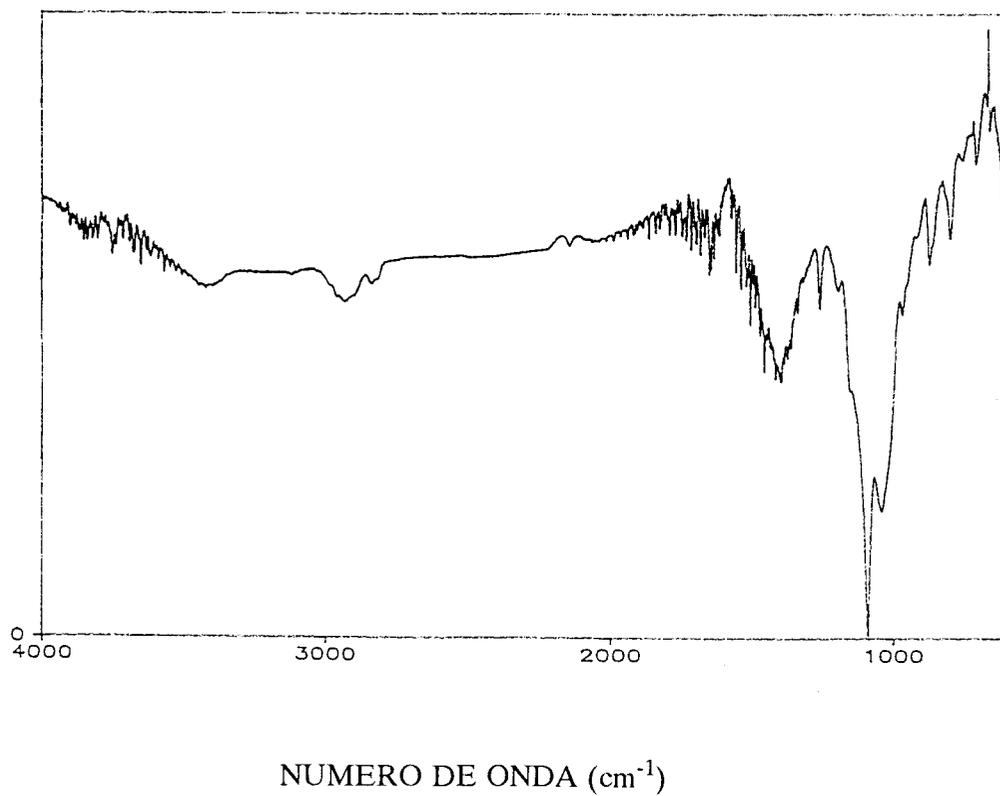


Figura 39. Espectro de IR correspondiente a la PMCD comercial.

3.2. SISTEMAS BINARIOS. ESTUDIO DE LA INTERACCION FARMACO-CD

Al ser posible la existencia de compuestos de inclusión tanto en solución como en estado sólido, abordaremos el estudio de la complejación fármaco-CD en ambos medios. En los dos casos, la estructura de los posibles complejos formados puede diferir notablemente. Así, en solución, la molécula de fármaco se halla alojada, total o parcialmente, en la cavidad de la CD, encontrándose el complejo rodeado por una estructura de moléculas de agua que solvata el sistema.

Por otra parte, en estado sólido, las moléculas de fármaco en sistemas cristalinos pueden situarse no sólo en la cavidad de la CD, sino también en los espacios intersticiales de la red cristalina, dependiendo del tipo de empaquetamiento. En caso de sistemas amorfos, la mayor dificultad reside en poder diferenciar la presencia de un verdadero compuesto de inclusión de una dispersión monomolecular del fármaco en el seno de la CD.

3.2.1. Estudios en estado líquido

3.2.1.1. Estudio de los diagramas de solubilidad de fases

Los diagramas obtenidos para la gliclazida con las diferentes CDs se representan en las Figuras 40 a 43. En los casos de las α -, HP- β - y PMCDs, la solubilidad del fármaco aumenta linealmente con la concentración de CD, clasificándose estas curvas como del tipo A_L de Higuchi [Higuchi y Connors, 1965]. En este caso, el complejo formado en solución no posee un límite de solubilidad definido, hallándose disuelto en su totalidad.

En cambio, para la β -CD (Figura 41), se observa que la solubilidad de la gliclazida aumenta linealmente hasta alcanzar un límite, iniciándose a continuación una meseta que finaliza en una pendiente descendente. En este caso, en las concentraciones correspondientes tanto a la meseta como al tramo descendente del diagrama de solubilidad, aparece en los recipientes un precipitado blanco. Este comportamiento corresponde claramente a un diagrama de solubilidad tipo B_S de Higuchi. Este tipo de diagrama es el resultado de la formación de un complejo fármaco-CD de solubilidad limitada. Ello se refleja en la presencia de una zona de meseta, donde la solubilidad del complejo alcanza su máximo y posteriores adiciones de CD conducen a una precipitación del complejo

formado. En esta zona, la solubilidad del fármaco se mantiene constante mientras exista exceso de fármaco sólido en el medio. Cuando se consume totalmente el fármaco en forma sólida, se produce un descenso de la solubilidad aparente del mismo, dado que la adición de CD sigue conduciendo a la precipitación del complejo.

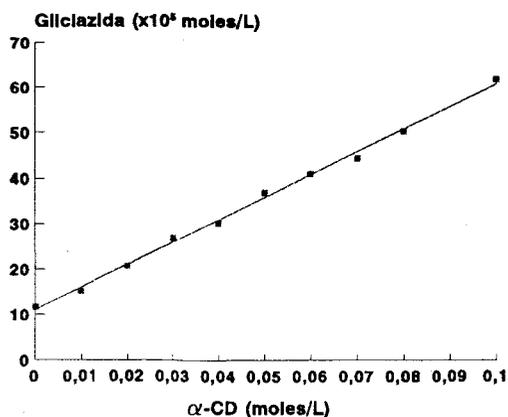


Figura 40. Diagrama de solubilidad de la gliclazida en presencia de α -CD a 25 °C.

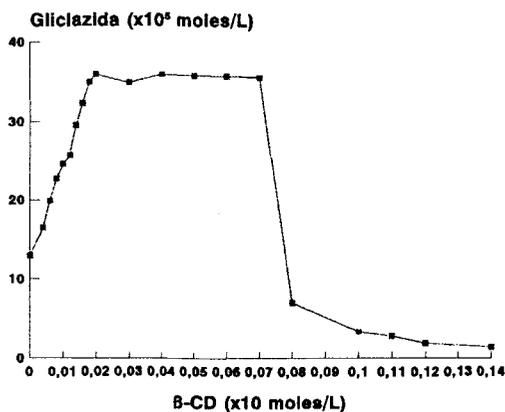


Figura 41. Diagrama de solubilidad de la gliclazida en presencia de β -CD a 25 °C.

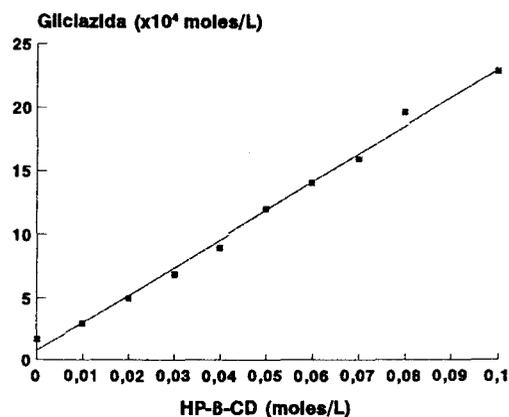


Figura 42. Diagrama de solubilidad de la gliclazida en presencia de HP-β-CD a 25 °C.

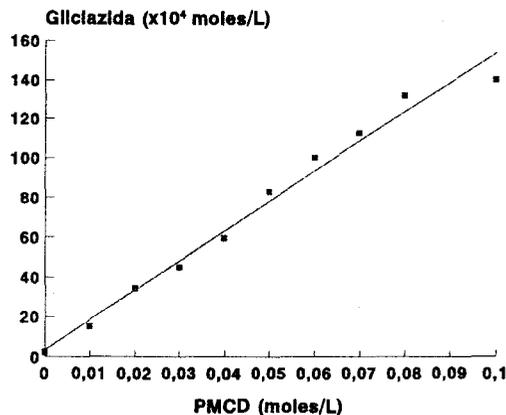


Figura 43. Diagrama de solubilidad de la gliclazida en presencia de PMCD a 25 °C.

El estudio de dicha meseta permite obtener la estequiometría del complejo que precipita. En efecto, el contenido en gliclazida del complejo que precipita ($[S]_c$) será igual a la concentración total de gliclazida adicionada al sistema (3.1 mM) menos la cantidad de gliclazida en solución al inicio de la meseta (0.36 mM). El contenido de CD en el complejo ($[L]_c$), es igual a la cantidad de CD adicionada en el intervalo de la meseta, es decir, 5 mM. La estequiometría del complejo que precipita se puede calcular por tanto a partir de la

relación:

$$[S]_c / [L]_c = (3.1 \text{ mM} - 0.36 \text{ mM}) / 5 \text{ mM} = 0.54$$

El complejo presenta, por tanto, una estequiometría 1:2. De este estudio, podemos concluir que el complejo precipitado responde a la fórmula SL_2 , lo que indica que son necesarias dos moléculas de β -CD para complejar una molécula de gliclazida.

Por otra parte, resulta evidente la disparidad en la solubilidad del complejo formado en las primeras etapas del diagrama de solubilidad, responsable de la porción ascendente de la curva de solubilidad, respecto a la solubilidad del complejo obtenido por precipitación. Así, mientras que el primero presenta una solubilidad aproximada de 0.23 mM, el segundo presenta una solubilidad 10 veces menor (0.02 mM). Estos resultados, concordantes con los obtenidos del estudio estequiométrico de la meseta del diagrama de solubilidad, parecen confirmar la existencia de, al menos, dos complejos distintos; uno, de estequiometría 1:1 y una solubilidad de 23 mM, responsable del aumento inicial de la solubilidad del fármaco y otro, prácticamente insoluble, de solubilidad 0.02 mM y estequiometría 1:2, responsable de la porción descendente del diagrama de solubilidad. Resultados similares han sido recogidos en la bibliografía para el sistema ibuprofeno- β -CD [Chow y Karara, 1986].

Las constantes de formación aparente (K_c) para los complejos se han calculado a partir de las pendientes de los diagramas de solubilidad, de acuerdo con la ecuación de Higuchi y Connors [Higuchi y Connors, 1965]. Dichos valores se hallan recogidos en la Tabla IV.

CD	α -CD	β -CD	HP- β -CD	PMCD
K_c (M^{-1})	44	1094	292	895
r (n = 10)	0.9983	0.9964	0.9968	0.9856
Eficacia solubilizante	1.3 ^a	2.8 ^b	1.8 ^a	7.0 ^a

Tabla IV. Valores de K_c , coeficientes de correlación y eficacias solubilizantes de las diferentes CDs respecto la gliclazida, calculados a 25 °C (a: Frente a una concentración 0.01 M de CD; b: Frente a una concentración 0.002-0.007 M de β -CD (Meseta).

El estudio comparado de las diferentes constantes de complejación muestra que, entre las diferentes CDs empleadas, la que conduce a una mayor constante de complejación es la β -CD, indicando una acomodación óptima de la gliclazida en la cavidad de dicha CD. Asimismo, es de destacar el alto valor de eficacia solubilizante calculado para la PMCD respecto a la α -CD y la HP- β -CD, lo cual está en relación con su superior capacidad complejante.

El débil valor de K_c (44 M^{-1}) para la α -CD indica la baja afinidad del fármaco por esta CD, debido sin duda a la mala adecuación de la gliclazida (o alguno de sus radicales) en la cavidad de dicha CD, hecho atribuible tanto al tamaño voluminoso de nuestro fármaco como al pequeño tamaño de la cavidad de la α -CD.

De igual forma, las HP- β - y PMCDs conducen a bajos valores de K_c , siendo de 292 y 895 M^{-1} , respectivamente. En estos casos, no podemos atribuir estos deficientes valores a las dimensiones de la cavidad de las CDs, ya que estos productos, al ser derivados de la β -CD, presentan cavidades de similares dimensiones a la β -CD natural. Sin embargo, debemos considerar el impedimento estérico que pueden presentar los radicales metoxilos y principalmente los hidroxipropilos, existentes en estas CDs. En efecto, la presencia de estos radicales puede actuar bloqueando relativamente la entrada de la cavidad de la CD, dificultando la penetración del fármaco en la cavidad de la CD y por tanto el establecimiento de interacciones no covalentes. Ello se traduciría en una disminución en la K_c para estos sistemas respecto a la CD natural. A estos efectos, diferentes autores han observado fenómenos similares con estas CDs y varios fármacos [Blanco *et al.*, 1991; Ginés *et al.*, 1992; Prankerd *et al.*, 1992; Moyano *et al.*, 1994a].

Por otra parte, es de destacar que en el caso de la PMCD disminuye drásticamente el número de enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los hidroxilos de grupos vecinos, al hallarse éstos metilados, dando lugar a una mayor flexibilidad en la estructura macrocíclica de la CD. Dicha flexibilidad puede favorecer la acomodación de la molécula huésped en la cavidad de la CD, lo que compensaría el impedimento estérico de sus radicales metoxilo. Casos similares se han observado para otras CDs metiladas [Yoshida *et al.*, 1988; Moyano *et al.*, 1996b]. Debido a este hecho, el valor de K_c de la gliclazida con esta CD no se halla tan disminuido como en el caso de la HP- β -CD.

3.2.1.2. ^1H RMN

En base a los estudios de solubilidad anteriores, donde el valor máximo de K_c se obtuvo para la β -CD, los estudios por RMN se centraron en el estudio de la interacción de la gliclazida con dicha CD. En la Figura 44 se expone la asignación de protones y carbonos de la molécula de gliclazida, recogiendo en la Figura 45 los espectros de ^1H RMN para la β -CD y la gliclazida, junto con el sistema binario gliclazida- β -CD. Los desplazamientos químicos para los protones del hospedador y el huésped se recogen en las Tablas V y VI.

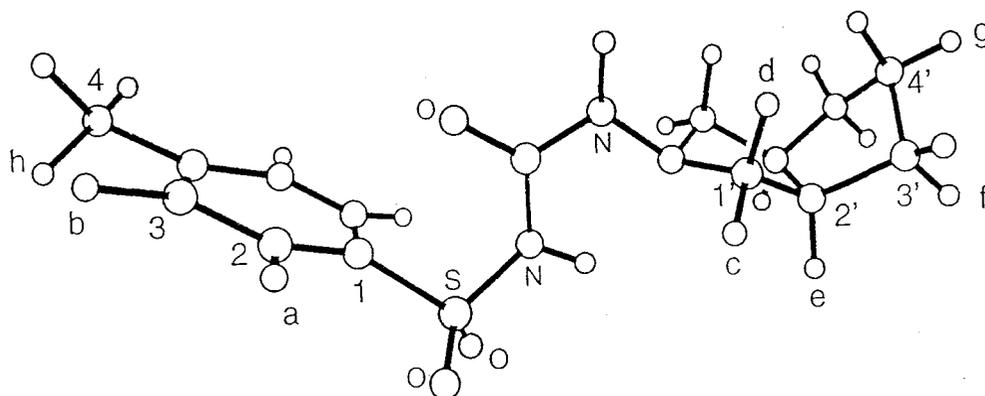


Figura 44. Asignación de protones y carbonos y conformación de la molécula de gliclazida.

La gliclazida se caracteriza por la presencia de dos radicales, el azabicyclooctilo y el toliilo, los cuales pueden interactuar potencialmente con la cavidad de la CD. El espectro del sistema binario se caracteriza principalmente por el desplazamiento a campos más altos, en especial para los protones del anillo alifático y, en menor medida, del grupo toliilo (Tabla V), indicando la complejación del fármaco con la CD en medio líquido.

Es necesario señalar que el pH básico de las soluciones que empleamos para realizar los espectros ($\text{pH} \approx 12$) da lugar a la ionización del grupo toliilsulfonamida de la gliclazida, siendo estas condiciones diferentes de las de los estudios de solubilidad, los cuales se llevaron a cabo en soluciones acuosas no tamponadas. Este hecho probablemente influye de forma notable sobre la complejación de la gliclazida, al aumentar la polaridad del radical toliilsulfonamida y disminuir así su tendencia a la complejación.

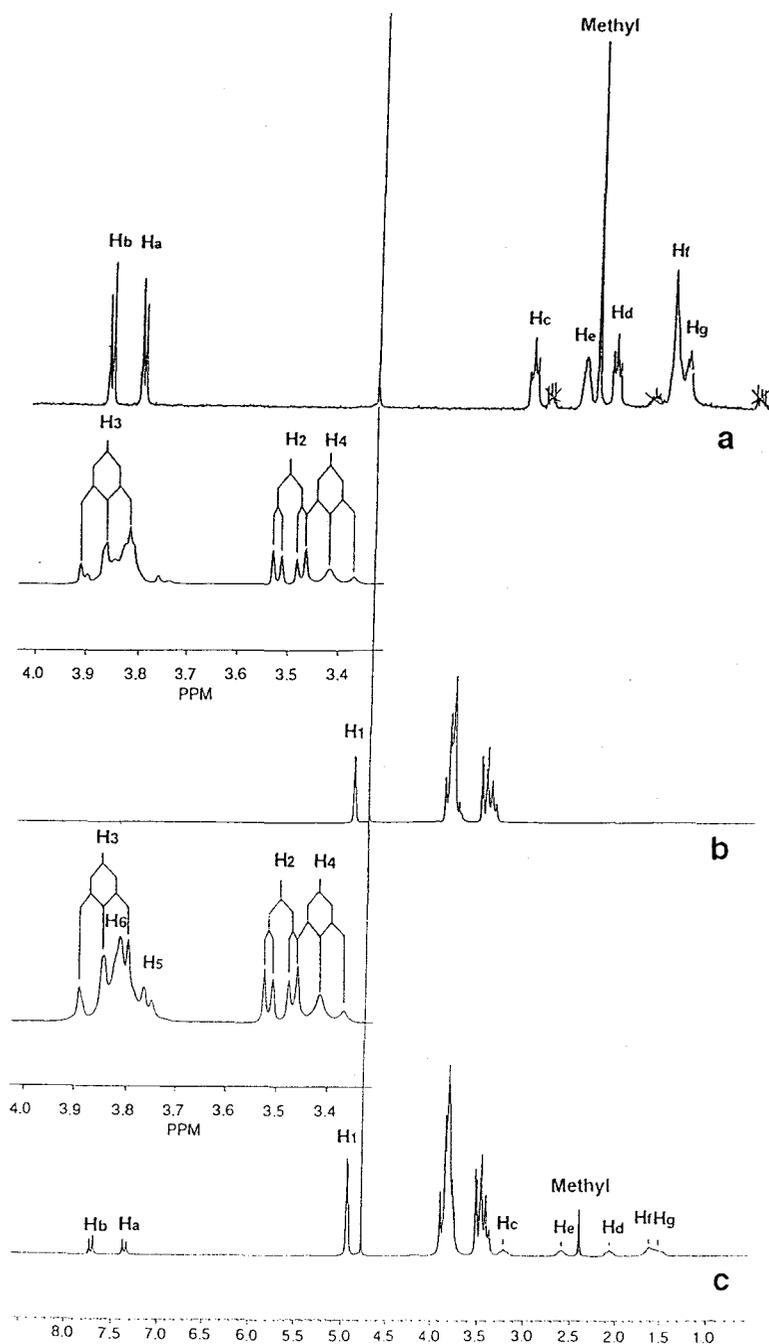


Figura 45. Espectros de ^1H RMN a 200 MHz correspondientes a las siguientes muestras: (a) gliclazida (5 mg/mL), (b) β -CD (30 mg/mL) y (c) sistema gliclazida- β -CD 1:2 (40 mg/mL).

Gliclazida	δ libre	δ complejo	$\Delta\delta$ (ppm)
H _a	7.700	7.710	0.010
H _b	7.360	7.360	0
H _c (eq)	3.100	3.220	0.120
H _d (ax)	2.190	2.060	-0.130
H _e	2.530	2.600	0.070
H _f	1.550	1.620	0.070
H _g	1.402	1.500	0.098
Metilo	2.390	2.390	0

Tabla V. Desplazamientos químicos correspondientes a los protones de la gliclazida, en ausencia y en presencia de β -CD.

β -CD	δ libre	δ complejo	$\Delta\delta$ (ppm)
H ₁	4.940	4.940	0
H ₂	3.490	3.495	0.005
H ₃	3.860	3.840	-0.020
H ₄	3.420	3.420	0
H ₅	-	3.780	-
H ₆	3.820	-	-

Tabla VI. Desplazamientos químicos correspondientes a los protones de la β -CD, en ausencia y en presencia de gliclazida.

Respecto a la β -CD, la presencia de gliclazida se traduce en un desplazamiento a campos altos de la señal del protón H3, unido a la aparición de la señal del protón H5, la cual estaba solapada con la señal del protón H6, indicando también un desplazamiento a campos altos de dicha señal. Los desplazamientos de las señales de dichos protones, junto con las leves modificaciones observadas para los protones H1, H2 y H4, indican la entrada del/de los grupo/s de la gliclazida en el interior de la cavidad de la CD y, por tanto, su complejación.

En nuestro caso, es de destacar que no se han observado fuertes cambios en las señales de los protones H3 y H5. Este hecho puede indicar la complejación preferente del anillo alifático respecto al grupo aromático, el cual podría inducir un importante efecto anisotrópico por la presencia de la corriente de anillo de sus electrones π . Dicho efecto daría lugar a un fuerte desplazamiento de las señales de los protones de la cavidad debido al apantallamiento de los mismos, hecho que no se produce claramente.

Para confirmar dicha hipótesis, se ha llevado a cabo un estudio del efecto nuclear *Overhauser* (*nOe*). La Figura 46 muestra el espectro *nOe* del sistema gliclazida- β -CD, recogiendo en la Tabla VII los incrementos observados en las señales de los protones de la gliclazida en solución NaOD/D₂O. A partir de estos datos, se deduce la presencia de un importante efecto *nOe* entre los protones del grupo azabicyclooctilo y los protones H3 de la gliclazida, principalmente para el H_c (1.2 %) y el H_e (2.1 %), indicando inequívocamente la complejación de este grupo en la cavidad de la CD.

En el caso del radical tolilo, también se registró un aumento de las señales de sus protones (0.8 %), indicando la complejación de este grupo, aunque en menor medida que el anillo alifático. Dichas observaciones pueden implicar dos posibilidades: a) presencia de dos tipos de complejos 1:1 (inclusión del anillo aromático o del anillo alifático en la cavidad de la CD) o b) la formación de un complejo 1:2, donde el fenómeno de la inclusión se produce simultáneamente para ambos grupos. Con el objetivo de elucidar cuál de las dos posibilidades es la verdadera, se llevó a cabo el método de variación continua.

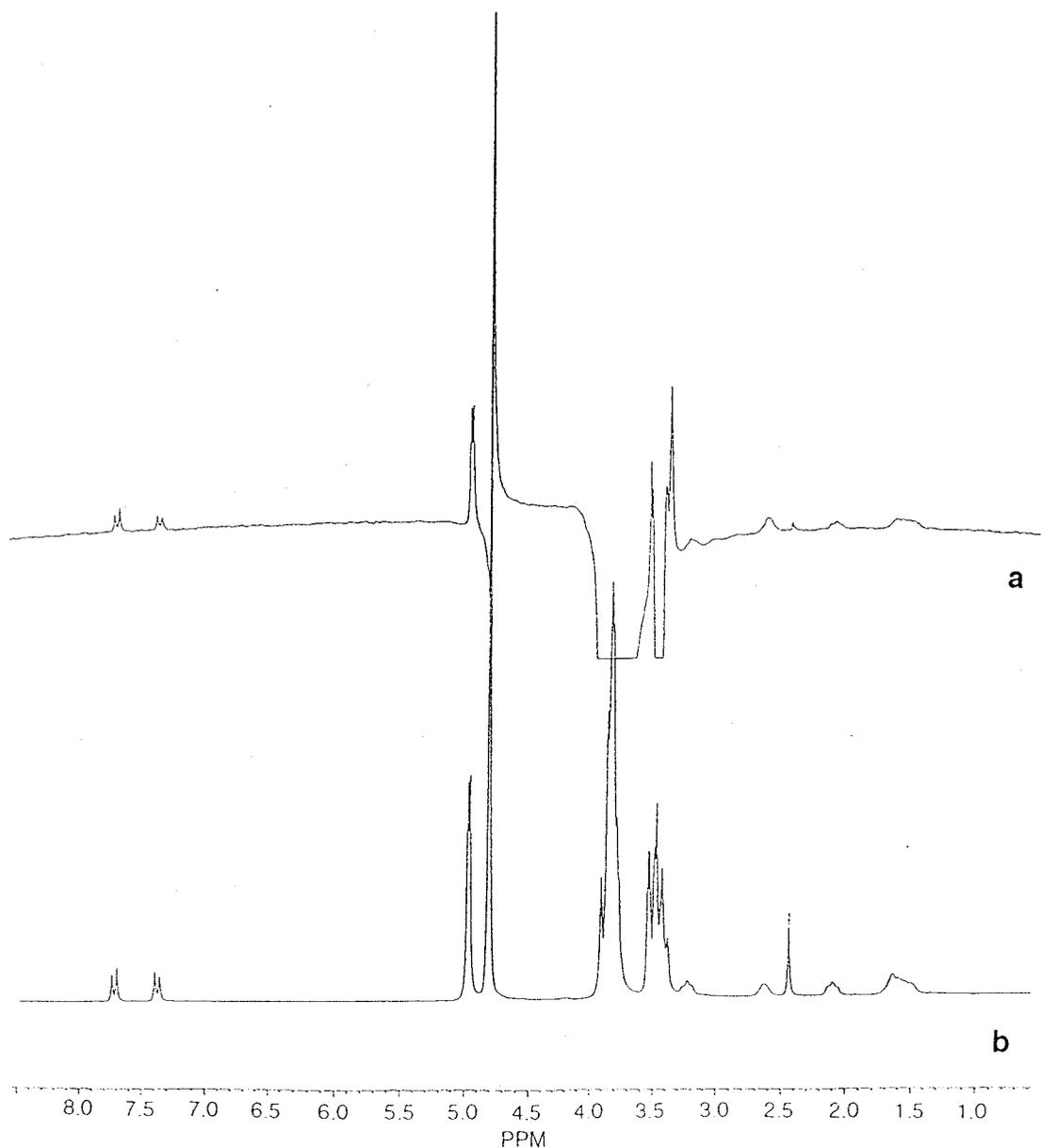


Figura 46. Espectro de nOe a 200 MHz correspondiente al sistema gliclazida- β -CD 1:2 (40 mg/mL) tras irradiación del protón H3 de la β -CD a 37 °C (a), siendo (b) el espectro de referencia (relación de escalas a:b = 1:64).

Gliclazida	% nOe
Ha	0.8
Hb	0.8
Hc (eq)	1.2
Hd (ax)	1.1
He	2.1
Hf	0.9
Hg	0.9
Metilo	0.2

Tabla VII. Porcentaje de nOe observado para los protones de la gliclazida tras irradiación del protón H₃ de la β-CD.

Las representaciones del valor de la fracción molar r frente a los valores de variación de los desplazamientos químicos ($\Delta\delta_{\text{obs}}$) para los grupos de la gliclazida y el protón H₃ de la β-CD se encuentran recogidas en la Figura 47. En todos los casos, estas curvas muestran claramente un perfil asimétrico, indicando la presencia de complejos con estequiometría diferente a 1:1 [Moyano *et al.*, 1996a]. Las curvas de variación continua para los protones alifáticos y aromáticos de la gliclazida presentan un máximo a $r = 0.333$, indicando por tanto una estequiometría 1:2 fármaco-CD. La curva para el protón H₃ de la β-CD muestra un máximo a $r = 0.666$, confirmando dicha proporción estequiométrica.

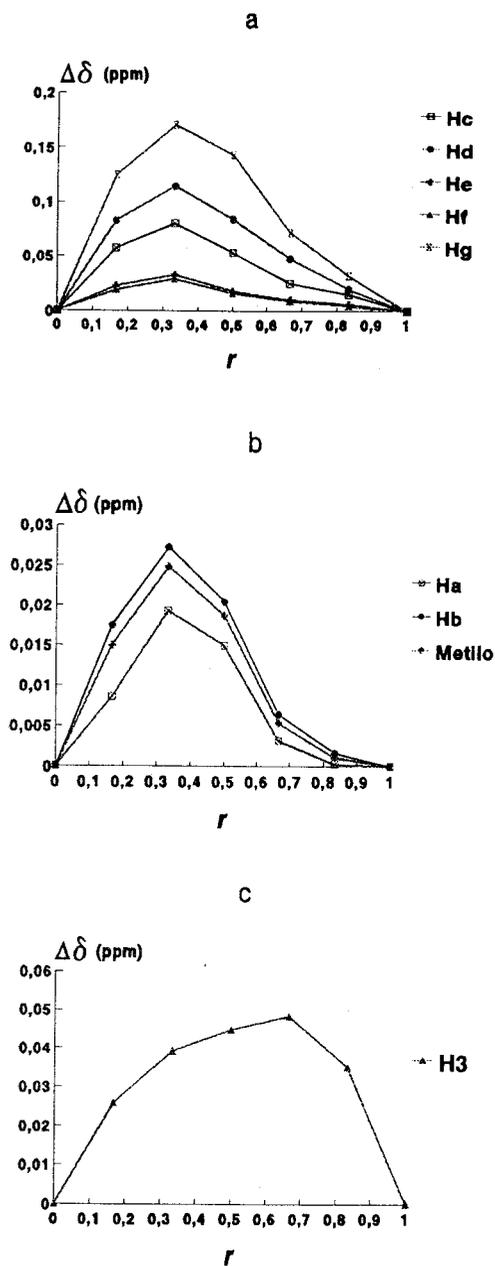


Figura 47. Curvas de variación continua para: (a) protones del radical toluilo, (b) protones del radical azabicyclooctilo y (c) protón H3 de la β -CD.

3.2.1.3. ^{13}C RMN

En la Figura 48 se recogen los espectros de ^{13}C RMN para los componente puros y el complejo. A partir de estos datos, se puede observar que las señales de los carbonos C2 y C5 de la β -CD se encuentran intercambiadas. Este comportamiento se atribuye a la desprotonación del grupo -OH del C2, debido al pD básico de la solución. Los desplazamientos químicos y los cambios observados en los mismos para los carbonos de la gliclazida y la β -CD se recogen en las Tablas VIII y IX, respectivamente.

Las señales de los carbonos del radical azabicyclooctilo (C1' a C4'), se hallan desplazadas a campos más altos, indicando que dicho grupo se encuentra en el interior hidrofóbico de la cavidad de la CD. El menor valor de $\Delta\delta$ para el C4' puede interpretarse en base a una profunda penetración de dicho grupo en la cavidad de la CD, hallándose dicho átomo en las proximidades del orificio más estrecho de la CD, posiblemente fuera de la cavidad. Por otra parte, el grupo tolilo presenta un desapantallamiento de sus carbonos C1 y C3, indicando que tales carbonos se hallan en las proximidades del orificio ancho de la CD [Moyano *et al.*, 1996a]. De igual modo, las señales de los carbonos C4 y metilo se hallan desplazadas a campos altos, lo que indica su complejación. Estas observaciones se explican únicamente por la presencia de una segunda molécula de β -CD, la cual atraparía parcialmente este grupo, con la formación de un complejo 1:2. Este hecho explicaría la menor tendencia del radical tolilo a complejarse con la CD, hallándose estos datos en concordancia con las curvas de variación continua y los estudios del nOe.

Por último, las variaciones de los desplazamientos químicos para la β -CD en presencia de gliclazida son especialmente altas para los carbonos C1, C2, C3, C5 y C6. Las modificaciones en C1, C2 y C6 pueden atribuirse a cambios conformacionales inducidos por la inclusión de la molécula de gliclazida, mientras que los fuertes desplazamientos de las señales de los carbonos C3 y C5, situados en el interior de la cavidad, indican la formación del compuesto de inclusión.

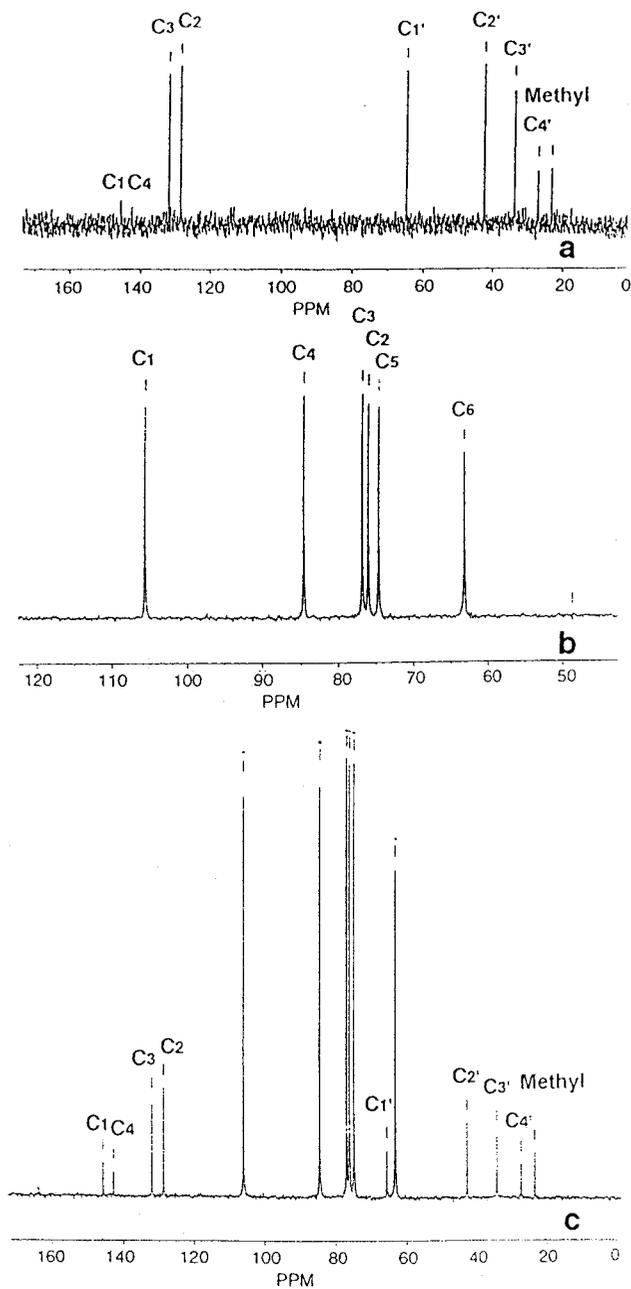


Figura 48. Espectros de ^{13}C RMN a 50.3 MHz correspondientes a las siguientes muestras: (a) gliclazida (5 mg/mL), (b) β -CD (30 mg/mL) y (c) sistema gliclazida- β -CD 1:2 (40 mg/mL).

Gliclazida	δ libre	δ complejo	$\Delta\delta$ (ppm)
C1	145.540	145.483	-0.057
C2	128.623	128.651	0.028
C3	132.022	131.948	-0.074
C4	142.480	142.605	0.125
Metilo	23.193	23.258	0.065
C1'	64.825	65.444	0.619
C2'	42.540	42.751	0.211
C3'	33.712	34.062	0.350
C4'	27.053	27.077	0.024

Tabla VIII. Desplazamientos químicos correspondientes a los carbonos de la gliclazida, en ausencia y en presencia de β -CD.

β -CD	δ libre	δ complejo	$\Delta\delta$ (ppm)
C1	105.673	105.750	0.077
C2	75.935	76.009	0.074
C3	76.742	76.834	0.092
C4	84.598	84.608	0.010
C5	74.583	74.684	0.101
C6	63.187	63.104	-0.083

Tabla IX. Desplazamientos químicos correspondientes a los carbonos de la β -CD, en ausencia y en presencia de gliclazida.

3.2.1.4. Modelización molecular

Para completar los estudios de RMN, a partir de los datos obtenidos se llevó a cabo una simulación de la estructura del complejo de inclusión formado. En nuestro caso, el ajuste de la molécula de gliclazida entre las dos moléculas de β -CD reveló un mínimo en la energía de interacción respecto a la traslación en la dirección longitudinal del orificio, mientras que la rotación en la misma dirección da lugar a pequeñas variaciones en la energía de interacción. La estructura minimizada resultante se encuentra recogida en la Figura 49. Dicha estructura muestra una profunda penetración del grupo azabiciclooctilo en el anillo de la β -CD en comparación con el grupo tolilo. El orden de $\Delta\delta$ obtenido por ^{13}C RMN para los carbonos del grupo azabiciclooctilo ($\text{C1}' > \text{C3}' \approx \text{C2}' > \text{C4}'$) se halla en concordancia con esta hipotética conformación del compuesto de inclusión, correspondiendo las mayores variaciones en los desplazamientos químicos a las de los carbonos alineados con los carbonos C5 de la β -CD. En particular, el carbono C4' se halla en los límites de la β -CD, y como constituye el extremo de la conformación tipo "sobre" de la subestructura del ciclopentano, su relativa libertad conformacional permite su acomodación incluso más allá de los límites de la β -CD.

Un cambio global menos evidente se observa para el grupo tolilo, pero también en este caso los carbonos más afectados (C3 y C4) se encuentran situados en posiciones análogas a los protones C1' y C2' del grupo azabiciclooctilo.

Como hemos comentado anteriormente, los nOe más significativos se observaron entre el H3 de la β -CD con los Hc y He. Ello revela unas distancias entre 2 y 5 Å para esta hipotética estructura, aunque el orden de distancias HGL-H3 β -CD calculado es Hc (2.8-3.5 Å) > Hd (3.5-4.2 Å) > He (4.0-4.5 Å).

Por último, posibles cambios en la conformación de la β -CD pueden también ponerse de manifiesto por medio de estudios de simulación molecular, aunque serían necesarios más datos experimentales para llevar a cabo dichas investigaciones, tales como la elucidación de la estructura cristalina.

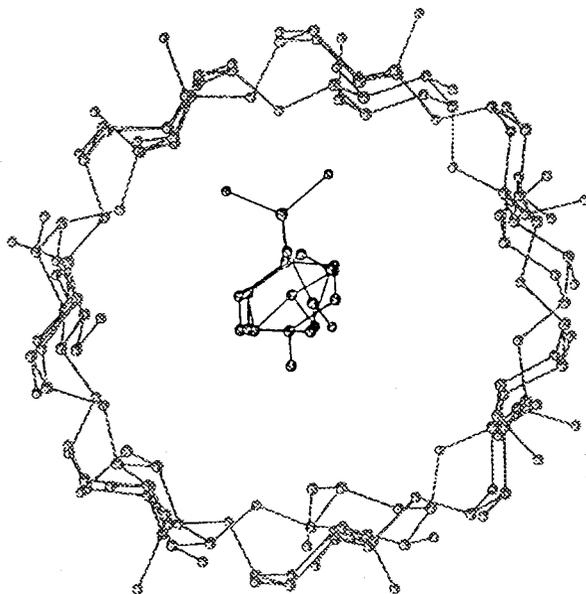
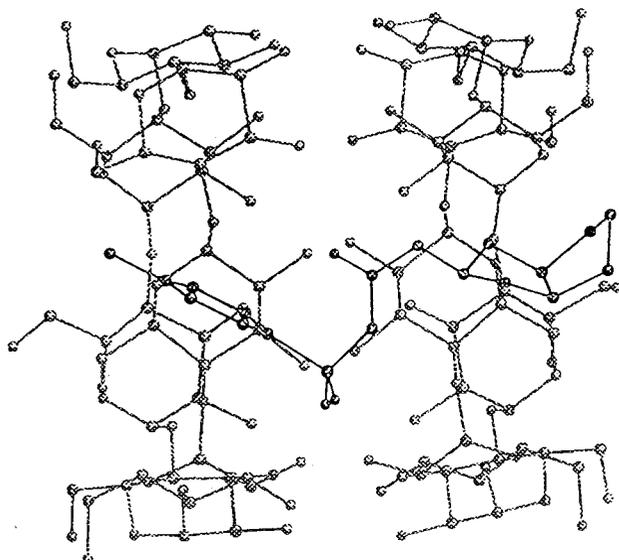


Figura 49. Modelización molecular del complejo 1:2 gliclazida- β -CD.

3.2.2. Estudios en estado sólido

3.2.2.1. Estudio Morfológico

3.2.2.1.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Esta técnica, en general, no es útil *per se* para demostrar la presencia de un compuesto de inclusión, confirmando únicamente la existencia o no de un único componente en la muestra bajo estudio. De esta forma, dicha técnica adquiere un carácter complementario de otros métodos de caracterización más concluyentes recogidos en la presente Memoria. Asimismo, estos estudios serán de utilidad a la hora de discutir los resultados obtenidos en los ensayos de disolución *in vitro*.

A modo representativo, este apartado se centrará en el estudio de los sistemas binarios gliclazida- β -CD y gliclazida-PMCD. Las microfotografías correspondientes se recogen en las Figuras 50 a 56.

Las microfotografías de los productos obtenidos por amasado se exponen en las Figuras 50 y 51. En ambos casos, el aspecto que presentaron bajo el microscopio fue en forma de partículas de tamaño relativamente grande, constituidas por una mezcla íntima entre fármaco y CD. Las superficies de éstas presentan numerosas irregularidades, apareciendo adheridas sobre ellas otras de menor tamaño. Por contra, los sistemas elaborados por molienda, se caracterizan por estar constituidos por partículas de aristas claramente definidas y superficies lisas, prácticamente sin adhesión de otras más pequeñas. Estos resultados se atribuyen a la propia técnica de elaboración, ya que las partículas se han obtenido por fricción del producto sobre las paredes del molino. A modo de ejemplo, la Figura 52 recoge la microfotografía correspondiente al sistema gliclazida- β -CD.

Los productos elaborados por atomización se presentan como partículas más o menos esféricas, huecas, de pequeño tamaño (1-10 μm) y aspecto homogéneo, donde resulta imposible también distinguir entre ambos componentes. Las microfotografías de dichos sistemas se recogen en las Figuras 53 y 54.

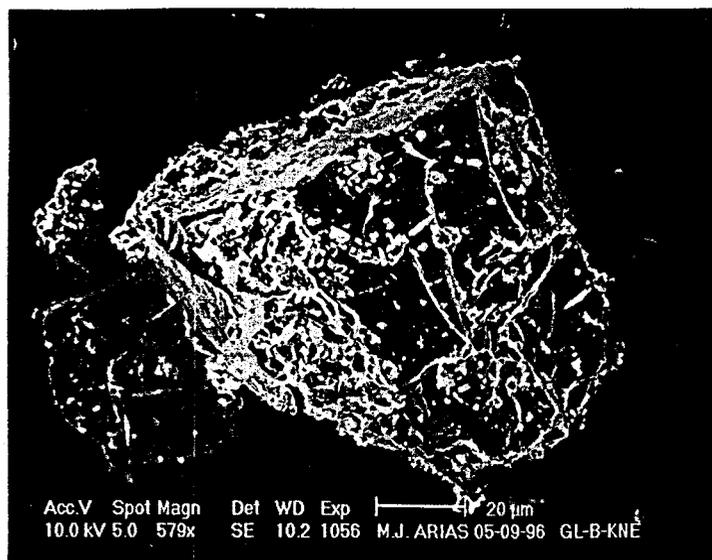


Figura 50. Microfotografía por SEM correspondiente al sistema gliclazida-β-CD amasado.

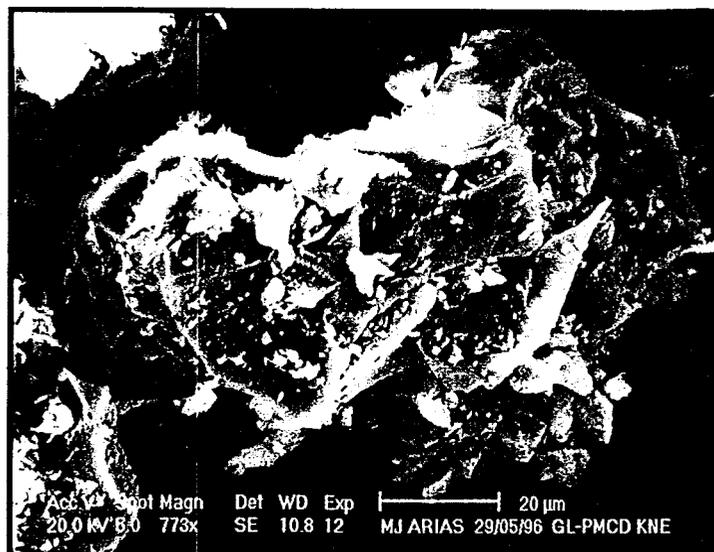


Figura 51. Microfotografía por SEM correspondiente al sistema gliclazida-PMCD amasado.

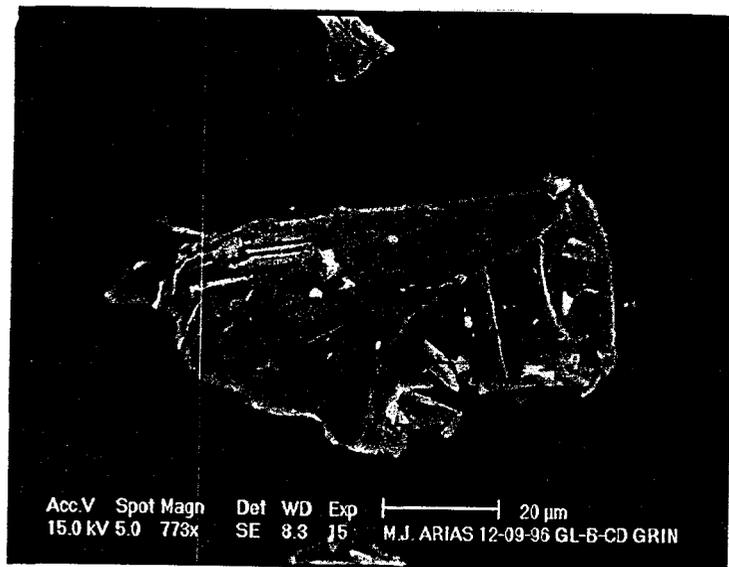


Figura 52. Microfotografía por SEM correspondiente al sistema gliclazida- β -CD molido.

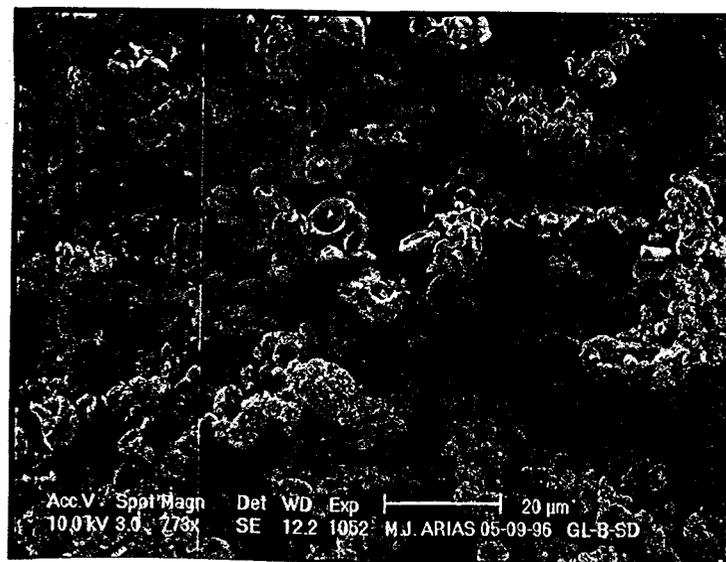


Figura 53. Microfotografía por SEM correspondiente al sistema gliclazida- β -CD atomizado.

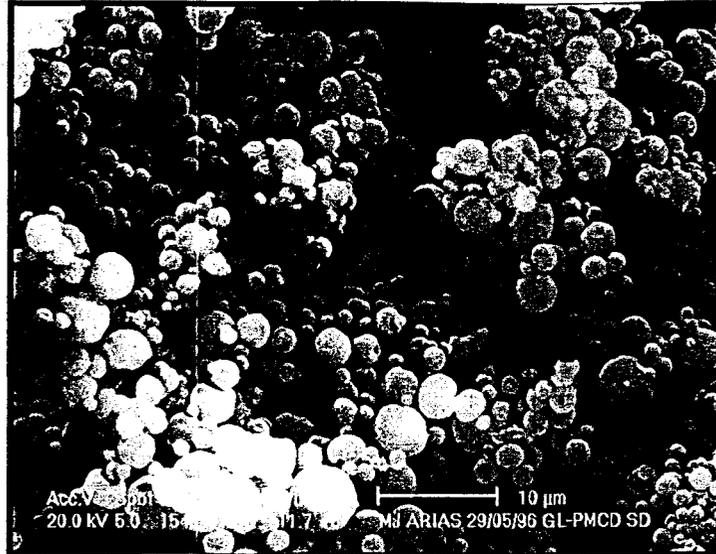


Figura 54. Microfotografía por SEM correspondiente al sistema gliclazida-PMCD atomizado.

Respecto al sistema obtenido por coprecipitación con la β -CD (Figura 55), cabe comentar que dicho producto se mostró en forma de aglomerados de forma irregular, constituidos por cristales aciculares de muy pequeño tamaño. El tamaño de estos aglomerados es variable, siendo su naturaleza muy diferente a la de los productos de partida.

Por último, los sistemas elaborados mediante neutralizado (Figura 56) se caracterizaron por la presencia de partículas de tamaño variable. El estudio de la superficie de las partículas de mayor tamaño reveló que éstas se hallaban constituidas por una aglomeración de cristales diminutos.

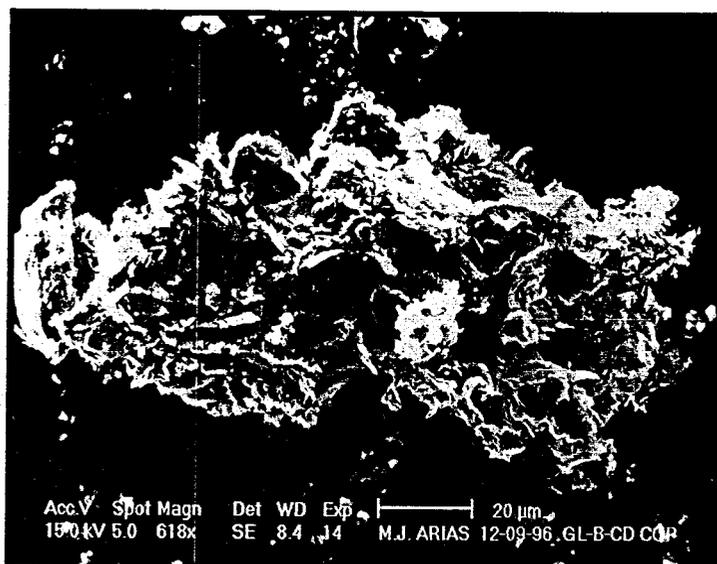


Figura 55. Microfotografía por SEM correspondiente al sistema gliclazida- β -CD coprecipitado.

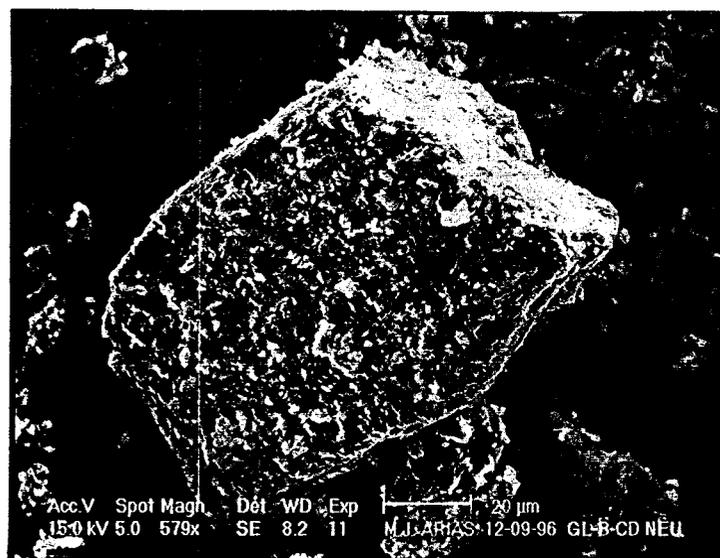


Figura 56. Microfotografía por SEM correspondiente al sistema gliclazida- β -CD neutralizado.

3.2.2.2. Estudio Térmico

3.2.2.2.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

En las Figuras 57 a 60 se recogen los termogramas por DSC correspondientes a los sistemas binarios gliclazida-CD, junto con las sustancias de partida. La evaluación térmica de dichos termogramas se recoge en la Tabla X. De igual modo, se ha realizado el cálculo de la fracción amorfa presente en las diferentes muestras, mediante una expresión similar a la del estudio del fármaco puro:

$$\% \text{ Amorfo} = \frac{\Delta H_f \text{ muestra}}{\Delta H_f \text{ m.f.}} \cdot 100$$

donde $\Delta H_f \text{ m.f.}$ corresponde a la entalpía de fusión observada para la mezcla física correspondiente a cada sistema. Sin embargo, es necesario señalar la limitación de dicha expresión, que presupone que toda variación del valor de ΔH_f viene dada exclusivamente por un proceso de amorfización, cuando en realidad existen otros factores igualmente influyentes, tales como complejación o dispersión del fármaco en el seno del vehículo. Esta cuestión será tratada en cada caso particular.

Inicialmente, y considerando que en las simples mezclas físicas de los componentes puros no existiera ningún tipo de interacción, cabría esperar que sus termogramas se correspondieran con la superposición de los termogramas de los productos de partida. Sin embargo, se detectan algunas modificaciones, de las cuales procedemos a comentar las más significativas. Así, en el caso del termograma de la mezcla física elaborada con β -CD se aprecia como efecto más llamativo un aumento del pico endotérmico correspondiente a la transición sólido-sólido respecto a la CD comercial. Este fenómeno puede explicarse si tenemos en cuenta la fusión previa de la gliclazida en el seno de la CD, que se produce alrededor de los 165 °C. Dicha fusión conduciría a la existencia de un líquido en la mezcla, lo que aumentaría la conductividad térmica del sistema, por lo que el intercambio de calor durante la transición térmica sería más fácilmente detectado por el aparato, lo que se traduciría en una mayor intensidad del pico.

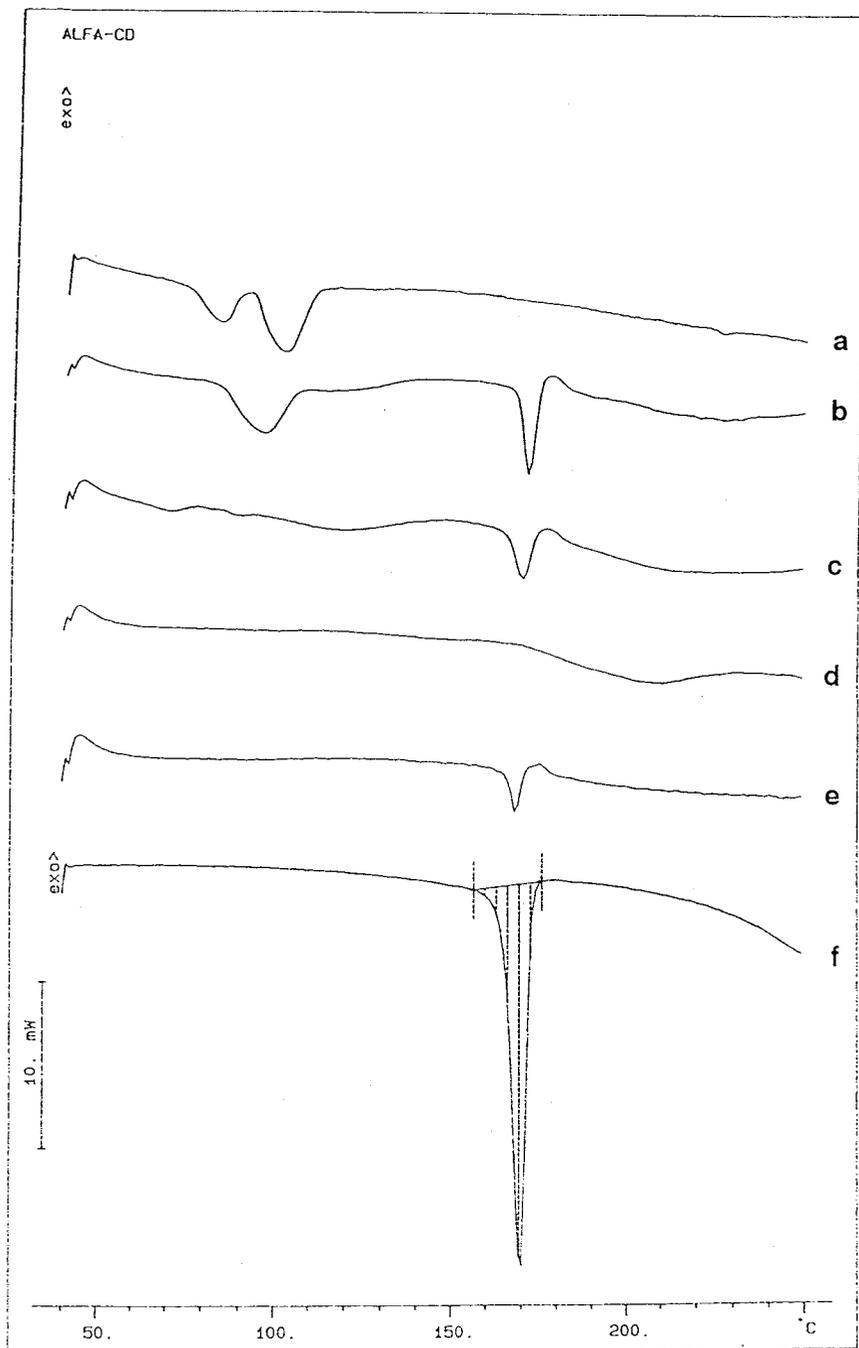


Figura 57. Termogramas por DSC correspondientes al sistema gliclazida- α -CD: (a) α -CD, (b) mezcla física, (c) amasado, (d) molido, (e) atomizado y (f) gliclazida.

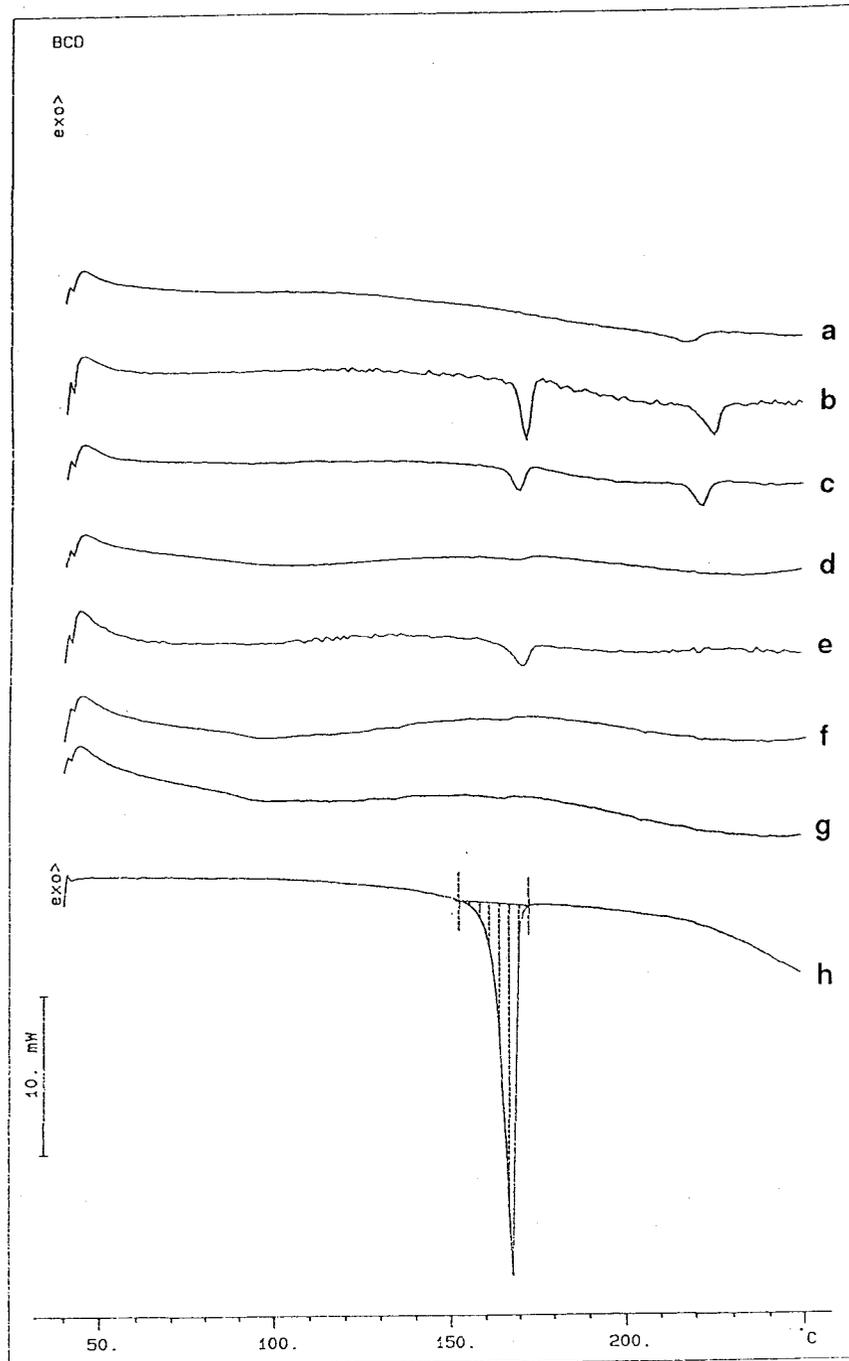


Figura 58. Termogramas por DSC correspondientes al sistema gliclazida- β -CD: (a) β -CD, (b) mezcla física, (c) amasado, (d) molido, (e) atomizado, (f) coprecipitado, (g) neutralizado y (h) gliclazida.

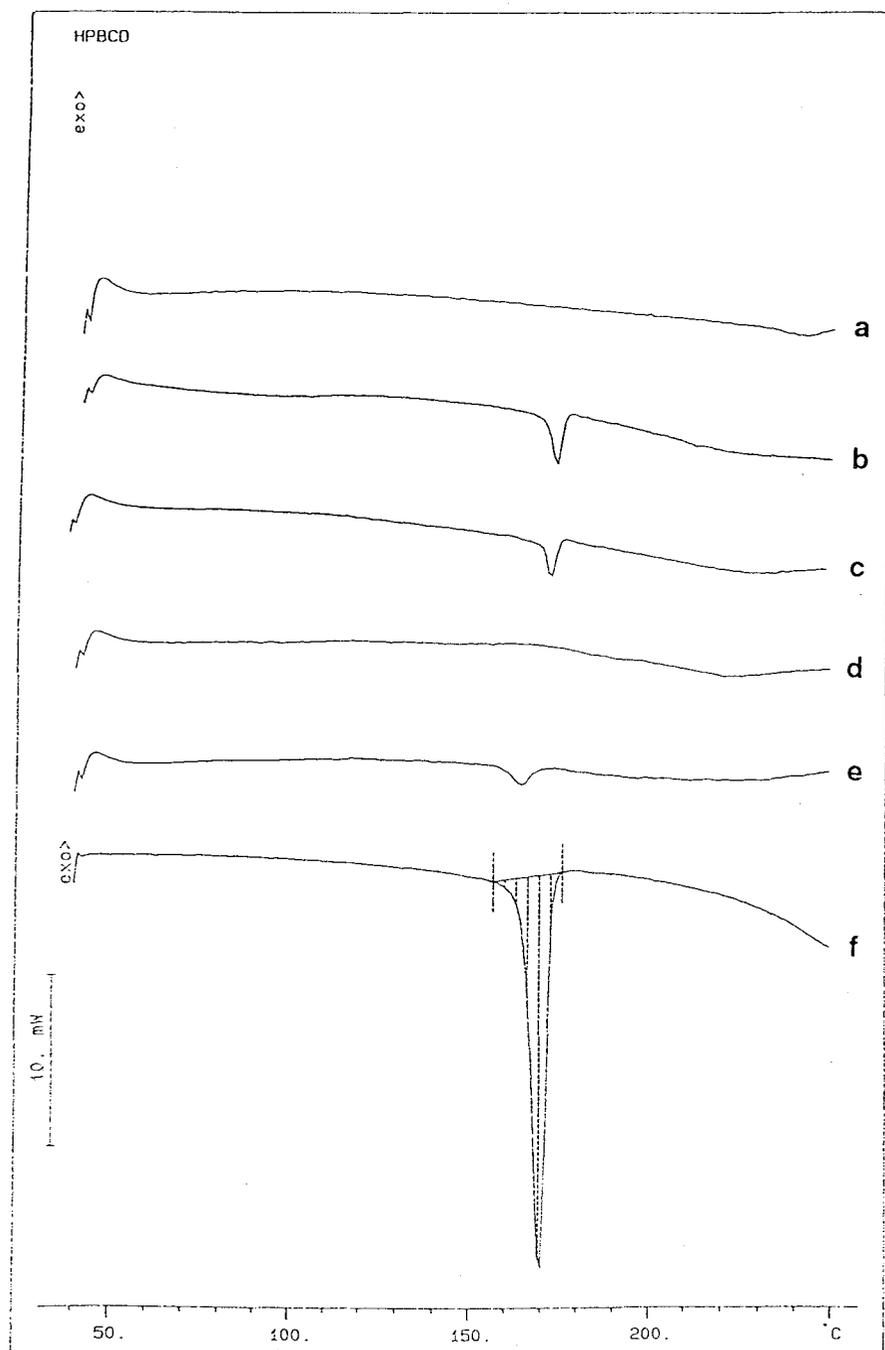


Figura 59. Termogramas por DSC correspondientes al sistema gliclazida-HP- β -CD: (a) HP- β -CD, (b) mezcla física, (c) amasado, (d) molido, (e) atomizado y (f) gliclazida.

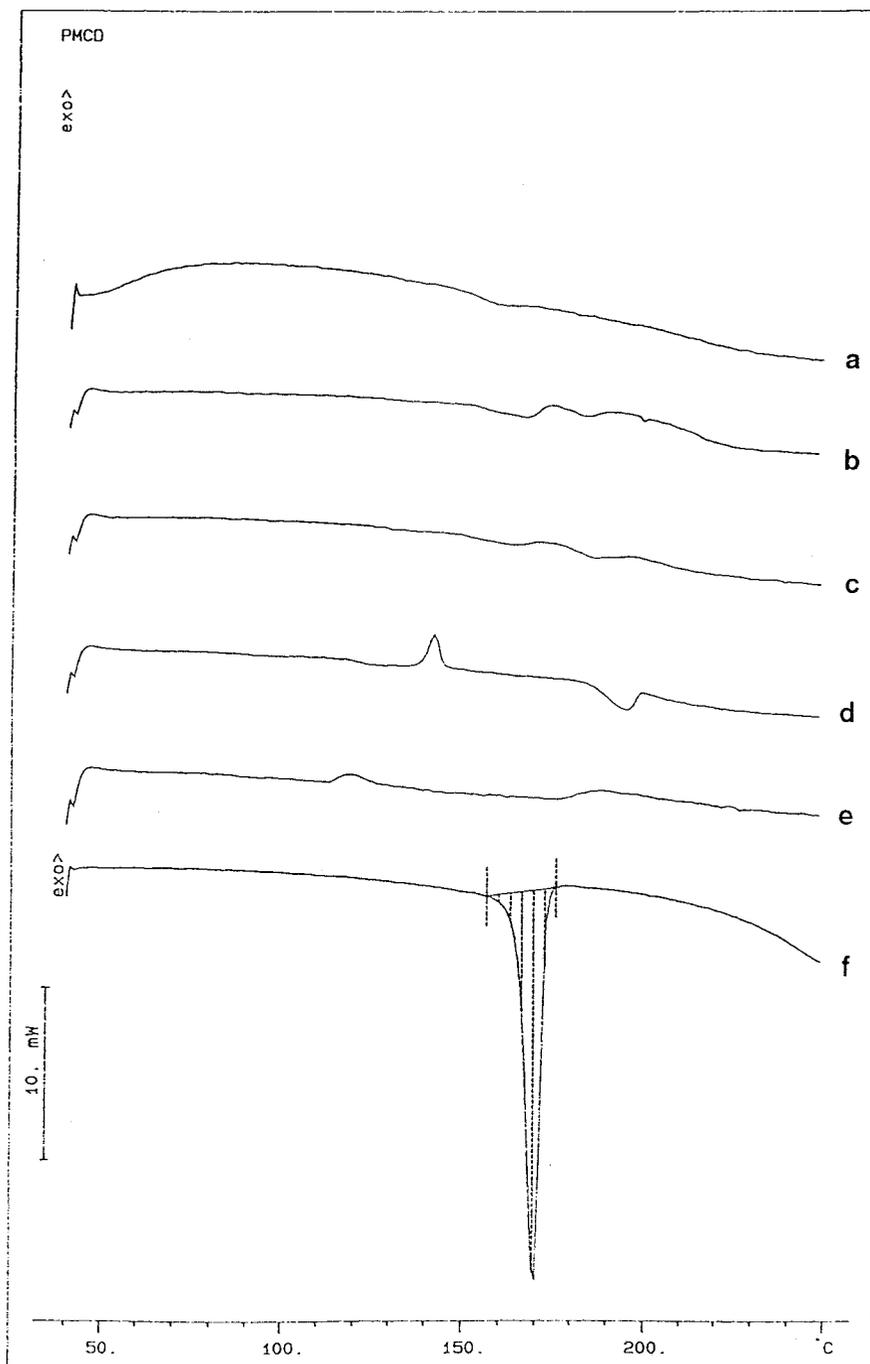


Figura 60. Termogramas por DSC correspondientes al sistema gliclazida-PMCD: (a) PMCD, (b) mezcla física, (c) amasado, (d) molido, (e) atomizado y (f) gliclazida.

Sistema	Método de Elaboración	PF (°C)	ΔH_f (J/g)	% Amorfo
α -CD	Mezcla Física	170.7	18.5	-
	Amasado	169.8	13.6	26.5
	Molido	167.9	15.3	17.3
	Atomizado	-	-	100
β -CD	Mezcla Física	169.8	12.1	-
	Amasado	168.9	7.0	42.1
	Molido	-	-	100
	Atomizado	170.0	7.2	40.0
	Coprecipitado	-	-	100
	Neutralizado	-	-	100
HP- β -CD	Mezcla Física	173.9	12.2	-
	Amasado	170.8	8.6	28.3
	Molido	-	-	100
	Atomizado	164.0	6.9	43.4
PMCD	Mezcla Física	-	-	-
	Amasado	-	-	-
	Molido	-	-	100
	Atomizado	-	-	100
Gliclazida	Sin precalentamiento	169.1	120.9	-
	Con precalentamiento	169.4	121.0	-

Tabla X. Evaluación térmica de los diferentes sistemas binarios gliclazida-CD (PF: punto de fusión; ΔH_f : entalpía de fusión).

Por otra parte, resulta patente como en todas las mezclas físicas, con excepción de la PMCD, se detecta claramente una endoterma de fusión alrededor de los 165 °C, que podemos asignar a la fusión de la gliclazida. En el caso de la mezcla física elaborada con la PMCD, dicho pico se encuentra muy ensanchado y atenuado. La ausencia del pico agudo de fusión del fármaco podría ser atribuida a un proceso de complejación de la gliclazida en la cavidad de la CD durante el proceso de calentamiento. Dicha hipótesis se encuentra avalada por las investigaciones de diversos autores, que señalan la posibilidad de obtención de complejos de inclusión mediante calentamiento de una mezcla de fármaco y CD en un contenedor sellado [Nakai *et al.*, 1987]. Sin embargo, los estudios complementarios mediante microscopía de platina caliente, mostraron que la PMCD experimenta un proceso de fusión en el intervalo de temperaturas comprendido entre los 160 y 180 °C, por lo que la fusión simultánea de ambos componentes podría ser la causa del ancho efecto endotérmico detectado en el termograma.

Resulta interesante señalar la importante reducción en los valores de ΔH_f que se observa para algunos sistemas tras su amasado, en especial para el sistema gliclazida- β -CD (de 12.1 J/g en la mezcla física a 7.0 J/g en el producto amasado). Este hecho puede atribuirse a un proceso de complejación parcial del fármaco en la cavidad de la CD durante el amasado o alternativamente, a la amorfización parcial del fármaco durante dicho tratamiento. La veracidad de dicha hipótesis será tratada en las secciones de XRD y espectroscopía de IR. Por otra parte, el producto obtenido por amasado presentó un comportamiento análogo a la mezcla física, no siendo posible en ninguno de los dos casos la cuantificación del valor de ΔH_f del fármaco, al hallarse enmascarado dicho proceso por la fusión de la CD.

Respecto a los sistemas elaborados por molienda, en todos los casos, se produce una desaparición total del pico de fusión del fármaco. Este fenómeno, en ausencia de información adicional, podría ser atribuido en principio a la complejación efectiva del fármaco en el interior de la cavidad de la CD. Sin embargo, hemos de tener en cuenta, según antecedentes bibliográficos [Lin y Lee, 1989; Arias *et al.*, 1996], que la aplicación de esta técnica de procesado suele conducir con facilidad a un fenómeno de amorfización y/o dispersión del fármaco en el seno del vehículo que lo contiene, en este caso la CD, situación que podría traducirse en la desaparición del pico de fusión del correspondiente termograma.

Continuando con el estudio del sistema gliclazida-PMCD obtenido por molienda, resulta llamativa la presencia de un intenso pico exotérmico situado a 142.1 °C ($\Delta H_f = 8.6$ J/g). Resultados similares han sido encontrados por otros autores al utilizar esta técnica de procesado [Ahmed *et al.*, 1990; Hanawa *et al.*, 1993], habiendo sido atribuidos a procesos de recristalización del producto amorfo. Dado que dicho fenómeno no se produce en las materias primas, fármaco y CD, cuando ambas son sometidas al proceso de molienda, podemos asignar dicho efecto, en concordancia con dichos autores, a la recristalización del complejo amorfo, que se formaría durante el proceso de molienda. Una vez recristalizado dicho complejo, su fusión se produce a 194.9 °C, proceso que se registra en el termograma como un efecto endotérmico ($\Delta H_f = 10.5$ J/g). Este punto se ampliará en la sección de espectroscopía de IR, con objeto de confirmar la veracidad de nuestras hipótesis.

Respecto a los termogramas por DSC de los productos preparados por atomización se producen dos tipos de comportamiento. Así, en el caso de los sistemas elaborados con α -, β - e HP- β -CDs, se observa la permanencia del pico de fusión del fármaco, aunque con una menor ΔH_f que las correspondientes mezclas físicas, lo que podría ser debido, como ya hemos señalado, a una posible complejación parcial del fármaco con la CD, entre otras causas. De todos ellos, el sistema elaborado con α -CD es el que presenta una menor reducción en la entalpía del pico de fusión, lo que se puede interpretar como un bajo grado de complejación del fármaco en la cavidad de la CD, debido su mala adecuación en dicha cavidad. Estos resultados se correlacionan con el bajo valor de K_c que presenta la gliclazida con la α -CD en solución, determinado en apartados anteriores (ver página 86).

En el caso del producto atomizado elaborado con β -CD, es importante destacar la desaparición del efecto endotérmico que aparecía a 220 °C en la β -CD pura, mezcla física y amasado, lo que indica que dicha técnica conduce a una amorfización parcial del sistema, suficiente para producir la desaparición de la endoterma correspondiente a la transición sólido-sólido de la β -CD, como han confirmado los resultados obtenidos por XRD.

Por otra parte, en el sistema elaborado con PMCD se produce la desaparición total del pico de fusión de la gliclazida. En principio, esta situación podría ser debida simplemente a la amorfización del fármaco durante el proceso de atomizado, pero dado que este fenómeno no se produce en el termograma correspondiente a la gliclazida comercial sometida a atomizado, debemos descartar esta hipótesis. Por contra, parece más acertado

suponer que la desaparición del pico de fusión del fármaco sea debida a su complejación en la cavidad de la CD. Esta última situación queda corroborada por la aparición de un pequeño efecto exotérmico alrededor de los 120 °C y $\Delta H_f = 5.7 \text{ J/g}$, el cual puede ser atribuido a la recristalización del compuesto de inclusión en estado amorfo. En este sentido, situaciones similares se han observado previamente en sistemas elaborados con CDs metiladas y otros fármacos [Moyano *et al.*, 1996b; El-Gendy *et al.*, 1993].

Resultados similares se obtienen para los sistemas obtenidos mediante coprecipitación y neutralizado con β -CD, y que podemos interpretar de forma similar como la complejación de la gliclazida en la cavidad de la CD.

Para finalizar este apartado, podemos concluir que aunque muchos autores consideran que la desaparición del pico del fármaco en el termograma por DSC confirmaría el proceso de complejación [Hassan *et al.*, 1990; Jayachandra-Babu y Pandit, 1995], como ya hemos señalado, esta situación puede ser debida igualmente a otras causas. Por este motivo, para poder obtener resultados verdaderamente concluyentes respecto a la complejación en estado sólido, los estudios por DSC han de ser complementados por otras técnicas de caracterización, tales como la espectroscopía de IR o la XRD.

3.2.2.2.2. Termogravimetría (TG)

En la Figura 61 se recoge el termograma por TG correspondiente al compuesto de inclusión obtenido por coprecipitación.

El estudio del coprecipitado reveló una pérdida de peso de tipo exponencial, siendo la pérdida de peso hasta el punto de inflexión, situado sobre los 108 °C, de un 4.76 %, asignable a la pérdida del agua de hidratación del fármaco, seguida de una pérdida del 1.77 % en el resto del tramo. Este hecho parece estar relacionado con una pérdida gradual de moléculas de agua más fuertemente ligadas a la estructura cristalina del complejo. Asimismo, hemos de señalar que alrededor de los 170 °C, temperatura de fusión del fármaco, no se detectó pérdida significativa de peso de la muestra. Si tenemos en cuenta que los resultados mediante TG cuando se encuentra presente fármaco libre mostraron una pérdida de peso del orden del 11 %, podemos concluir que nuestra muestra se trata de un verdadero complejo de inclusión, donde no existe fármaco en forma libre.

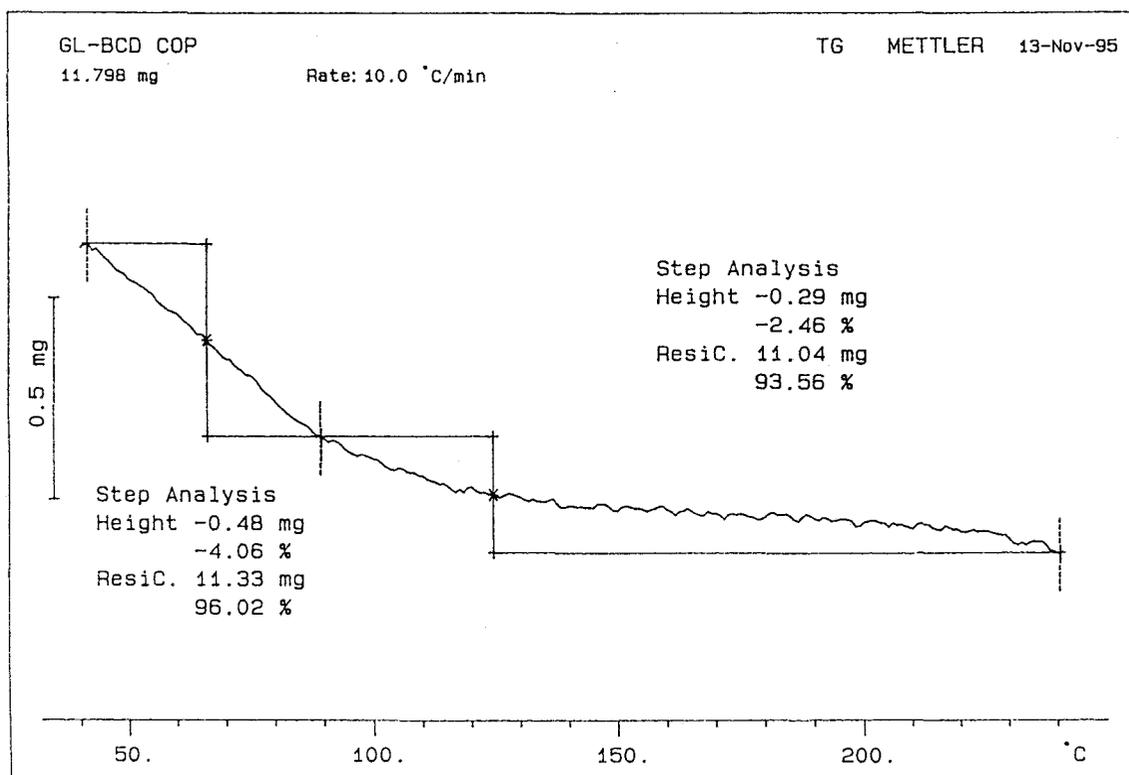


Figura 61. Termograma por TG correspondiente al coprecipitado gliclazida- β -CD.

3.2.2.2.3. Termomicroscopía (HSM)

Aunque la utilización del HSM en el campo de las inclusiones con CDs está bastante limitada, puede resultar una técnica de utilidad, en especial para completar la información obtenida mediante DSC. Cabe esperar que los verdaderos compuestos de inclusión presenten un único efecto de fusión, tras el cual se obtenga un fluido homogéneo constituido por una sola fase correspondiente a la fusión de dicho complejo. Por contra, en una simple mezcla física cabe esperar que tras la fusión del componente de menor punto de fusión, se obtenga un sistema bifásico, donde la fracción de mayor punto de fusión permanece aún en estado sólido.

En general, cuando el principio activo presenta un menor punto de fusión que la CD, como ocurre en nuestro caso, puede resultar difícil detectar la presencia de fusión visualmente, puesto que el porcentaje de fármaco en el compuesto de inclusión suele ser minoritario, por lo que el ensayo se debe realizar con gran minuciosidad. En nuestro caso y dada la especial particularidad de nuestro fármaco de presentar un fuerte fenómeno de

volatilización una vez fundido, podemos utilizar como criterio a la hora de confirmar el proceso de complejación la aparición o no de productos volatilizados.

El estudio de las mezclas físicas reveló que aunque inicialmente no era fácil diferenciar ambos componentes en el sistema, alrededor de los 170 °C se producía un primer efecto térmico correspondiente a la fusión del componente de menor punto de fusión, en este caso nuestro fármaco, acompañado de un proceso de volatilización.

Particularmente interesante resulta el comportamiento térmico de la mezcla física del fármaco con la PMCD, ya que ésta es la única CD que comienza a fundir a una temperatura inferior a la de la gliclazida pura. En efecto, cuando la mezcla física (Figura 62) se ve sometida al proceso de calentamiento, la fusión de la CD no se produce de forma homogénea sino que las diferentes partículas funden en el intervalo de temperaturas comprendido entre 155 y 200 °C (Figuras 63 a 66). Esto es debido a que dicha CD no es un compuesto puro, sino una mezcla de productos con diferente grado de metilación.

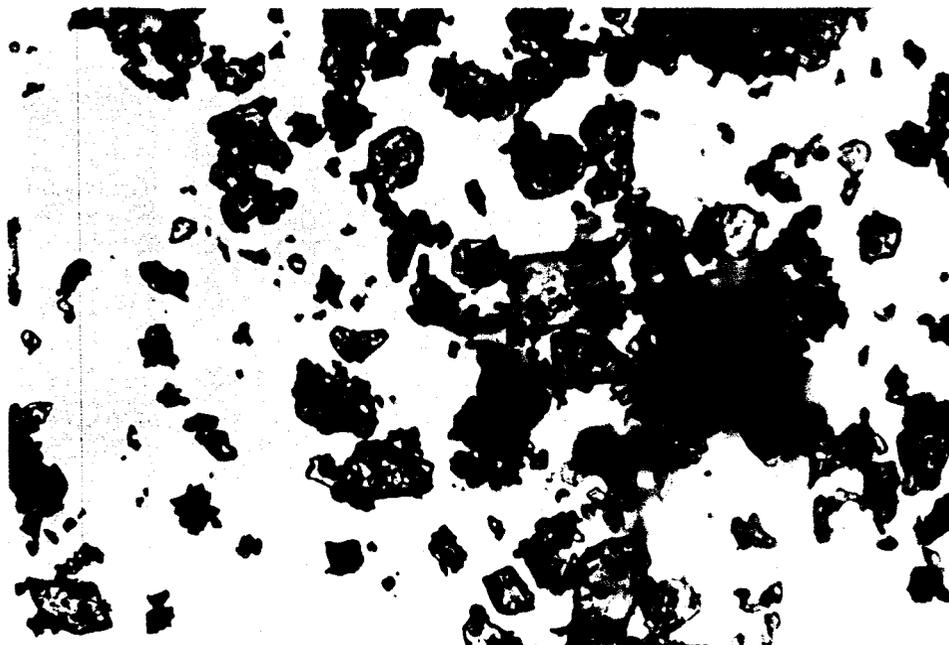


Figura 62. Fotografía mediante HSM correspondiente a la mezcla física gliclazida-PMCD (temperatura ambiente).

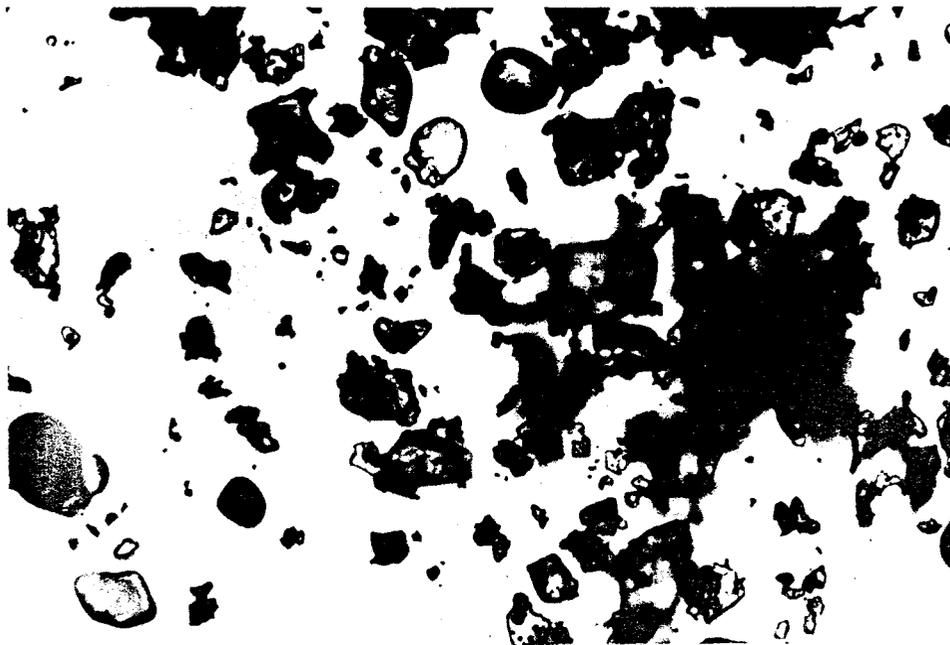


Figura 63. Fotografía mediante HSM correspondiente a la mezcla física gliclazida-PMCD (140 °C).

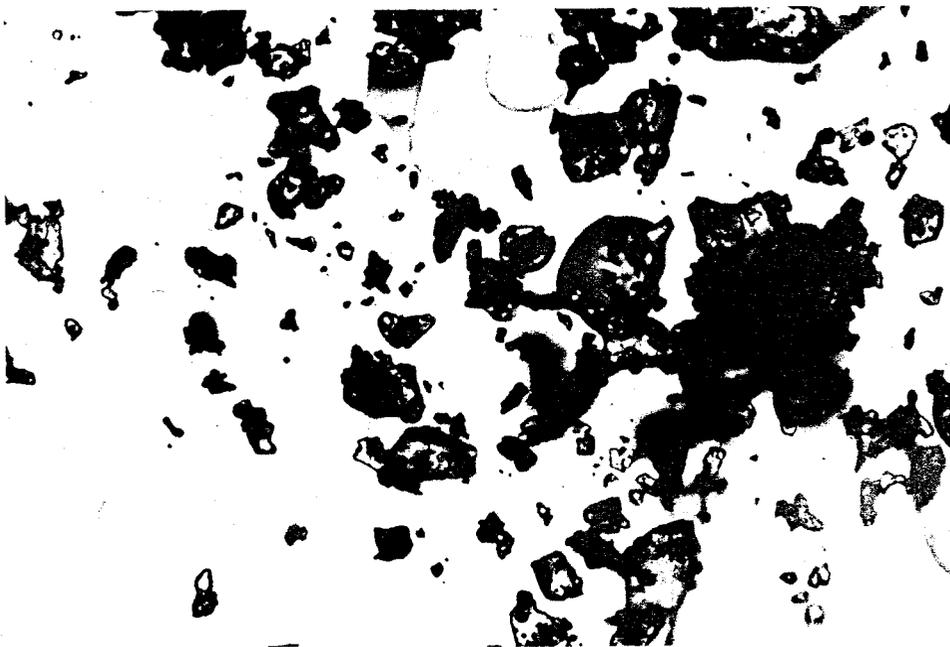


Figura 64. Fotografía mediante HSM correspondiente a la mezcla física gliclazida-PMCD (160 °C).

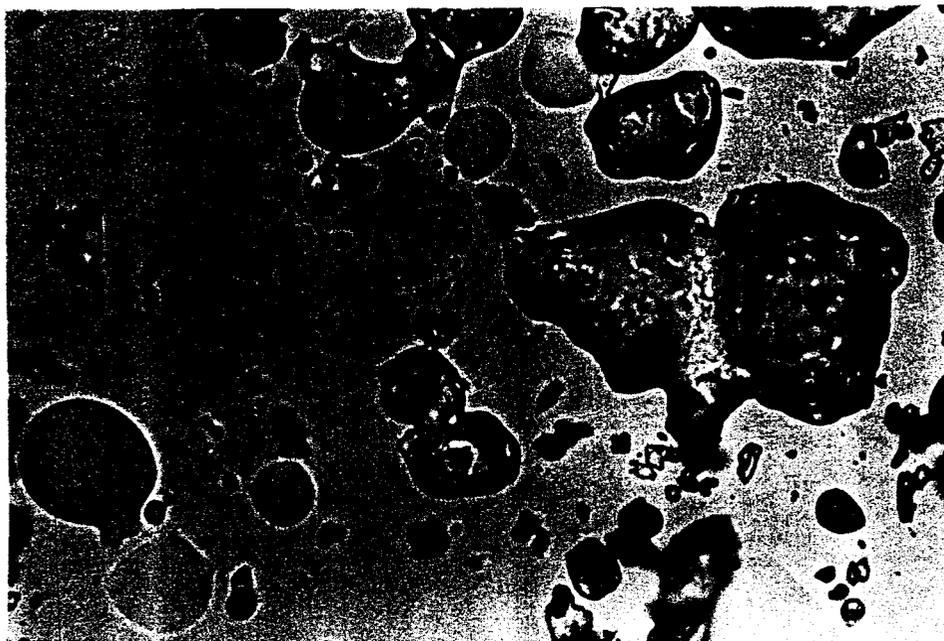


Figura 65. Fotografía mediante HSM correspondiente a la mezcla física gliclazida-PMCD (180 °C).

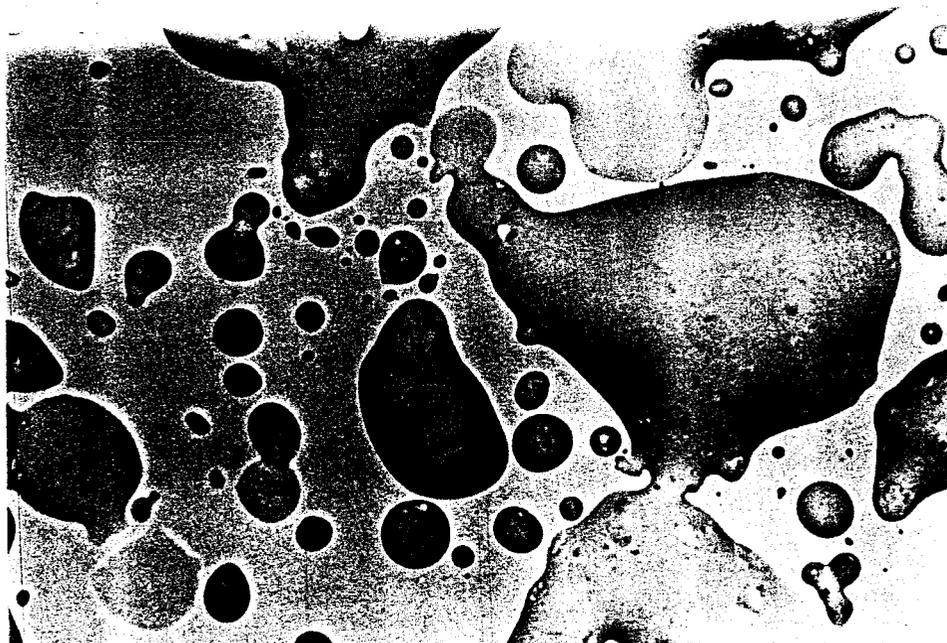


Figura 66. Fotografía mediante HSM correspondiente a la mezcla física gliclazida-PMCD (200 °C).

Este amplio proceso de fusión, durante el que se produce conjuntamente la fusión del fármaco, explicaría los diferentes efectos endotérmicos registrados en el termograma por DSC de esta mezcla física entre los 150 y 200 °C, en lugar del agudo pico endotérmico que se registra en las mezclas físicas con el resto de las CDs.

Los resultados obtenidos en cuanto al comportamiento térmico de las muestras elaboradas mediante las diferentes técnicas de procesado, permite hacer una clara diferenciación. Así, por un lado, tenemos sistemas en los que prácticamente no existe complejación, como es el caso de los sistemas elaborados mediante la técnica de amasado. A título de ejemplo, recogemos el estudio realizado sobre el sistema gliclazida- α -CD. En dicha muestra, a temperatura ambiente no es posible diferenciar sus dos componentes (Figura 67). Sin embargo, al ser sometidos a calentamiento, se registra un primer proceso de fusión, muy débil, alrededor de los 170 °C, que podemos asignar a la fusión de la gliclazida no complejada (Figura 68).

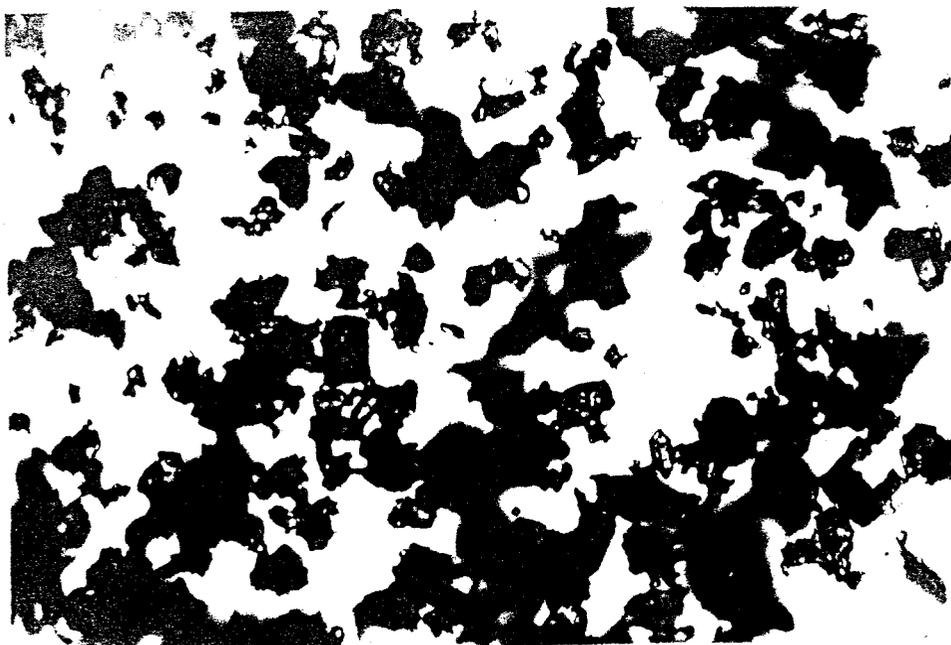


Figura 67. Fotografía mediante HSM correspondiente al sistema gliclazida- α -CD elaborado por amasado (temperatura ambiente).



Figura 68. Fotografía mediante HSM correspondiente al sistema gliclazida- α -CD elaborado por amasado (175 °C).

Dicho efecto se pone de manifiesto visualmente por la aparición de algunas vesículas de líquido. La dificultad de apreciar visualmente dicho efecto radica en la baja proporción de fármaco en estos sistemas, que no llega al 11 % p/p y que, según muestran los resultados por DSC. Por otra parte, de forma similar a como ocurría con el fármaco puro, se registra simultáneamente un proceso de oscurecimiento del campo visual, que podemos asignar a la volatilización del fármaco fundido y posterior solidificación en el portaobjetos superior de la platina (Figura 69). Si retiramos dicho portaobjetos, el campo de visión aparece perfectamente nítido, permitiéndonos visualizar las vesículas de fármaco fundido y por tanto no complejado.

Por otra parte, existen sistemas en los que la complejación del fármaco se produce en una elevada proporción, casi por completo. Dichos sistemas, al ser sometidos a calentamiento, no presentan ningún fenómeno visual de formación de vesículas de líquido alrededor de la temperatura de fusión del fármaco, ni oscurecimiento del campo visual. Este es el caso de la mayoría de los sistemas elaborados por molienda y atomizado, así como los

elaborados por coprecipitación y neutralización. En ellos, las partículas originales (Figura 70) se mantienen inalteradas durante todo el proceso de calentamiento hasta la fusión total del sistema, el cual se produce a elevadas temperaturas (Figura 71).

Una mención especial requiere el sistema elaborado con la PMCD por molienda (Figura 72). Aunque esta técnica no permite evidenciar la naturaleza del fenómeno exotérmico registrado por DSC alrededor de los 142 °C, si pone de manifiesto que su proceso de fusión es claramente diferente al de la simple mezcla física. Mientras que ésta experimentaba un proceso de fusión comprendido entre los 160 y 200 °C, lo que se traducía en varios fenómenos endotérmicos de carácter muy débil, la muestra obtenida por molienda presenta un fenómeno de fusión perfectamente definido entre los 190 y 193 °C (Figura 73), lo que podemos atribuir a la formación de un verdadero complejo de inclusión.

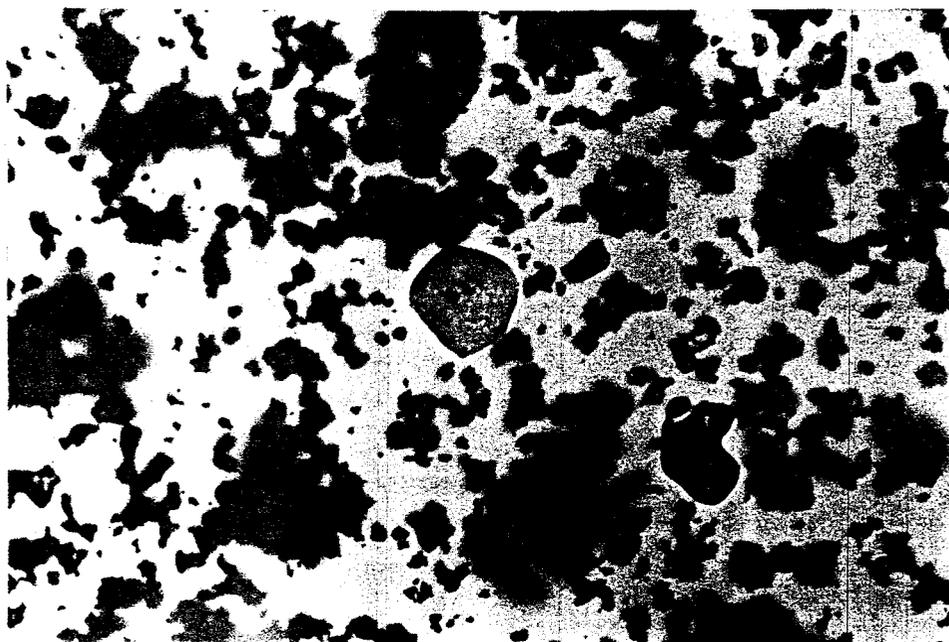


Figura 69. Fotografía mediante HSM correspondiente al sistema gliclazida- α -CD elaborado por amasado (180 °C).

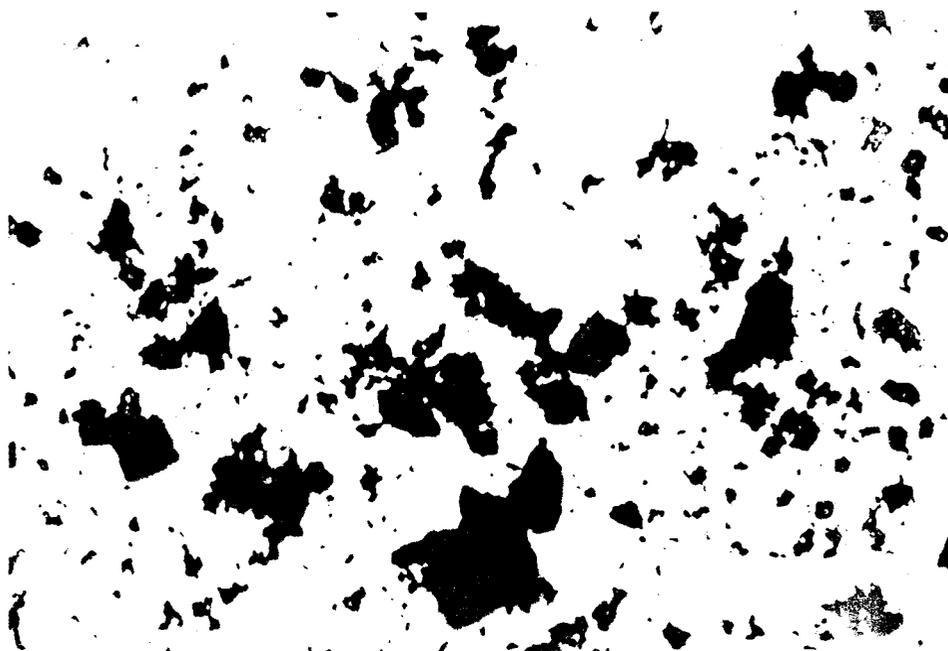


Figura 70. Fotografía mediante HSM correspondiente al sistema gliclazida-β-CD elaborado por neutralización (temperatura ambiente).

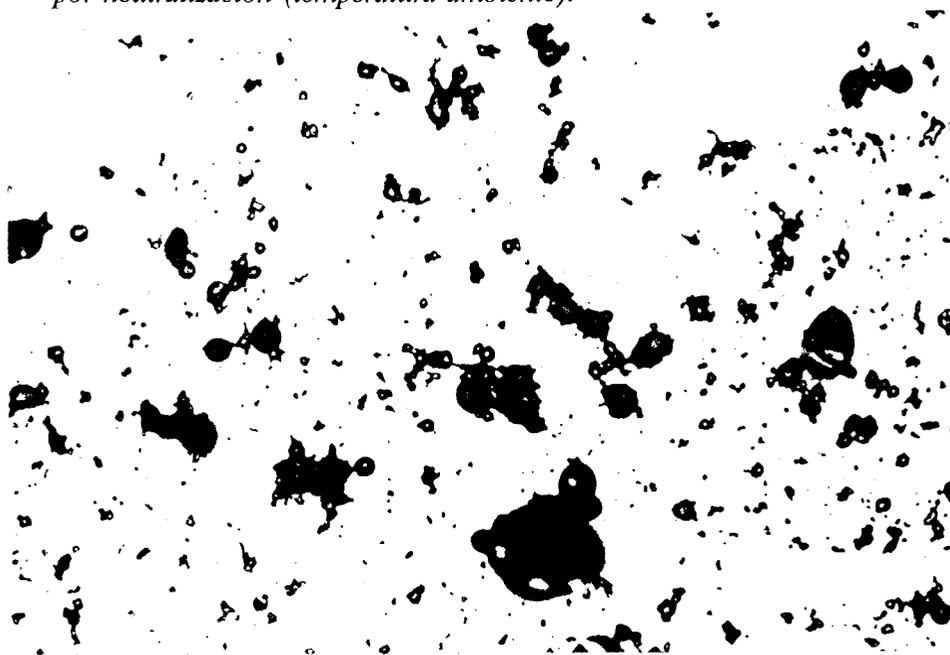


Figura 71. Fotografía mediante HSM correspondiente al sistema gliclazida-β-CD elaborado por neutralización (300 °C).

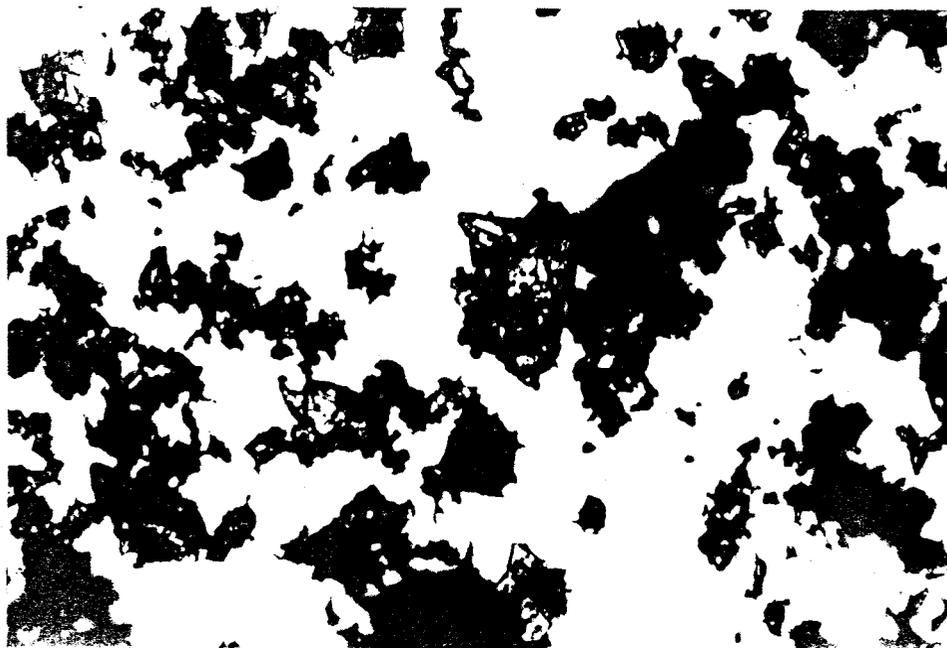


Figura 72. Fotografía mediante HSM correspondiente al sistema gliclazida-PMCD elaborado por molienda (temperatura ambiente).

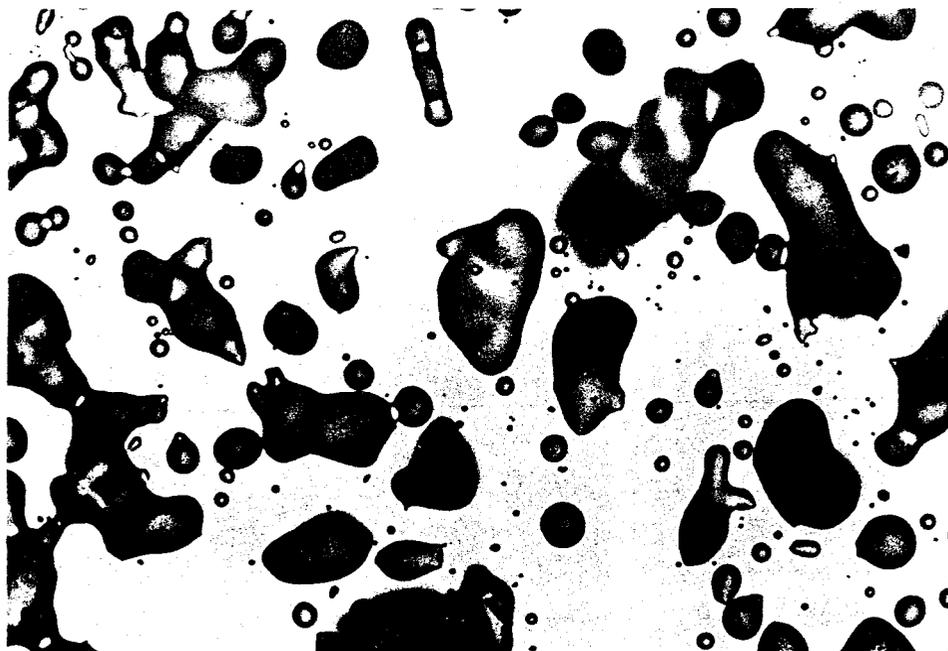


Figura 73. Fotografía mediante HSM correspondiente al sistema gliclazida-PMCD elaborado por molienda (193 °C).

3.2.2.3. Estudio Espectral

3.2.2.3.1. Espectroscopía de carbono 13 en estado sólido (CP/MAS ^{13}C RMN)

Los espectros de CP/MAS ^{13}C RMN de los componentes puros se hallan recogidos en la Figura 74. Hay que señalar que esta técnica sólo ha sido posible aplicarla para el sistema gliclazida- β -CD, puesto que fue el único donde se consiguió aislar un compuesto de inclusión cristalino en estado sólido, como veremos en la sección de XRD. En el caso de la gliclazida, se realizaron los espectros a dos velocidades de rotación (3.9 y 4.5 KHz), con objeto de identificar las señales denominadas *sidebands*, que constituyen un conjunto de bandas falsas que aparecen simétricas a las verdaderas como consecuencia de la rotación de la muestra, siendo su posición dependiente de la velocidad de rotación. De este modo, dichas bandas serán las que se hallen desplazadas en los espectros, (señaladas en la Figura 74a) mientras que aquellas bandas que mantienen su posición al modificar la velocidad de rotación corresponden a las señales verdaderas de la gliclazida.

En el caso de la β -CD (Figura 74b), la asignación de las señales es análoga a la de los espectros de ^{13}C RMN en solución. En este caso, es de señalar la multiplicidad de las señales de los diferentes carbonos, debido a que esta técnica es muy sensible a la distribución espacial de los carbonos de la CD, así como al grado de cristalinidad de la muestra, detectando la presencia de la multiplicidad de los carbonos.

Las señales de la gliclazida en los sistemas binarios se hallan enmascaradas debido a su baja proporción en los sistemas (Figura 74c). Un caso similar ha sido observado por otros autores [Acartürk *et al.*, 1993]. Asimismo, se aprecia una cierta amortización para los sistemas coprecipitado y neutralizado (Figuras 74d y 74e), en base a la disminución de la definición de las señales correspondientes a la β -CD. Este hecho se halla en concordancia con los estudios por XRD, como veremos en la siguiente sección. Por otra parte, este hecho también puede sugerir una distorsión de la estructura macrocíclica de la CD, con una variación en los valores de los ángulos diedros de los enlaces glucosídicos $\alpha \rightarrow (1, 4)$ (lo cual se halla íntimamente relacionado con las señales de los C_1 y C_4), como consecuencia del proceso de complejación. Respecto a las señales de la gliclazida, nuestro estudio reveló una modificación de las mismas para los complejos en relación con la mezcla física, indicando la existencia de un complejo en estado sólido, implicando los dos radicales del fármaco.

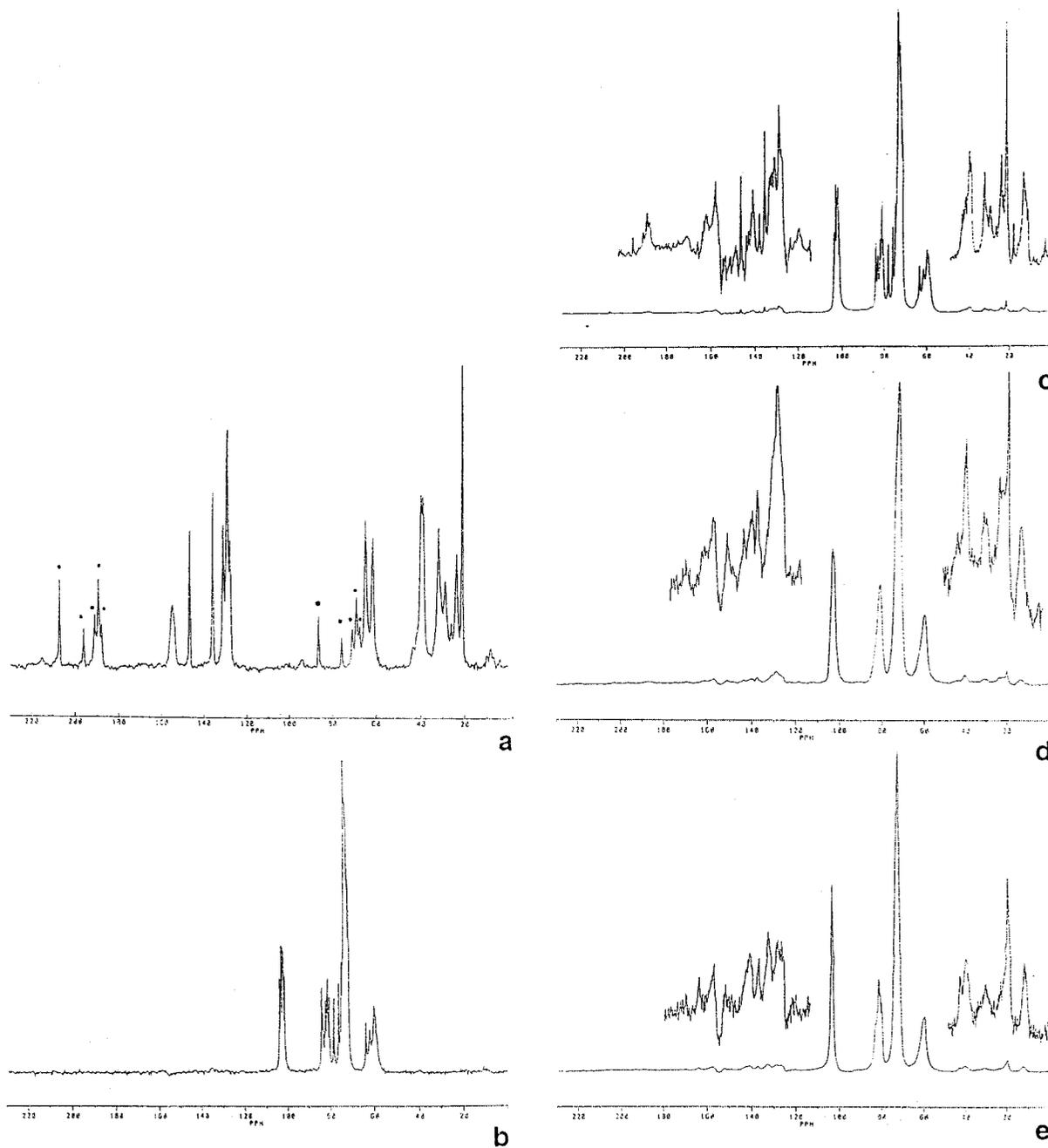


Figura 74.- Espectros de CP/MAS ^{13}C RMN correspondientes a las siguientes muestras: (a) gliclazida, (b) β -CD, (c) mezcla física, (d) coprecipitado y (f) neutralizado.

3.2.2.3.2. Difracción de Rayos X (XRD)

Los difractogramas correspondientes a los sistemas binarios de gliclazida elaborados con α -, HP- β - y PMCDs, se recogen en las Figuras 75 a 77. En todos los casos, resulta evidente que los difractogramas correspondientes a las mezclas físicas (Figuras 75 a 77a) se corresponden con la superposición de los diagramas de las materias primas, indicando de esta forma la ausencia de cualquier tipo de interacción entre las mismas.

Con respecto a los sistemas elaborados por amasado (Figuras 75 a 77b), se observa un hecho análogo, aunque con una leve reducción en la cristalinidad de los componentes, sin ningún efecto adicional, lo cual confirma una leve o nula interacción sólido-sólido entre fármaco y CD para esta técnica de elaboración. Dichas observaciones se hallan en concordancia con los estudios térmicos y de espectroscopía de IR, los cuales se tratarán en el siguiente apartado.

Por contra, los productos obtenidos por molienda y atomización mostraron en todos los casos una fuerte disminución o bien la desaparición de los picos de difracción del fármaco, presentes tanto en los difractogramas de las mezclas físicas como en los de los amasados. Este proceso se observó en mayor medida para la técnica de molienda. Estos resultados se pueden interpretar como la formación de una nueva fase sólida, o bien a la simple amorfización del fármaco, donde la presencia de CD posee un papel primordial, tal y como han señalado algunos autores [Lin y Lee, 1989]. En conjunción con los resultados obtenidos a partir de los estudios por DSC y espectroscopía de IR, los cuales se tratarán a continuación, podemos considerar la formación de un compuesto de inclusión amorfo únicamente en el caso de la PMCD, mientras que aquellos sistemas elaborados con α - e HP- β -CDs conducen a un proceso de amorfización y dispersión del fármaco en el seno de la CD.

Un estudio más específico del sistema gliclazida- β -CD se halla recogido en la Figura 78. El difractograma correspondiente a la gliclazida, como hemos visto anteriormente, muestra una serie de picos de gran intensidad, lo que es indicativo de la alta cristalinidad del fármaco de partida. Asimismo, en el caso de la β -CD se observa una gran cantidad de picos de difracción que ponen de manifiesto su conocida naturaleza cristalina.

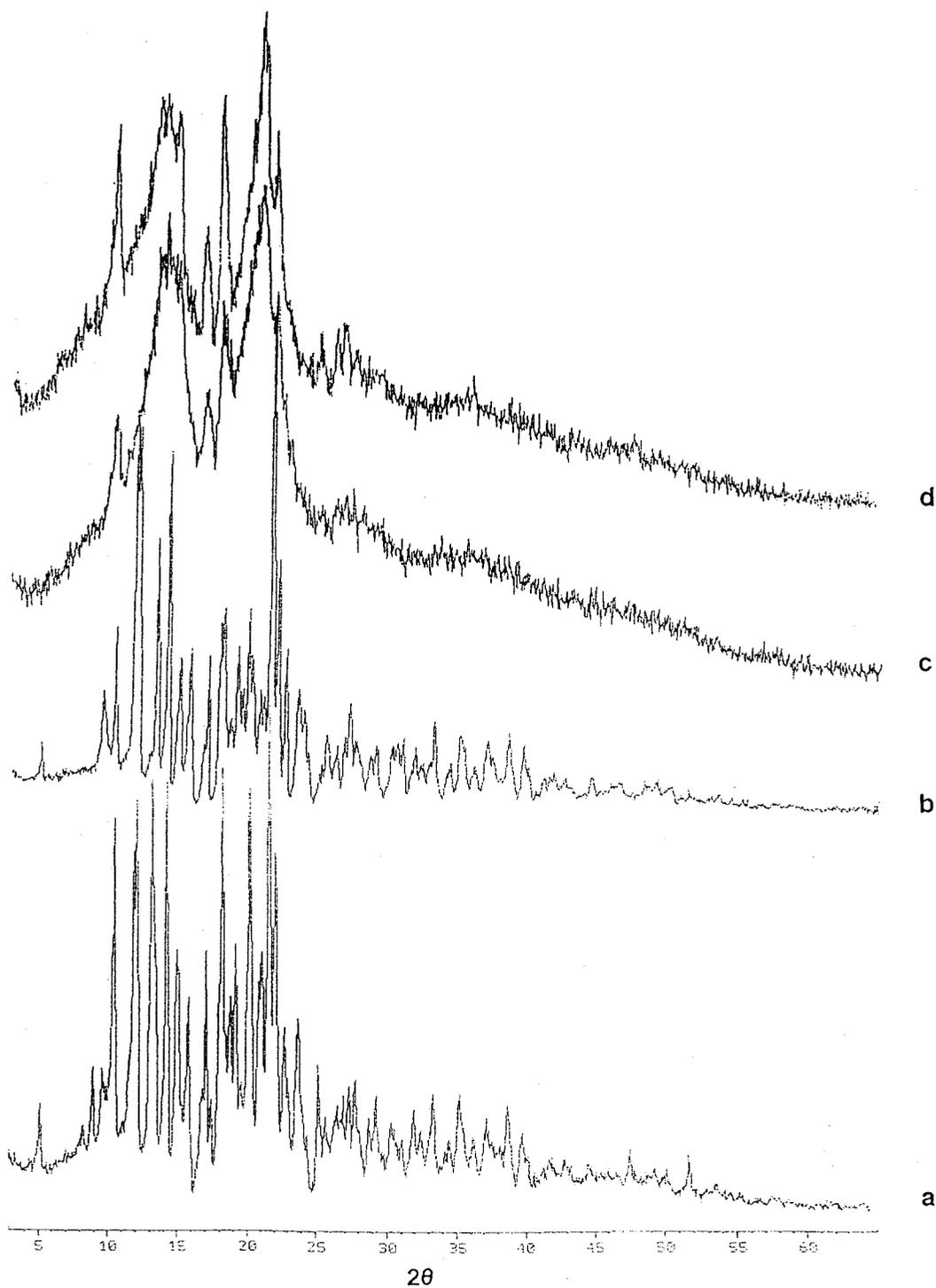


Figura 75. Difractogramas correspondientes al sistema gliclazida- α -CD: (a) mezcla física, (b) amasado, c) molido y d) atomizado.

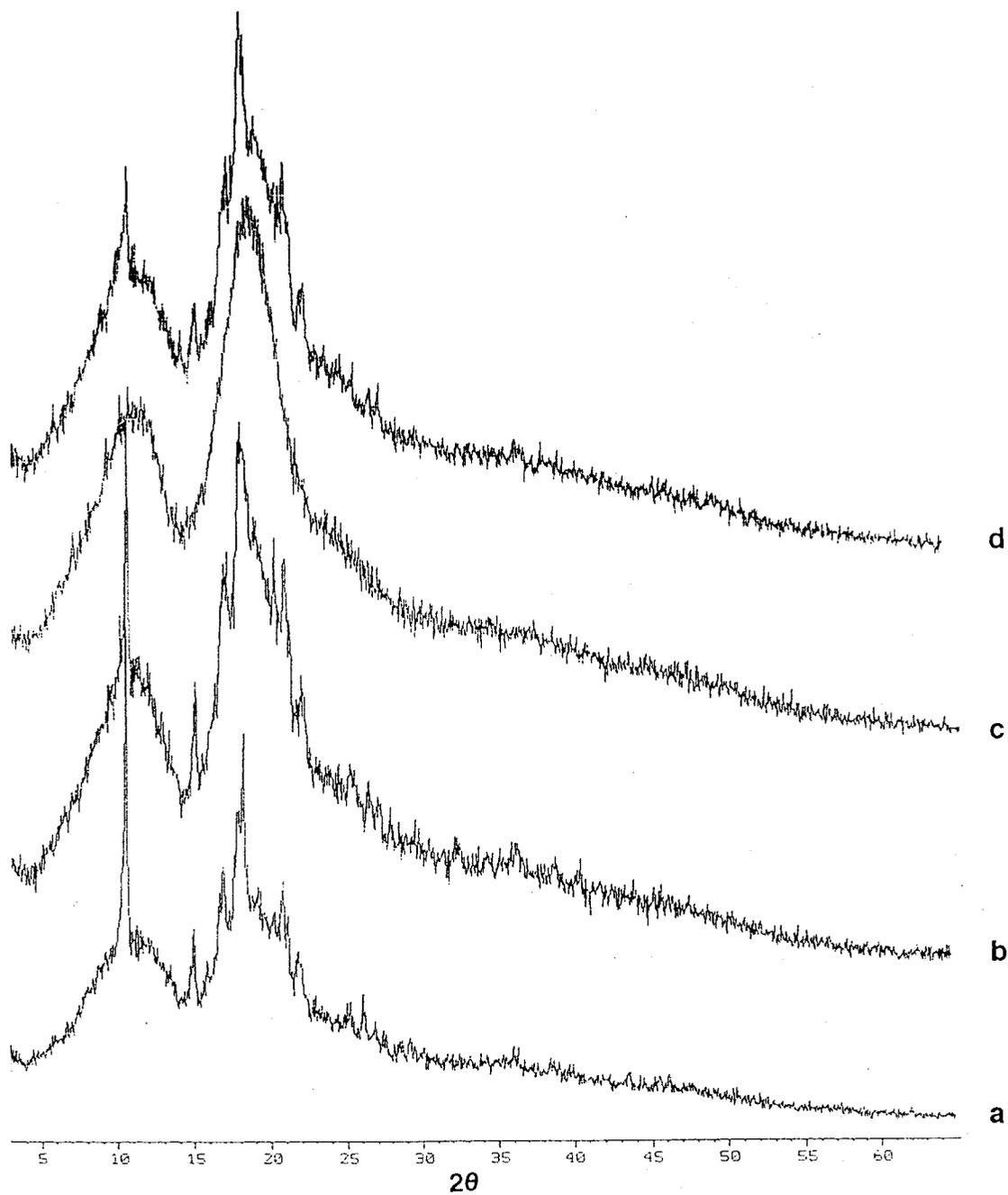


Figura 76. Difractogramas correspondientes al sistema gliclazida-HP- β -CD: a) mezcla física, (b) amasado, c) molido y d) atomizado.

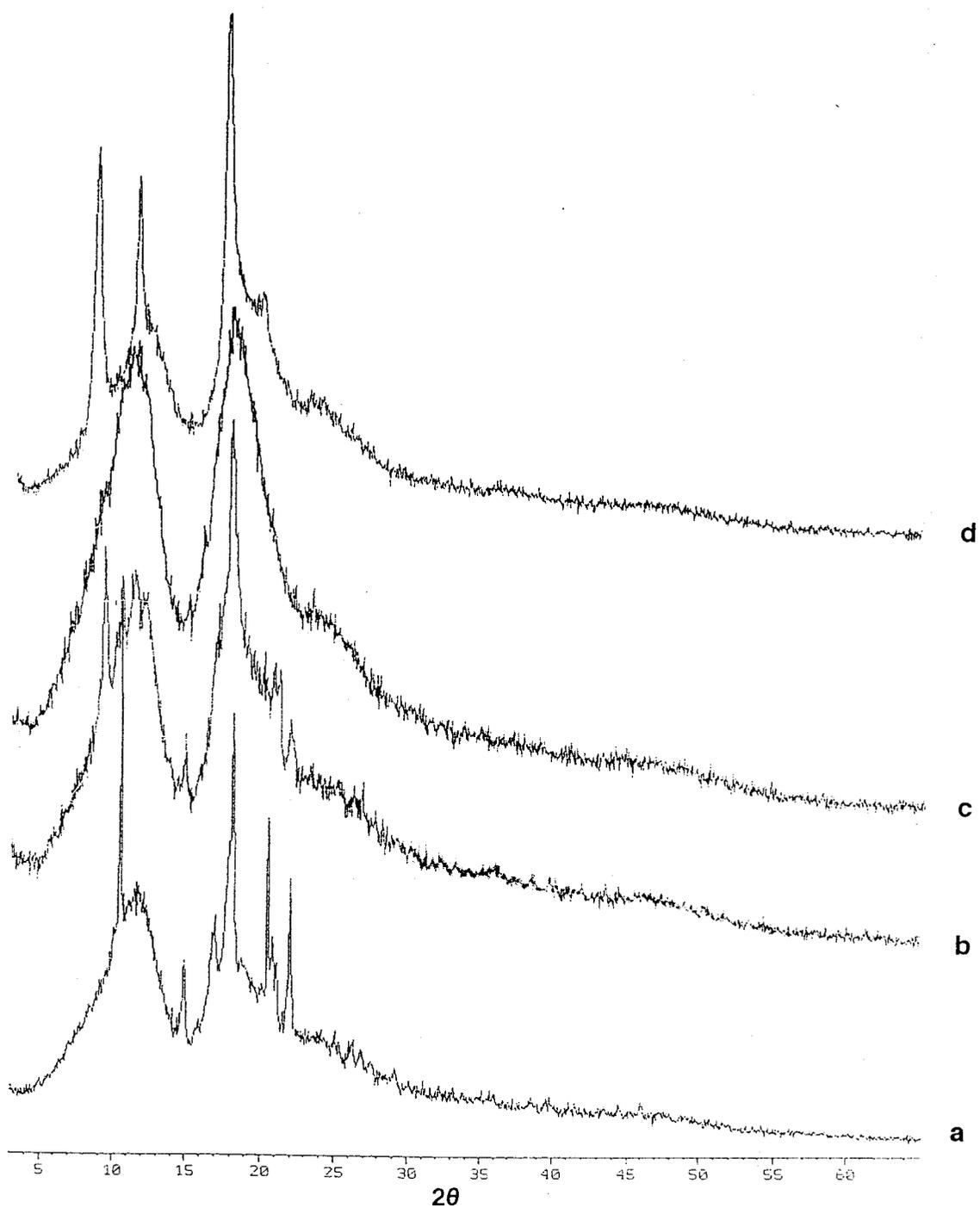


Figura 77. Difractogramas correspondientes al sistema gliclazida-PMCD: (a) mezcla física, (b) amasado, c) molido y d) atomizado.

En el caso de los espectros registrados para la mezcla física y el amasado, podemos considerar que ambos se corresponden a la superposición de los espectros de los productos puros, siendo la intensidad de los picos correspondiente a la proporción peso/peso de ambos componentes en la mezcla. En el caso del espectro del amasado, se observó una evidente disminución en la intensidad de los picos de difracción, Este hecho se halla en concordancia con la reducción en el valor de entalpía de fusión con respecto a la mezcla física, como ya se trató en la sección de DSC.

En cuanto al estudio de los complejos de inclusión obtenidos por coprecipitación y neutralización, los espectros en ambos casos son prácticamente idénticos entre sí, confirmando que por ambos procedimientos se obtiene un compuesto de la misma naturaleza. En ambos espectros se observa una importante desaparición de las líneas espectrales del fármaco en comparación con la gliclazida, destacando las de los picos que se encuentran a 10.590, 14.985, 17.100, 18.150 y 22.075 ° (2θ). En el caso de la β -CD se produce la desaparición de las líneas situadas a 4.570, 6.290, 8.950, 10.725, 18.865, 22.620, 27.040, 27.135, 32.045 y 34,875 ° (2θ). Asimismo, en el espectro del complejo se observan la aparición de nuevos picos a 7.230, 11.930, 11.980, 12.195 y 28.650 ° (2θ), indicando la presencia de una nueva fase sólida y cristalina. Es importante señalar la disminución de la intensidad de los picos de difracción para el compuesto de inclusión, indicando un menor grado de cristalinidad respecto a los productos de partida, lo cual se halla en concordancia con los estudios de carbono 13 en estado sólido. Este hecho puede ser debido a la rápida precipitación del complejo en su preparación, no disponiendo de tiempo suficiente para un crecimiento de los cristales y una ordenación espacial a distancias más elevadas.

Por último, los sistemas elaborados por atomizado y molienda mostraron un patrón de difracción difuso, con dos señales en el intervalo entre 12 ° y 18 ° (2θ) para el molido, siendo similar para el atomizado. Este último aparece más cristalino que el sistema elaborado por molienda, el cual se corresponde con un sistema amorfo, lo cual coincide con los estudios por DSC, donde el producto atomizado mostró la permanencia del pico de fusión de la gliclazida. En ambos casos, no podemos descartar la presencia de compuestos de inclusión en estado amorfo, lo cual podremos confirmar mediante la espectroscopía de IR.

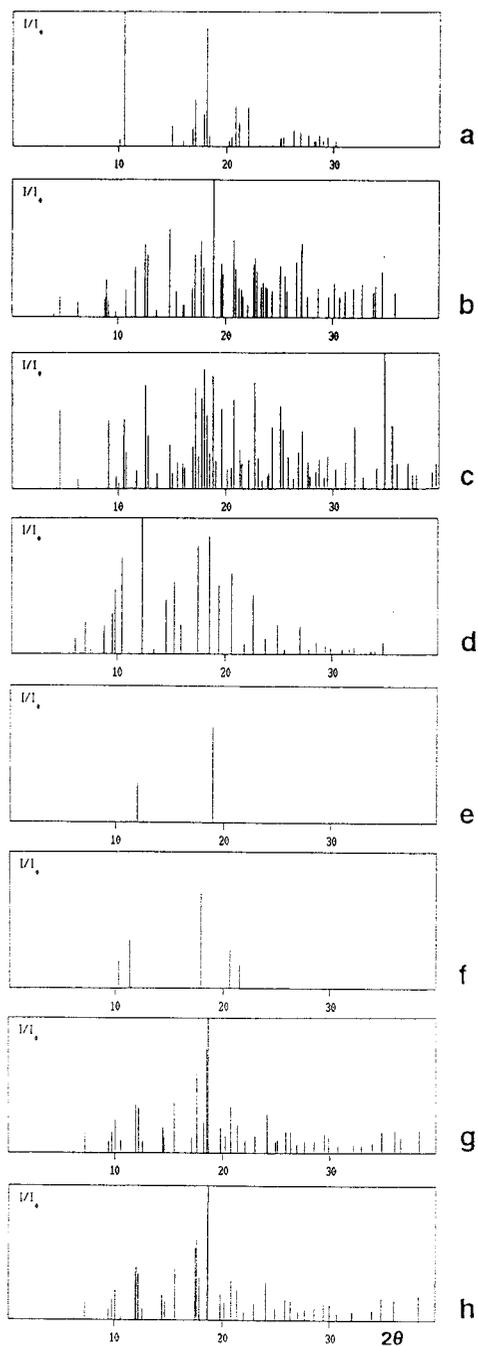


Figura 78. Difractogramas correspondientes al sistema gliclazida- β -CD: a) gliclazida, b) β -CD, c) mezcla física, (d) amasado, e) molido, f) atomizado, g) coprecipitado y h) neutralizado.

3.2.2.3.3. Espectroscopía de Infrarrojos (IR)

Esta técnica será de utilidad para complementar los estudios por DSC, tanto para confirmar las conclusiones obtenidas de los mismos como para aclarar aquellos casos donde dicha técnica de caracterización conduzca a ambigüedad en cuanto a la distinción entre la formación (total o parcial) de un verdadero compuesto de inclusión o una simple dispersión del fármaco en la CD.

En las Figuras 79 a 82 se recogen los espectros correspondientes a los sistemas binarios gliclazida-CD. En nuestro caso, el porcentaje de principio activo se halla sobre el 10-11 % del total del producto, lo que da lugar a que muchas bandas del principio activo se encuentren enmascaradas por el espectro de la CD, componente mayoritario de los sistemas. Así, nuestro estudio se basará en la observación de los posibles cambios presentes en la zonas de absorción características visibles de la gliclazida. En nuestro caso, centraremos nuestro estudio sobre la banda correspondiente al carbonilo (1709 cm^{-1}).

En todos los casos, los sistemas preparados por mezcla física consisten en la simple superposición de los espectros del principio activo y la CD, con una patente disminución de los picos del espectro de IR de la gliclazida, debido al efecto diluyente de la CD antes comentado. Por otra parte, no se observaron interacciones producidas por la preparación de las pastillas de KBr, lo que asegura la validez de dicha técnica de preparación de muestras en nuestro caso, en contra de lo que pueden sugerir otros autores [Ghandi y Karara, 1988], los cuales, para evitar este posible problema, procedieron a preparar las muestras mediante suspensión del polvo en Nujol.

El estudio del sistema gliclazida- α -CD, (Figura 79) no mostró modificaciones apreciables en la posición e intensidad de la banda de carbonilo para los espectros de los diferentes sistemas bajo estudio, lo que parece estar relacionado con una simple dispersión del principio activo en el seno de la CD. Este hecho se halla en concordancia con las conclusiones extraídas de los estudios por DSC.

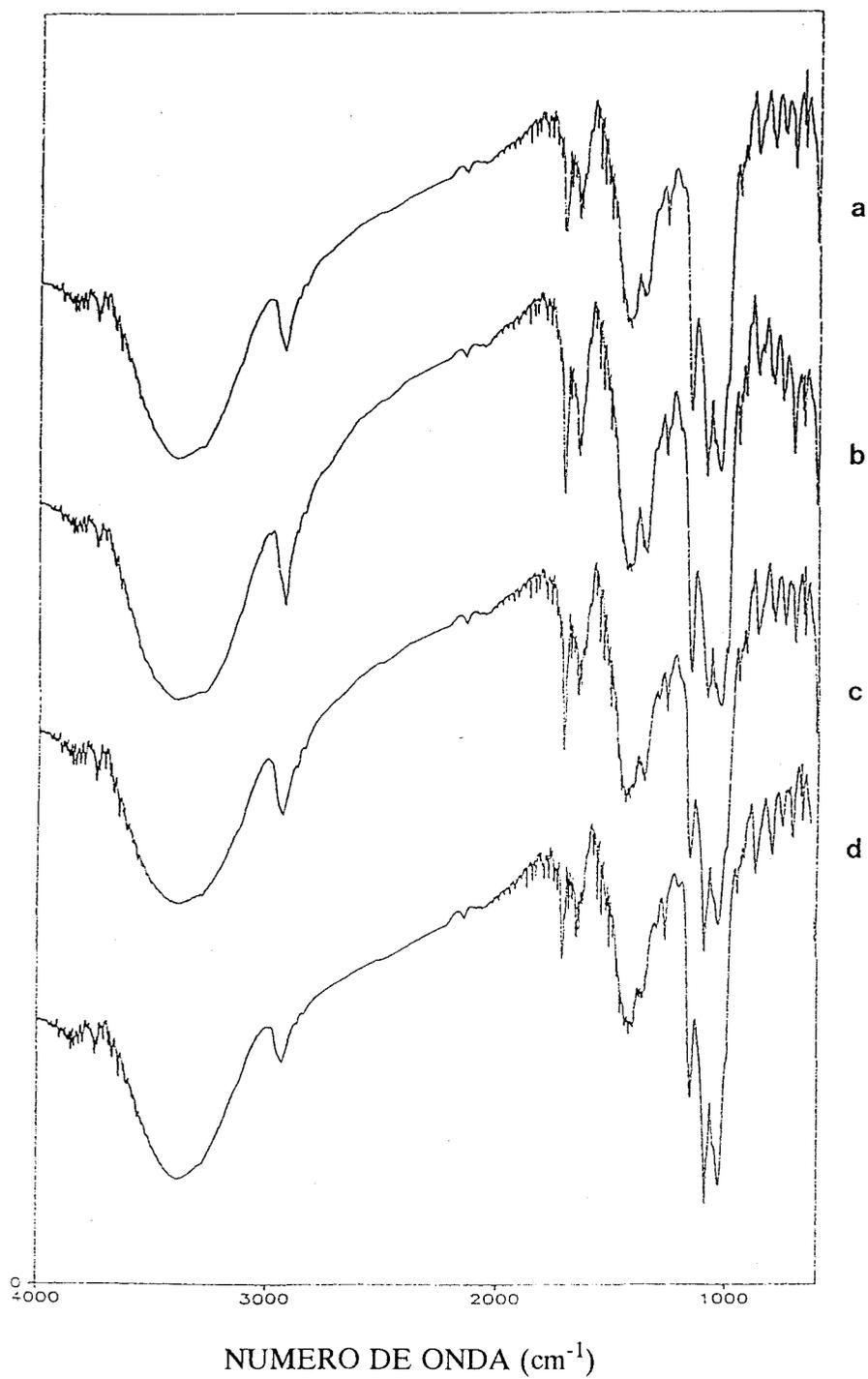


Figura 79. Espectros de IR correspondientes al sistema gliclazida- α -CD: (a) mezcla física, (b) amasado, (c) molido y (d) atomizado.

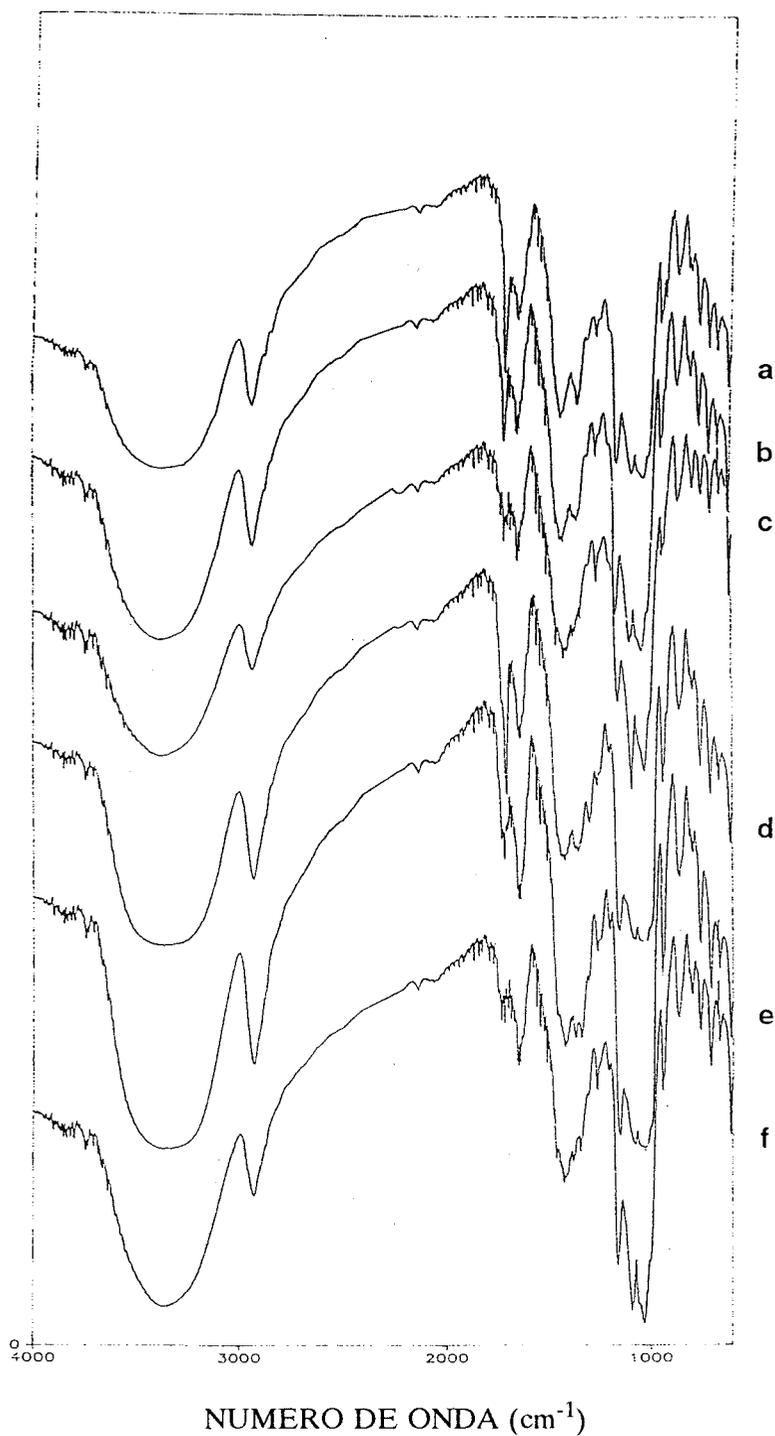


Figura 80. Espectros de IR correspondientes al sistema gliclazida- β -CD: (a) mezcla física, (b) amasado, (c) molido, (d) atomizado, (e) coprecipitado y (f) neutralizado.

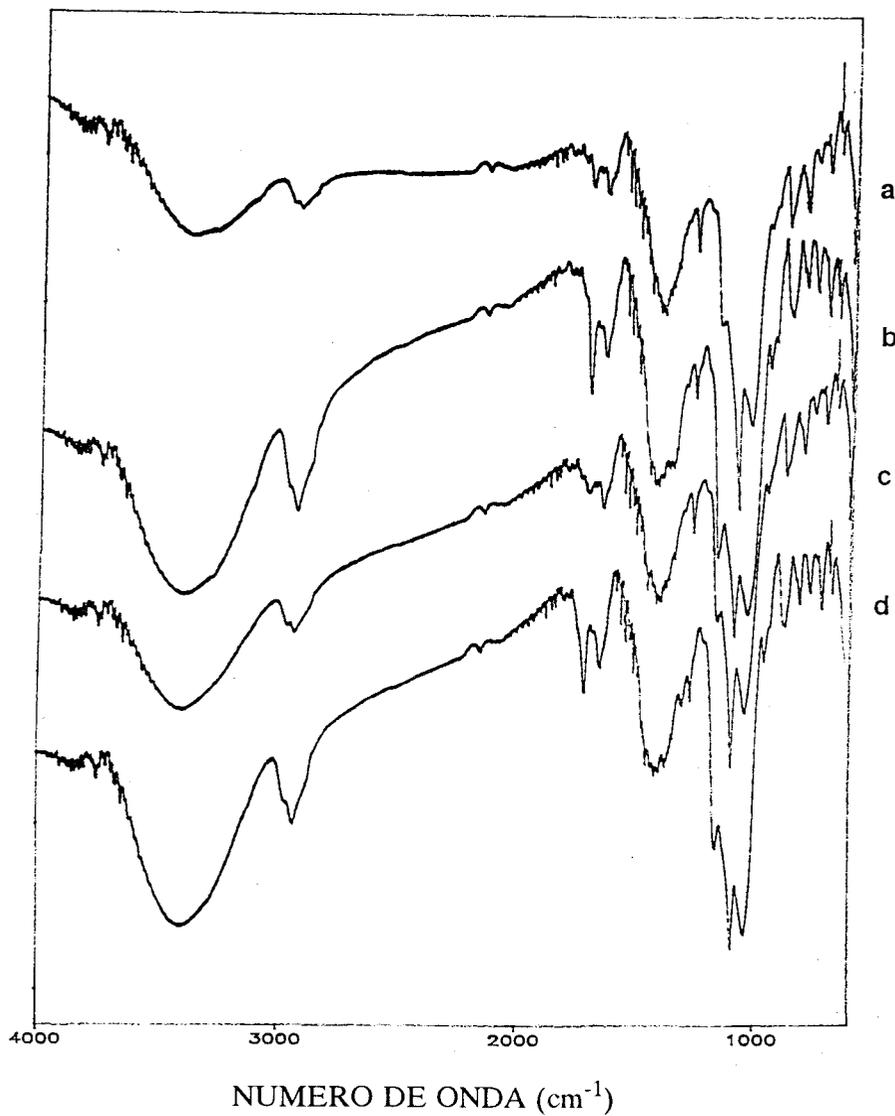


Figura 81. Espectros de IR correspondientes al sistema gliclazida-HP- β -CD: (a) mezcla física, (b) amasado, (c) molido y (d) atomizado.

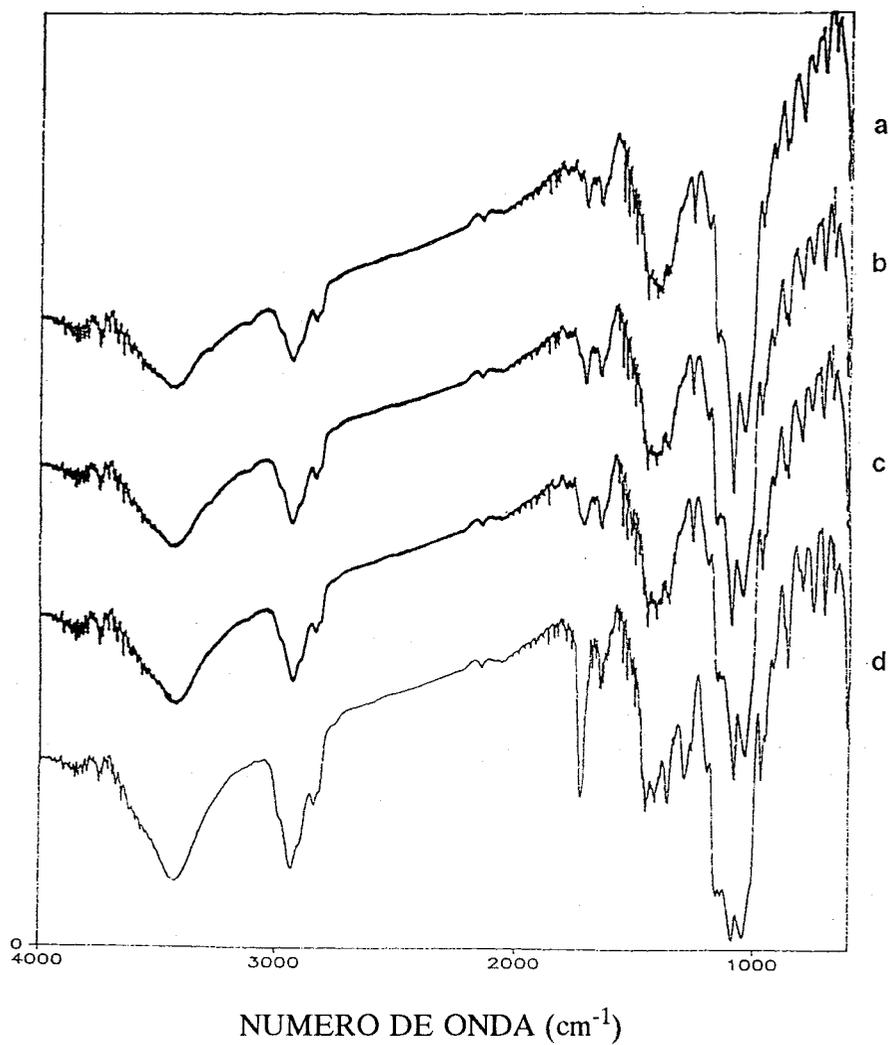


Figura 82. Espectros de IR correspondientes al sistema gliclazida-PMCD: (a) mezcla física, (b) amasado, (c) molido y (d) atomizado.

En el estudio de la interacción gliclazida- β -CD en estado sólido (Figura 80), se observó en el sistema preparado por molienda una desviación de la banda de carbonilo hasta 1717 cm^{-1} , acompañada por una fuerte reducción de su intensidad. Ello es indicativo de una rotura de puentes de H intermoleculares entre las moléculas de fármaco, fenómeno observado por numerosos autores [Nakai *et al.*, 1980; Ahmed *et al.*, 1990; Nakai *et al.*, 1991; Jayachandra-Babu y Pandit, 1995], y relacionado con la posible complejación de los grupos cercanos al que se halla bajo estudio (en nuestro caso, el carbonilo) [Senel *et al.*, 1992].

Para el sistema elaborado por atomización se observó un aumento de la intensidad y anchura de la banda de carbonilo, lo que indica la formación de puentes de H entre el fármaco y el hospedador, hecho que se halla relacionado con la presencia de un compuesto de inclusión en estado sólido [Jayachandra-Babu y Pandit, 1995].

En cuanto al sistema elaborado por coprecipitación, se registró una fuerte reducción de la intensidad de la banda de carbonilo, unida a un importante aumento del número de onda (1732 cm^{-1}). Este hecho está relacionado con una disociación de puentes de H intermoleculares entre las moléculas de principio activo, así como con el establecimiento de interacciones débiles en el complejo de inclusión [Kedzierewicz *et al.*, 1990].

Por último, el espectro del producto neutralizado muestra la desaparición de la banda de carbonilo, indicando la presencia de una estructura mucho más rígida donde existen diferentes interacciones débiles que limitan las vibraciones de dichos grupos, mostrando inequívocamente la existencia de un compuesto de inclusión.

En el estudio por IR de los sistemas gliclazida-HP (Figura 81) no se apreciaron importantes diferencias para las técnicas de elaboración bajo estudio, confirmando que para esta CD dichas técnicas sólo conducen a la obtención de una dispersión del fármaco en el seno de la CD en estado sólido.

Dentro de los sistemas gliclazida-PMCD (Figura 82), se apreció un importante aumento en intensidad y anchura de la banda de carbonilo en el espectro del producto elaborado por atomización, la cual aparece a 1728 cm^{-1} . Este hecho parece estar unido a un importante cambio en la naturaleza de las interacciones fármaco-CD en este caso, como es la rotura de los puentes de H intermoleculares fármaco-fármaco, así como la formación de nuevos

puentes de H fármaco-CD, observable por un ligero incremento de intensidad de las bandas situadas en las zonas de $3500-3300\text{ cm}^{-1}$ y 2900 cm^{-1} . En conjunción con los estudios por DSC, donde se observa una desaparición total de la endoterma de fusión del fármaco, podemos afirmar la existencia de un compuesto de inclusión para esta CD.

En el caso del sistema elaborado por molienda, se observó el desplazamiento de la banda de carbonilo hasta 1732 cm^{-1} , indicando la presencia de un compuesto de inclusión, coincidiendo plenamente con los resultados del estudio por DSC, el cual reveló la existencia de un claro efecto exotérmico a 142 °C , atribuido a la cristalización del compuesto de inclusión amorfo.

Por último, el resto de los sistemas gliclazida-PMCD bajo estudio no presentaron diferencias entre sus espectros, no existiendo pruebas de una complejación efectiva para estos casos.

3.2.3. Velocidad de Disolución

En las Figuras 83 a 87 se recogen los perfiles de disolución de la gliclazida comercial, procesada por distintas técnicas y formulada con diferentes CDs. Asimismo, los parámetros de eficacia de disolución a 60 minutos (DE_{60}) y de porcentaje de fármaco disuelto a 60 minutos (DP_{60}) se muestran en las Tablas XI y XII.

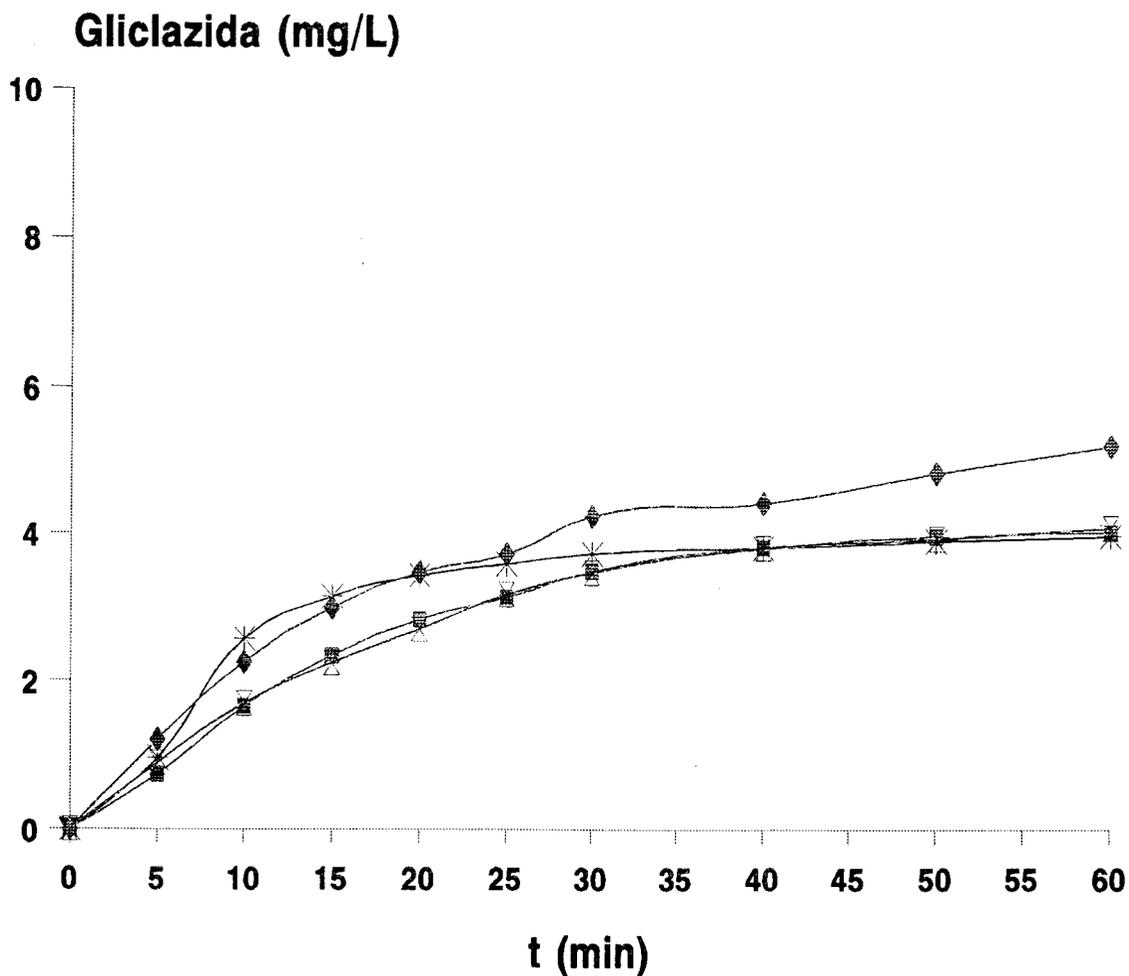


Figura 83. Perfiles de velocidad de disolución correspondientes a la gliclazida (◆: comercial, ⊠: amasado, *: molido, ■: atomizado).

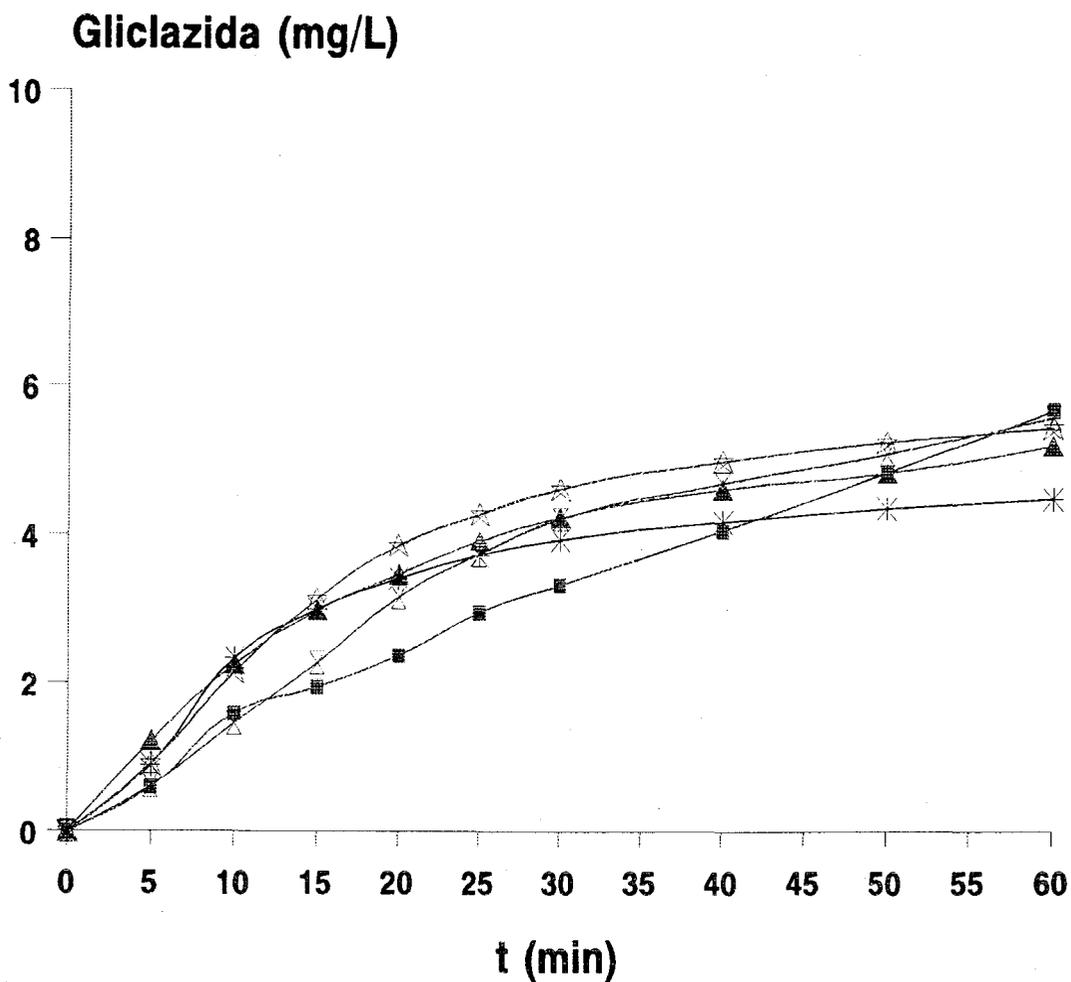


Figura 84. Perfiles de velocidad de disolución correspondientes al sistema gliclazida- α -CD (\triangle : mezcla física, ∇ : amasado, *: molido, ■: atomizado, ▲: gliclazida).

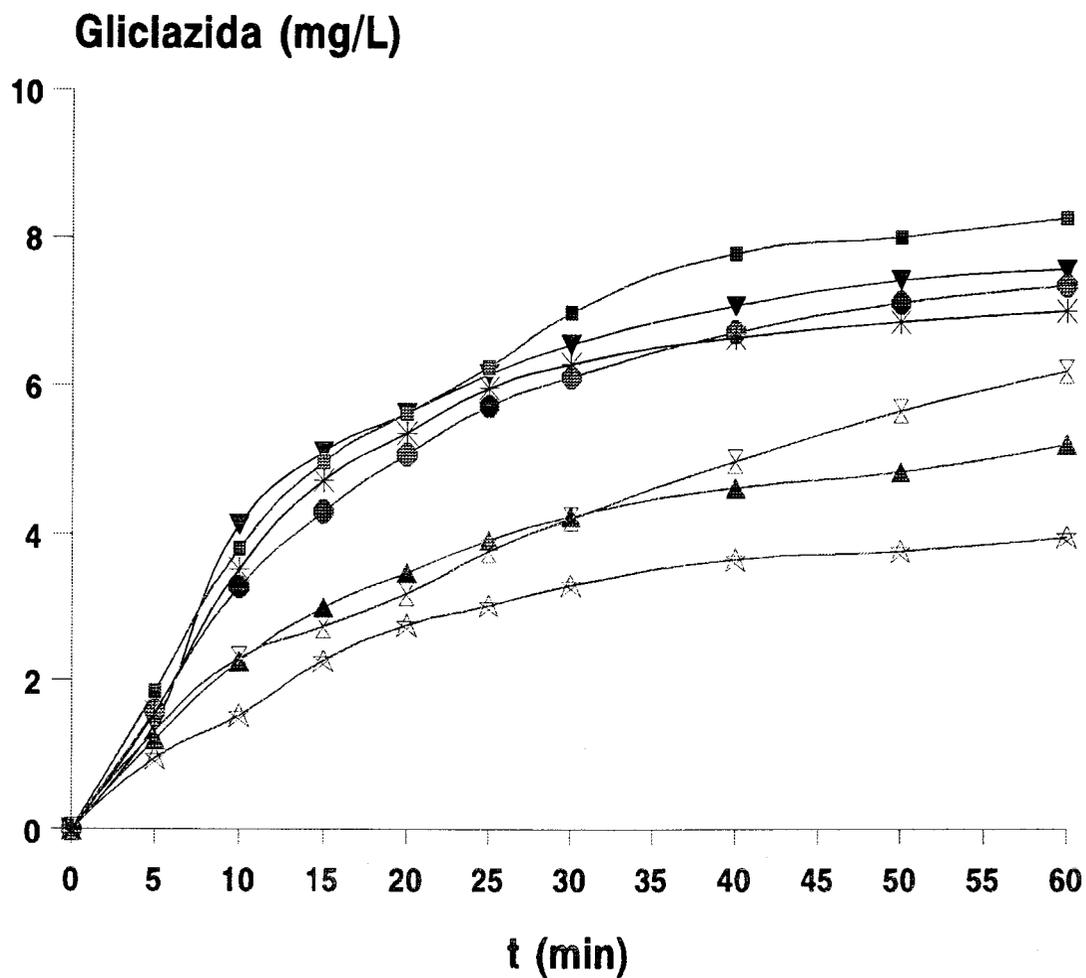


Figura 85. Perfiles de velocidad de disolución correspondientes al sistema gliclazida- β -CD (∇ : mezcla física, \cap : amasado, *: molido, \blacksquare : atomizado, \bullet : coprecipitado, \blacktriangledown : neutralizado, \blacktriangle : gliclazida).

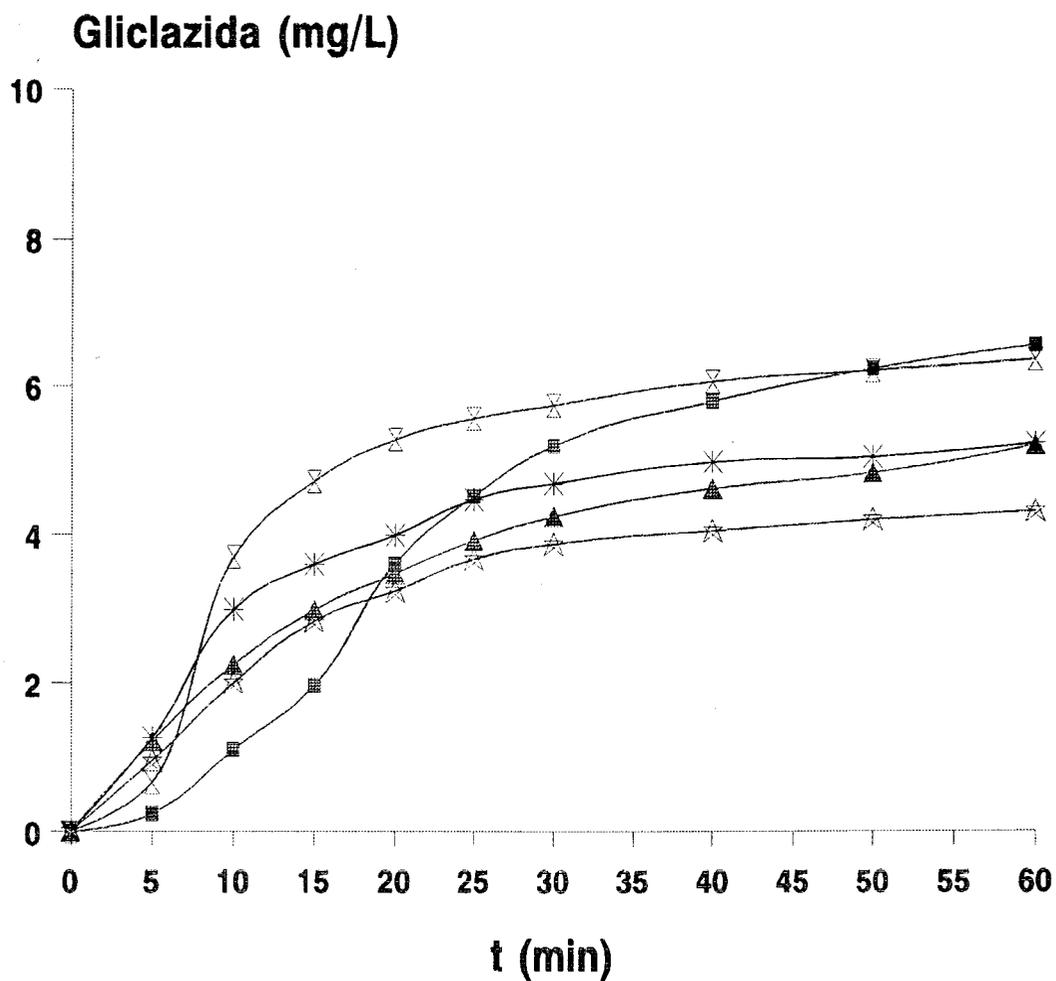


Figura 86. Perfiles de velocidad de disolución correspondientes al sistema gliclazida-HP- β -CD (☆: mezcla física, ∩: amasado, *: molido, ■: atomizado, ▲: gliclazida).

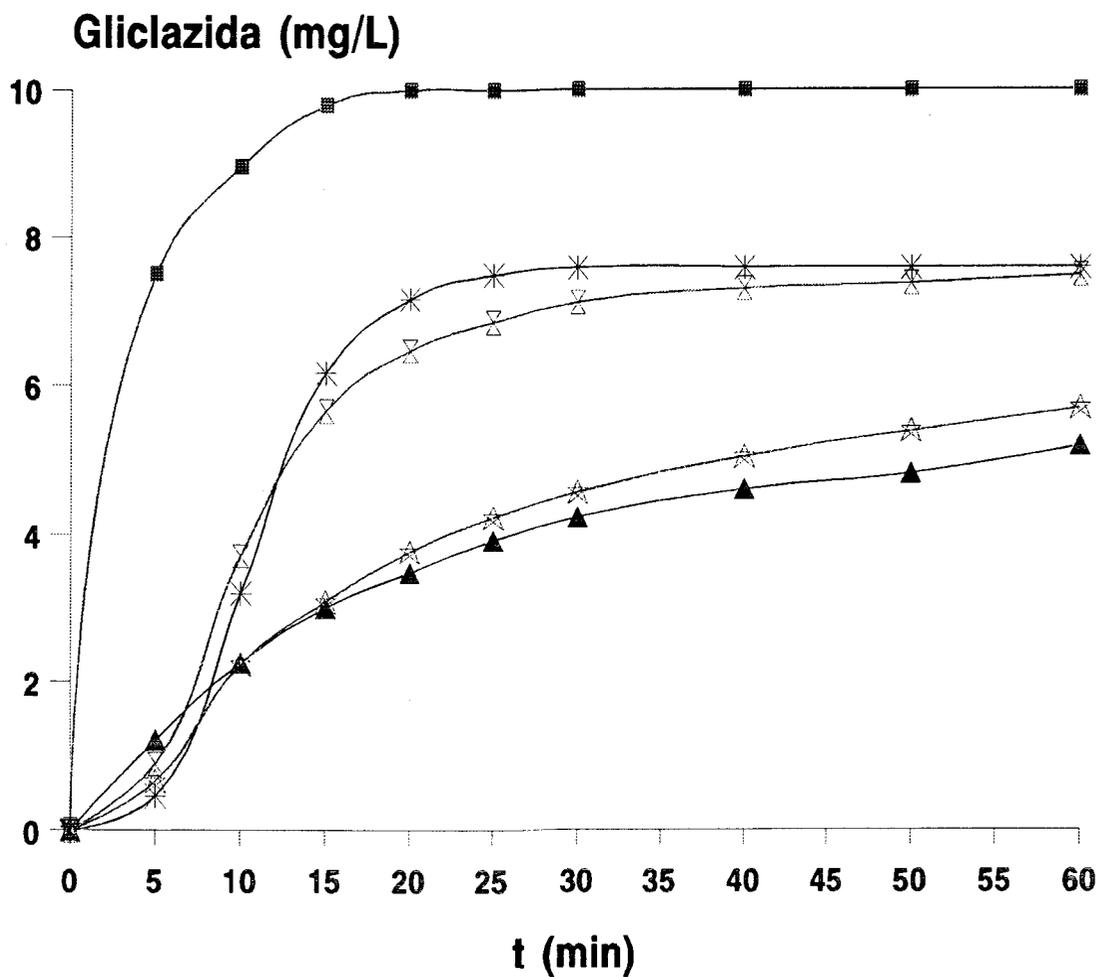


Figura 87. Perfiles de velocidad de disolución correspondientes al sistema gliclazida-PMCD (△: mezcla física, ▽: amasado, *: molido, ■: atomizado, ▲: gliclazida).

Con el objetivo de poner en evidencia si las diferentes técnicas de procesado ejercen algún tipo de influencia sobre la velocidad de disolución del fármaco, comparamos los ensayos de disolución de la gliclazida comercial y tras ser sometida a dichos procesos. Los resultados obtenidos se hallan expuestos en la Tabla XI.

Dichos resultados demostraron que ninguna técnica, al ser aplicada al fármaco comercial proporciona una mejora en su perfil de disolución, conduciendo incluso a productos con características de disolución considerablemente más deficientes respecto al fármaco de partida. Estos resultados se pueden deber a los procesos de agregación y aglomeración que dichas técnicas producen sobre el fármaco, constatados previamente en los estudios previos por SEM de estos productos, presentados en una sección anterior de la presente Memoria.

	Técnica de procesado	DE₆₀	DP₆₀
Gliclazida	Comercial	0.3186	46.39
	Amasado	0.2957	40.37
	Molido	0.3199	39.61
	Atomizado	0.2920	39.61

Tabla XI. Eficacia de disolución (DE₆₀) y porcentaje de fármaco disuelto durante los primeros 60 minutos (DP₆₀) para la gliclazida sometida a las técnicas de procesado bajo estudio.

La evolución de los dos parámetros bajo estudio (DE₆₀ y DP₆₀) en función de las variables estudiadas (tipo de CD y técnica de preparación) se recogen en las Figuras 88 y 89. Los mejores resultados se obtienen para los sistemas elaborados a base de β -CD (en particular mediante atomizado y neutralizado) y PMCD (especialmente mediante atomizado).

Sistema	Método de Elaboración	DE ₆₀	DP ₆₀
α -CD	Mezcla Física	0.3882	53.41
	Amasado	0.3651	54.37
	Molido	0.3336	44.17
	Atomizado	0.2811	54.51
β -CD	Mezcla Física	0.2913	38.65
	Amasado	0.4036	58.74
	Molido	0.5233	68.17
	Atomizado	0.5914	76.64
	Coprecipitado	0.5115	68.45
	Neutralizado	0.5692	72.27
HP- β -CD	Mezcla Física	0.3244	42.16
	Amasado	0.4598	58.06
	Molido	0.3852	59.91
	Atomizado	0.3970	50.98
PMCD	Mezcla Física	0.3807	52.55
	Amasado	0.5839	74.33
	Molido	0.5023	62.18
	Atomizado	0.9137	100.00
Gliclazida	Comercial	0.3177	46.39

Tabla XII. Eficacia de disolución (DE₆₀) y porcentaje de fármaco disuelto durante los primeros 60 minutos (DP₆₀) para los diferentes sistemas gliclazida-CD bajo estudio.

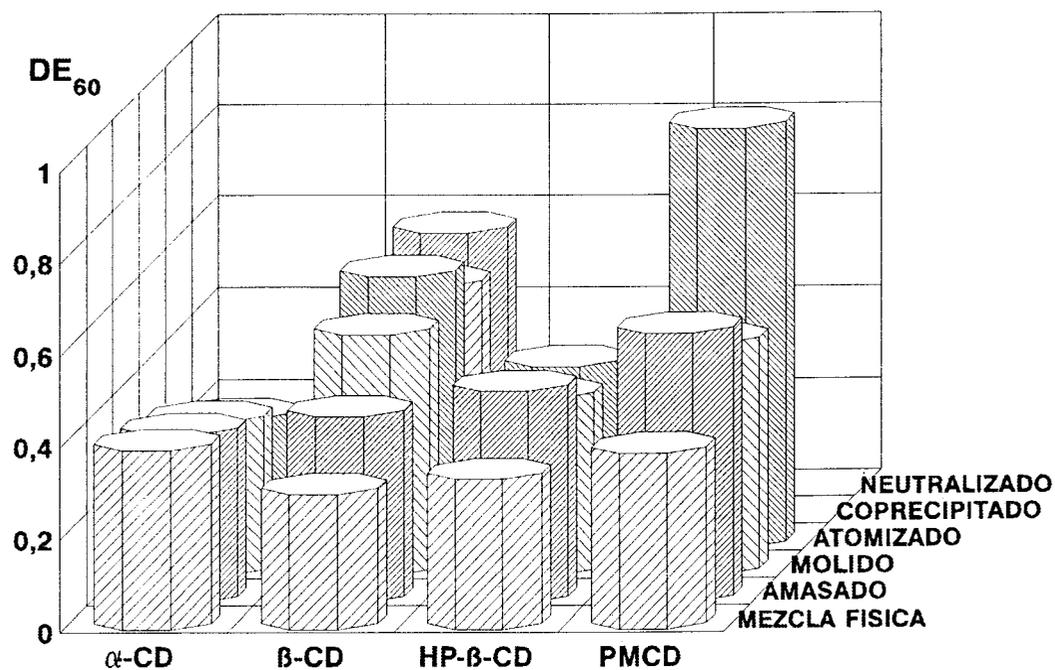


Figura 88. Representación gráfica de la DE_{60} en función de las diferentes variables bajo estudio.

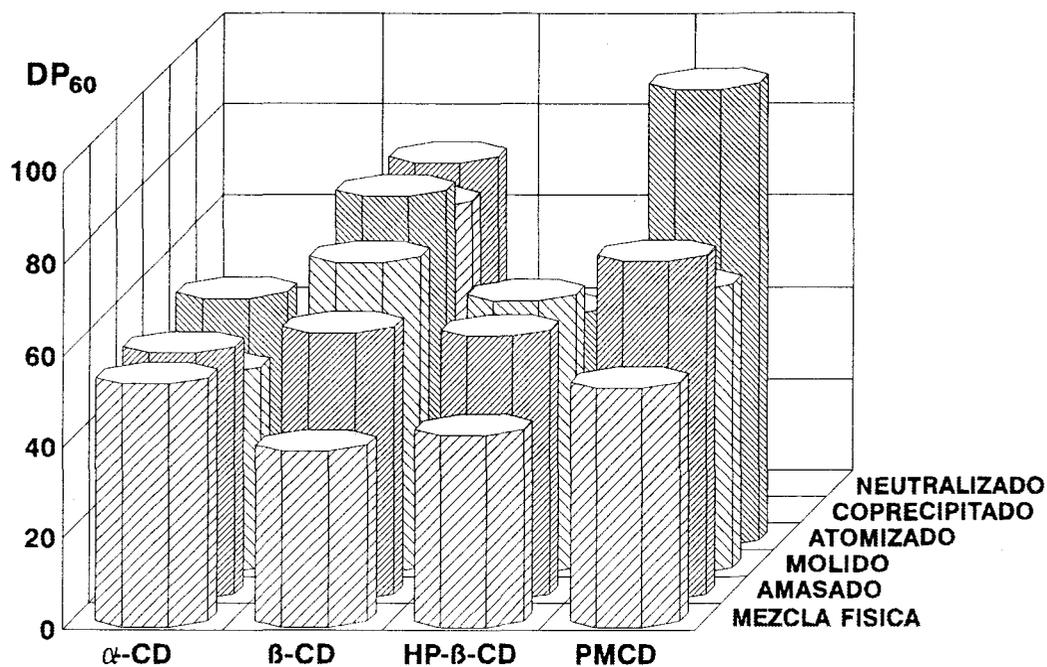


Figura 89. Representación gráfica de la DP₆₀ en función de las diferentes variables bajo estudio.

3.2.3.1. Influencia global de la técnica de elaboración y del tipo de CD

Dentro del estudio de la liberación de la gliclazida a partir de las formulaciones con CDs, los factores que pueden poseer *a priori* influencia sobre el perfil de liberación del fármaco son dos: el método de elaboración utilizado y el tipo de CD empleado. Los resultados de estudio estadístico de la influencia de ambos factores sobre los parámetros DE_{60} y DP_{60} de las curvas de disolución (análisis de la varianza multifactorial) se recogen en las Tablas XIII y XIV, respectivamente.

Fuente de Varianza	G.L.	Suma de Cuadrados	Varianza	F	Prob.
A	3	0.243033	0.0810112	17.0286	< 0.0001
B	3	0.435230	0.145077	30.4952	< 0.0001
AB	9	0.434257	0.0482507	10.14223	< 0.0001
Residual	32	0.152236	0.00475736		
Total	47	1.26476			

Tabla XIII. Resultados del análisis multifactorial sobre las DE_{60} de las CDs: A = técnica de elaboración, B = tipo de CD.

Fuente de Varianza	G.L.	Suma de Cuadrados	Varianza	F	Prob.
A	3	3480.47	1160.16	17.1990	< 0.0001
B	3	3245.79	1081.93	16.0394	< 0.0001
AB	9	3520.33	391.148	5.79868	< 0.0001
Residual	32	2158.55	67.4546		
Total	47	12405.1			

Tabla XIV. Resultados del análisis multifactorial sobre las DP_{60} de las CDs: A = técnica de elaboración, B = tipo de CD.

A partir de dichos resultados, podemos constatar que existen diferencias significativas en los valores de ambos parámetros respecto al método de elaboración aplicado y a la CD empleada.

Respecto al método de elaboración empleado, la aplicación de una técnica de procesado posee gran importancia a la hora de obtener formulaciones con características de liberación adecuadas. En el caso particular de preparados con CDs, la técnica de elaboración debe perseguir, dentro de la capacidad complejante de la CD para el fármaco en cuestión, la formación de un compuesto de inclusión. Alternativamente, la simple dispersión y amorfización del fármaco en el seno de la CD puede conducir a mejoras apreciables de sus características de liberación [Ling *et al.*, 1991]. En nuestro caso, los tratamientos de molienda y atomización, tal y como han confirmado los estudios por XRD, conducen a una disminución de la cristalinidad del fármaco. Asimismo, la dispersión del mismo en un vehículo hidrosoluble, ya sea en forma complejada o no, permite aprovechar la capacidad humectante que poseen las CDs. Sin embargo, es la formación de un compuesto de inclusión el proceso decisivo en la mejora de las características de disolución del fármaco. Así, el atomizado se revela como una técnica adecuada para la elaboración de formulaciones entre gliclazida y las β - y PMCDs, las cuales conducen a una complejación efectiva del fármaco en medio líquido. Dentro de este grupo, es de destacar el sistema gliclazida-PMCD, cuyas características de liberación están potenciadas por elevada hidrosolubilidad de la CD.

En aquellos casos donde no se contempla una alta tendencia a la complejación en medio líquido, el factor predominante es la tendencia a la aglomeración que presentan las partículas obtenidas mediante atomización, como se corroboró en la sección de SEM. Este hecho contrarrestaría otros factores presentes en la atomización, como la dispersión y/o amorfización del fármaco en un vehículo hidrosoluble, influyendo negativamente en sus características de disolución.

La técnica de amasado, por su parte, presenta una mejora significativa en aquellos sistemas elaborados con CDs altamente hidrosolubles, como son las HP- β - y PMCDs. Ello es debido a que, en estos sistemas, el factor predominante en la mejora de las características de disolución es el incremento de la humectabilidad, pues esta técnica no conduce en nuestro caso a la formación de compuestos de inclusión. Para las restantes CDs, en cambio, estos sistemas no muestran mejoras significativas respecto a la gliclazida pura.

Es necesario señalar que en el estudio estadístico no se pudieron incluir los sistemas elaborados por neutralización o coprecipitación, debido a que éstos únicamente se pueden obtener con la β -CD, no siendo posible su comparación. Dichos productos constituyen compuestos de inclusión cuya velocidad de disolución supera ampliamente la del fármaco de partida. En estos casos, la complejación efectiva de la gliclazida se refleja en una mejora muy apreciable de sus características de disolución.

Respecto al estudio sobre el tipo de CD empleado, los resultados obtenidos se pueden explicar en base a la dispar capacidad complejante y solubilizante que poseen las distintas CDs (ver página 86), existiendo dos grupos claramente diferenciados. Así, mientras las β - y PMCDs presentan una alta K_c y un elevado valor de eficacia solubilizante -lo cual muestra su elevada tendencia a incluir la gliclazida en su cavidad-, las α - e HP- β -CDs únicamente presentan una discreta eficacia solubilizante, así como un valor muy reducido de K_c , en especial la α -CD. Un estudio más pormenorizado se recoge en los dos apartados siguientes.

En resumen, los datos estadísticos señalaron la influencia significativa de ambos factores sobre los perfiles de liberación de la gliclazida, aunque éstos no pueden considerarse por separado, siendo claramente interdependientes entre sí.

3.2.3.2. Influencia del tamaño de cavidad: estudio de las CDs naturales

Uno de los factores más importantes a considerar en los estudios de liberación a partir de formulaciones con CDs, es el tamaño de la cavidad de la CD utilizada como vehículo, parámetro cuya importancia fue tratada en los estudios de solubilidad.

La influencia de dicho factor se recoge gráficamente en las Figuras 84, 85, 88 y 89. Los resultados del análisis de varianza efectuado a los parámetros de DE_{60} y DP_{60} correspondientes a las CDs naturales se exponen en la Tablas XV y XVI, respectivamente. A partir de estos datos, se comprueba cómo la β -CD es la que conduce a mejores resultados, mientras que la α -CD sólo presenta una dudosa mejora del proceso de disolución del principio activo frente al fármaco comercial. Este hecho se debe únicamente al efecto humectante de la CD, produciéndose una liberación retardada e incompleta respecto a las formulaciones elaboradas con β -CD. Este resultado se halla en concordancia con los valores de K_c y de solubilidad acuosa del fármaco en las CDs naturales (ver página

86). De esta forma, se confirma el peso del factor complejación en la mejora de solubilidad de la gliclazida, el cual es dependiente del tamaño de cavidad de la CD.

Fuente de Varianza	G.L.	Suma de Cuadrados	Varianza	F	Prob.
A	3	0.0356335	0.0118778	5.18248	0.0108
B	1	0.0743576	0.0743576	32.4433	< 0.0001
AB	3	0.142892	0.0476306	20.7820	< 0.0001
Residual	16	0.0366708	0.00229192		
Total	23	0.289554			

Tabla XV. Resultados del análisis multifactorial sobre las DE_{60} de las α - y β -CDs: A = técnica de elaboración, B = tipo de CD.

Fuente de Varianza	G.L.	Suma de Cuadrados	Varianza	F	Prob.
A	3	1149.02	383.006	13.3402	0.0001
B	1	476.774	476.774	16.6062	0.0009
AB	3	1471.64	490.774	17.0859	< 0.0001
Residual	16	459.369	28.7106		
Total	23	3556.80			

Tabla XVI. Resultados del análisis multifactorial sobre las DP_{60} de las α - y β -CDs: A = técnica de elaboración, B = tipo de CD.

3.2.3.3. Estudio sobre derivados de la β -CD: influencia del tipo de sustituyente

Como consecuencia de las claras modificaciones ejercidas por los sustituyentes de la β -CD sobre las características de solubilidad y de K_c del principio activo, se llevó a cabo el estudio de la influencia de dicho factor sobre las curvas de liberación obtenidas para los distintos sistemas.

Los resultados obtenidos al comparar los perfiles de las diferentes β -CDs (ver Figuras 85 a 87) corroboran que la CD natural y la PMCD son las que ofrecen las mejores características de velocidad de disolución, destacando el caso del sistema gliclazida-PMCD elaborado por atomización, el cual conduce al perfil de liberación más completo de todos los que se encuentran bajo estudio.

Un factor importante a considerar en la mejora de las características de disolución del fármaco sería la mayor o menor solubilidad acuosa de la propia CD. *A priori*, cuanto mayor solubilidad acuosa presente la CD, mayor será su efecto hidrofílico, mejorando en mayor medida la disolución del principio activo. Así, teniendo en cuenta los valores de solubilidad acuosa de los derivados de la β -CD (β -CD = 1.85 g/100 mL; HP- β -CD = > 50 g/100 mL y PMCD = > 50 g/100 mL), éstos conducirían a mejores resultados que los obtenidos para la CD natural. Sin embargo, en nuestro caso la solubilidad acuosa de la CD no presenta una influencia significativa, siendo los efectos estéricos aquellos que poseen mayor preponderancia.

Así, el empleo de la β -CD natural y la PMCD permite la obtención de formulaciones cuyos perfiles de liberación muestran valores de DE_{60} y DP_{60} globalmente superiores a los presentados por la HP- β -CD (ver Figuras 88 y 89). El resultado del análisis de varianza efectuado a estos dos parámetros se expone en las Tablas XVII y XVIII, respectivamente. El estudio estadístico ha mostrado que el tipo de CD muestra diferencias significativas en los valores de DE_{60} y DP_{60} , así como la influencia que, de forma aislada, ejerce el tipo de técnica de procesado empleada en ambos parámetros.

Este resultado viene dado por el impedimento estérico de los sustituyentes de la HP- β -CD, que impide la formación de un compuesto de inclusión con suficiente estabilidad para las diferentes técnicas de procesado ensayadas, como ya se constató en la sección de caracterización en estado sólido de la presente Memoria. En el caso de la PMCD, el inmejorable perfil de disolución para el producto atomizado se basa en el aislamiento efectivo de un compuesto de inclusión por esta técnica, como ya confirmaron los estudios térmicos y de espectroscopía de IR, y cuya alta solubilidad se halla conferida por la fuerte hidrosolubilidad de la PMCD, como hemos comentado con anterioridad.

Por último, aclarar que en el caso de los sistemas elaborados con β -CD, sus perfiles de disolución no son del mismo nivel, debido sin duda a la limitada solubilidad del compuesto de inclusión formado, como ya reveló el diagrama de solubilidad correspondiente (ver páginas 83 y 84).

Fuente de Varianza	G.L.	Suma de Cuadrados	Varianza	F	Prob.
A	3	0.414338	0.138113	22.8310	< 0.0001
B	2	0.262307	0.131154	21.6806	< 0.0001
AB	6	0.243457	0.0405761	6.70751	0.0003
Residual	24	0.145185	0.00604935		
Total	35	1.06529			

Tabla XVII. Resultados del análisis multifactorial sobre las DE_{60} de las β -, HP- β - y PMCDs: A = técnica de elaboración, B = tipo de CD.

Fuente de Varianza	G.L.	Suma de Cuadrados	Varianza	F	Prob.
A	3	4548.78	1516.26	18.3601	< 0.0001
B	2	2305.14	1152.57	13.9563	< 0.0001
AB	6	2232.16	372.027	4.50481	0.0004
Residual	24	1982.02	82.5843		
Total	35	11068.1			

Tabla XVIII. Resultados del análisis multifactorial sobre las DP_{60} de las β -, HP- β - y PMCDs: A = técnica de elaboración, B = tipo de CD.

CONCLUSIONES

1. Las distintas técnicas de caracterización empleadas (SEM, DSC, HSM, TG, XRD e IR), han puesto de manifiesto la estabilidad de las materias primas frente a los diferentes métodos de procesado utilizados. De igual forma, dichas técnicas de caracterización han demostrado que los procesos de atomización y molienda conducen a una amorfización de las CDs. En el caso de la gliclazida, ninguna técnica de procesado condujo a la amorfización de la misma.

2. Los estudios de interacción acuosa fármaco-CD han mostrado que las α -, HP- β - y PMCDs conducen a diagramas de solubilidad del tipo A_L de Higuchi, es decir, los complejos formados entre el fármaco y estas CDs no poseen un límite de solubilidad definido, por lo que queda descartada la posibilidad de obtención de complejos en estado sólido por coprecipitación para las mismas. Sin embargo, en el caso de la β -CD, se observó un diagrama de tipo B_S de Higuchi, indicando que el complejo formado en solución posee un límite de solubilidad, siendo posible su aislamiento.

3. El cálculo de la estequiometría del complejo formado entre gliclazida y β -CD se realizó a partir de la meseta del diagrama de solubilidad, correspondiendo a una relación molar 1:2 fármaco:CD. Dicha proporción estequiométrica fue la utilizada a la hora de elaborar los distintos sistemas binarios fármaco-CD.

4. La técnica de cálculo de constante de estabilidad en medio líquido utilizada (solubilidad mediante la ecuación de Higuchi y Connors) ha evidenciado que las CDs β -, HP- β - y PMCD son las únicas que conducen a constantes de estabilidad óptimas, aunque la HP- β -CD, debido al impedimento estérico de sus sustituyentes, presenta un valor sensiblemente inferior. La α -CD, seguramente debido a un inadecuado tamaño de su cavidad, presenta por su parte una constante de estabilidad muy baja. Estos resultados confirman la importancia de la dimensión de la cavidad de la CD en el proceso de complejación de la gliclazida.

5. Las diferentes técnicas de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, aplicadas al sistema gliclazida- β -CD, han confirmado la complejación del fármaco en medio líquido, corroborando asimismo la proporción estequiométrica calculada a partir de la meseta del diagrama de solubilidad. Además, dichas técnicas pusieron de manifiesto la participación de los radicales azabicyclooctilo y tolilo en el proceso de complejación.

6. La técnica de SEM aplicada a los distintos sistemas binarios mostró que en aquellos que fueron elaborados mediante atomización y molienda era imposible diferenciar sus dos componentes, fármaco y CD, hecho indicativo del elevado grado de homogeneidad alcanzado para estos dos métodos. Estos resultados, si bien no confirman la formación de un compuesto de inclusión en estado sólido, permiten asegurar al menos la formación de una fina dispersión del principio activo en el seno de la CD. Asimismo, las observaciones mediante SEM mostraron la naturaleza microcristalina de los sistemas preparados con la β -CD mediante coprecipitación y neutralización.

7. Los estudios térmicos (DSC y HSM) pusieron de manifiesto que únicamente los sistemas elaborados con β - y PMCD mediante las técnicas de atomización, molienda, coprecipitación y neutralización conducen a una complejación efectiva del fármaco dentro de la cavidad de la CD, deducida a partir de la desaparición de la endoterma de fusión del fármaco en dichos sistemas. Por otra parte, se puso en evidencia que los fenómenos exotérmicos registrados por DSC se correspondían con procesos de cristalización del complejo.

8. La técnica de XRD ha corroborado la naturaleza amorfa de los sistemas obtenidos por atomizado y por molienda. En el caso de los sistemas elaborados con la β -CD mediante coprecipitación y neutralización, las técnicas de XRD y CP/MAS ^{13}C RMN confirmaron la presencia de una nueva fase sólida y cristalina, de diferente naturaleza a los productos de partida.

9. Mediante espectroscopía de IR se han confirmado las observaciones efectuadas en el estudio térmico, mostrando la presencia de compuestos de inclusión para los sistemas elaborados con β - y PMCD mediante las técnicas de atomización, molienda, coprecipitación y neutralización.

10. Los estudios de velocidad de disolución muestran que la presencia de las CDs en las formulaciones conduce, en todos los casos, a un aumento de la velocidad de disolución de la gliclazida, obteniéndose los mejores resultados para las β - y PMCDs. Este hecho se halla en concordancia con los datos de solubilidad obtenidos previamente, reflejando la importancia que la complejación desempeña en dicho proceso.

11. Los sistemas obtenidos por molienda y atomización son los que conducen en general a los mejores perfiles de disolución. Esta mejora presentada por dichos sistemas se ha explicado en base a la amorfización conseguida por esta técnica para la fracción de fármaco no complejoado.

12. Considerando los parámetros analizados en el estudio biofarmacéutico realizado a las formulaciones gliclazida-CDs (DE_{60} y DP_{60}), puede concluirse que es el sistema elaborado con la PMCD por atomización el que presenta el mejor perfil de disolución, en base al adecuado valor de K_c , que permite una adecuada complejación en medio líquido, a una reducción de la cristalinidad y a la alta hidrosolubilidad de la CD empleada.

BIBLIOGRAFIA

- ACARTURK, F, IMAI, T., SAITO, H., ISHIKAWA, M. y OTAGIRI, M., Comparative study on inclusion complexation of maltosyl- β -cyclodextrin, heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin and β -cyclodextrin with fucosterol in aqueous and solid state. *J. Pharm. Pharmacol.*, **45**, (3) (1993) 1028-1032.
- AHMED, M.O., NAKAI, Y., ABOUTALEB, A.E.S., YAMAMOTO, K., RAHMAN, A.A.Z.A. y SALEH, S.I., Complex formation of nitrazepam in coprecipitating and in co-grinding with methylated β -cyclodextrins. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, (12) (1990) 3423-3427.
- AMATO, M.E., DJEDAINI, F., PAPPALARDO, G.C., PERLY, B. y SCARLATA, G., Molecular modeling of β -cyclodextrin complexes with nootropic drugs. *J. Pharm. Sci.*, **81**, (12) (1992) 1157-1161.
- ANDERSEN, F.M. y BUNDGAARD, H., Inclusion complexation of metronidazole benzoate with β -cyclodextrin and its depression of anhydrate-hydrate transition in aqueous suspensions. *Int. J. Pharm.*, **19**, (1984) 189-197.
- ANGUIANO-IGEA, S., OTERO-ESPINAR, F.J., VILA-JATO, J.L. y BLANCO-MENDEZ, J., Evaluation of sealed heating method for the obtention of a clofibrate- β -cyclodextrin inclusion complex. *S.T.P. Pharma Sciences*, **2**, (4) (1992) 325-331.
- ARIAS, M.J., GINES, J.M., RABASCO, A.M., CHEMTOB, C. y SANCHEZ-SOTO, P.J., Characterization by SEM/EDX of triamterene- β -cyclodextrin inclusion compounds. *Proceedings 13th International Congress on Electron Microscopy*, Paris, July, 1994, pp. 51-52
- ARIAS, M.J., Estudio comparativo de formulaciones de triamtereno con diferentes vehículos hidrosolubles: ciclodextrinas y PEG 6000. *Tesis Doctoral*, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 1995.
- ARIAS, M.J., MUÑOZ, P., MOYANO, J.R., GINES, J.M. y NOVAK, C., Preliminary study of different omeprazole- γ -CD co-grinded systems. *Int. J. Pharm.*, (1996) (en prensa).
- BACKENSFELD, T., MULLER, B.W. y KOLTER, K., Interaction of NSA with cyclodextrins and hydroxypropyl cyclodextrin derivatives. *Int. J. Pharm.*, **74**, (1991) 85-93.

- BAEYENS, W.R.G., LIN LING, B., DE MOERLOOSE, P., DEL CASTILLO, B. y DE LONGE, C., Cyclodextrins: spectroscopic, pharmaceutical and chromatographic applications. *An. Real Acad. Farm.*, **54**, (1988) 698-714.
- BEKERS, O., UIJTENDAAL, E.V., BEIJNEN, J.H., BULT, A. y UNDERBERG, W.J.M., Cyclodextrins in the pharmaceutical field. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **17**, (11) (1991) 1503-1549.
- BEKERS, O., KETTENES-VAN DEN BOSH, J.J., VAN HELDEN, S.P., SEIJKENS, D., BEIJNEN, J.H., BULT, A. y UNDERBERG, W.J.M., Inclusion complex formation of anthracycline antibiotics with cyclodextrins; a proton nuclear magnetic resonance and molecular modelling study. *J. Includ. Phenom.*, **11**, (1991) 185-193.
- BENESI, H.A. y HILDEBRAND, J.H., A spectrometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, (1949) 2703-2707.
- BETTINETTI, G., MURA, P., LIGUORI, A., BRAMANTI, G. y GIORDANO, F., Solubilization and interaction of naproxen with cyclodextrins in aqueous solution and in the solid state. *Farmaco ed. sci.*, **44**, (2) (1989) 195-213.
- BETTINETTI, G., MELANI, F., MURA, P., MONNANNI, R. y GIORDANO, F., Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of naproxen interaction with cyclodextrins in solution. *J. Pharm. Sci.*, **80**, (12) (1991) 1162-1170.
- BETTINETTI, G., GAZZANIGA, A., GIORDANO, F. y SANGALLI, M.E., Thermal properties and mechanical stress of β -cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **40**, (4) (1994) 209-212.
- BETTINETTI, G., CONTE, U., MAGGI, L., RILLOSI, M. y SETTI, M., Solid state physicochemical characterization of α -CD, a possible excipient in tablet technology. *Proceedings 14th Pharmaceutical Technology Conference*, Barcelona, Abril, 1995, pp. 390-398
- BLANCO-MENDEZ, J., VILA-JATO, J.L., OTERO-ESPINAR, F.J. y ANGUIANO-IGEA, S., Influence of method of preparation on inclusion complexes of naproxen with different cyclodextrins. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **17**, (7) (1991) 943-957.

- BROWN, N.D., BUTLER, D.L. y CHIANG, P.K., Stabilization of thymopentin and preservation of its pharmacological properties by 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J. Pharm. Pharmacol.*, **45**, (3) (1992) 666-667.
- CABRAL-MARQUES, H.M., HADGRAFT, J., KELLAWAY, I.W. y PUGH, W.J., Studies of cyclodextrin inclusion complexes. II. Molecular modelling and $^1\text{H-NMR}$ evidence for the salbutamol- β -cyclodextrin complex. *Int. J. Pharm.*, **63**, (1990) 267-274.
- CAIRA, M.R., GRIFFITH, V.J., NASSIMBENI, L.R. y OUDTSHOORN, B.V., X-ray structure and thermal analysis of a 1:1 complex between sulfathiazole and β -cyclodextrin. *J. Inclusion Phenom.*, **17**, (1994) 187-201.
- Catálogo de Especialidades Farmacéuticas, Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid, 1996.
- ÇELEBI, N. y ERDEN, N., Interaction of naproxen with β -cyclodextrin in ground mixture. *Int. J. Pharm.*, **78**, (1992) 183-187.
- ÇELEBI, N. y NAGAI, T., Enhancement of dissolution properties of nalidixic acid from ground mixtures with γ -cyclodextrin. *S.T.P. Pharma Sciences*, **3**, (11) (1987) 868-871.
- ÇELEBI, N. y NAGAI, T., Improvement of dissolution characteristics of piromidic acid by dimethyl- β -cyclodextrin complexation. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **14**, (1) (1988) 63-75.
- CHOUDHURY, S. y NELSON, K.F., Improvement of oral bioavailability of carbamazepine by inclusion in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, **85**, (1992) 175-180.
- CHOW, D.D. y KARARA, A.H., Characterization, dissolution and bioavailability in rats of ibuprofen- β -cyclodextrin complex system. *Int. J. Pharm.*, **28**, (1986) 95-101.
- CHUN, I.K. y YUN, D.S., Inclusion complexation of hydrocortisone butyrate with cyclodextrins and dimethyl- β -cyclodextrin in aqueous solution and in solid state. *Int. J. Pharm.*, **96**, (1993) 91-103.
- CLAUDY, P., LETOFFE, J.M., GERMAIN, P., BASTIDE, J.P. BAYOL, A., BLASQUEZ, S., RAO, R.C. y GONZALEZ, B., Physicochemical characterization of cholesterol-beta cyclodextrin complexes. *J. Therm. Anal.*, **37**, (1991) 2497-2506.

- CLARKE, E.G.C. (Ed.), *Isolation & Identification of Drugs*, The Pharmaceutical Press, London, 1974
- COLEMAN, A.W., NICOLIS, I., KELLER, N. y DALBIEZ, J.P., Aggregation of cyclodextrins: an explanation of the abnormal solubility of β -cyclodextrin. *J. Inclus. Phenom.*, **13**, (1992) 139-143.
- CONNORS, K.A. y MOLLICA, J.A., Theoretical analysis of comparative studies of complex formation. *J. Pharm. Sci.*, **55**, (8) (1966) 772-780.
- CONTE, U., GIUNCHENDI, P., MAGGI, L. y LA MANNA, A., Erodible matrices containing hydroxypropyl- β -cyclodextrin for linear release of a water-insoluble drug (diazepam). *S.T.P. Pharma Sciences*, **3**, (3) (1993) 242-249.
- CORRIGAN, O.I. y STANLEY, C.T., Mechanism of drug dissolution rate enhancement from β -cyclodextrin-drug systems. *J. Pharm. Pharmacol.*, **34**, (10) (1982) 621-626.
- COTTA-RAMUSINO, M., RUFINI, L. y MUSTAZZA, C., UV spectroscopic study of the interaction between α -, β - and γ -cyclodextrins and pyridine derivatives. *J. Inclus. Phenom.*, **15**, (1993) 359-368.
- CRAMER, F., SAENGER, W. y SPATZ, H.Ch., Inclusion compounds. XIX. The formation of inclusion compounds of α -cyclodextrin in aqueous solutions. Thermodynamics and kinetics. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, (1) (1967) 14-20.
- CUELLAR, S. (Coordinador), "Introducción a la Química de los Medicamentos", Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid, 1996
- DJEDAINI, F., LIN, S.Z., PERLY, B. y WOUESSIDJEW, D., High-field nuclear magnetic resonance techniques for the investigation of a β -cyclodextrin: indomethacin inclusion complex. *J. Pharm. Sci.*, **79**, (7) (1990) 643-646.
- DJEDAINI, F. y PERLY, B., Nuclear magnetic resonance of cyclodextrins, derivatives and inclusion compounds. The ultimate tool. En *New trends of cyclodextrins and derivatives* (Ed. D. Duchêne) Editions de Santé, París, 1990

- DJEDAINI, F. y PERLY, B., Multinuclear NMR answers to structural problems in the field of cyclodextrin chemistry and technology. En Minutes of the Fifth International Symposium on Cyclodextrins (Ed. D. Duchêne), Editions de Santé, París, 1991
- DJEDAINI, F. y PERLY, B., Nuclear magnetic resonance investigation of the stoichiometries in β -cyclodextrin: steroid inclusion complexes. *J. Pharm. Sci.*, **80**, (12) (1991) 1157-1161.
- DUCHENE, D., GLOMOT, F. y VAUTION, C., Pharmaceutical applications of cyclodextrins en Cyclodextrins and their industrial uses (Ed. D. Duchêne), Editions de Santé, París, 1987
- DUCHENE, D. y WOUESSIDJEW, D., Pharmaceutical uses of cyclodextrins and derivatives. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **16**, (17) (1990) 2487-2499.
- EL-GENDY, G.A. y EL-GENDY, M.A., Heptakis (2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin complexation, with glutetimide. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **39**, (6) (1993) 249-254.
- ERDEN, N. y ÇELEBI, N., A study of the inclusion complex of naproxen with β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, **48**, (1988) 83-89.
- ESCLUSA-DIAZ, T., TORRES-LABANDEIRA, J.J., ECHEZARRETA-LOPEZ, M., PEREZ-MARCOS, M.B. y VILA-JATO, J.L. Métodos para la preparación de complejos de inclusión con ciclodextrinas. *Ind. Farm.*, **10**, (2) (1995) 77-84.
- FRIJLINK, H.W., SCHOONEN, A.J.M. y LERK, C.F., The effects of cyclodextrins on drug absorption. I. *In vitro* observations. *Int. J. Pharm.*, **49**, (1989) 91-102.
- FRONZA, G., MELE, A., REDENTI, E. y VENTURA, P., Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of the inclusion complex of piroxicam with β -cyclodextrin. *J. Pharm. Sci.*, **81**, (12) (1992) 1162-1165.
- FROMING, K.H. y SZEJTLI, J. (Eds.), Cyclodextrins in Pharmacy, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994
- FUJIOKA, K., KUROSAKI, Y., SATO, S., NOGUCHI, T., NOGUCHI, T. y YAMAHIRA, Y., Biopharmaceutical study of inclusion complexes. I. Pharmaceutical advantages of cyclodextrin complexes of bencyclane fumarate. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, (7) (1983) 2416-2423.

- GANDHI, R.B. y KARARA, A.H., Characterization, dissolution and diffusion properties of tolbutamide- β -cyclodextrin complex system. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **14**, (5) (1988) 657-682.
- GANZA-GONZALEZ, A. VILA-JATO, J.L., ANGUIANO-IGEA, S., OTERO-ESPINAR, F.J. y BLANCO-MENDEZ, J., A proton nuclear magnetic resonance study of the inclusion complex of naproxen with β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, **106**, (1994) 179-185.
- GELB, R.I., SCHWARTZ, L.M., MURRAY, C.T. y LAUFER, D.A., Complexation of 4-biphenylcarboxilate by cyclohexaamyloses. A conductimetric and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectrometric analysis. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, (1978) 3553-3559.
- GIALNE-FUZY, M., SZENTE, L., SZEJTLI, J. y HARANJI, J., Cyclodextrin-stabilized volatile substances for inhalation therapy. *Pharmazie*, **39**, (1984) 558-559.
- GIDLEY, M.J. y BOCIEK, S.M., ^{13}C CP/MAS NMR studies of amylose inclusion complexes, cyclodextrins, and the amorphous phase of starch granules: relationships between glycosidic linkage conformation and solid-state ^{13}C chemical shifts. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, (1988) 3820-3829.
- GINES, J.M., RABASCO, A.M. y CHEMTOB, C., Elaboration et étude de l'inclusion du triamtrène dans la β - et hydroxypropyl- β -cyclodextrines. *Proceedings 6th International Conference on Pharmaceutical Technology*, Paris, Junio, 1992, pp. 375-385
- GINES, J.M., RABASCO, A.M., ARIAS, M.J., CHEMTOB, C., JUSTO, A. y SANCHEZ-SOTO, P.J., SEM as a tool to study the intrinsic dissolution rates of solid dispersions en *Electron Microscopy 92* (ed.: L. Megías, M.I. Rodríguez, A. Ríos, J.M. Arias), Ed. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Granada, Granada, Septiembre, 1992, vol. III (Biological Sciences), pp. 919-920
- GINES, J.M., ARIAS, M.J., RABASCO, A.M., GOMEZ, E. y SANCHEZ-SOTO, P.J., SEM characterization of cyclodextrins applied in the pharmaceutical technology en *Electron Microscopy 92* (ed.: L. Megías, M.I. Rodríguez, A. Ríos, J.M. Arias), Ed. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Granada, Granada, Septiembre, 1992, vol. III (Biological Sciences), pp. 921-922

- GIORDANO, F., PAVAN, M., LA MANNA, A., BETTINETTI, G.P., PAVESI, L. y BOVIS, G., Complexation behaviour of vinburnine with β - and γ - ciclodextrins in aqueous solution and in the solid state. *Farmaco ed. pr.*, **43**, (11) (1988) 345-355.
- GIORDANO, F. y LA MANNA, A., Molecular inclusion complexes with β -cyclodextrin. *J. Drug Dev.*, **4**, (Suppl. 1), (1991), 13-15.
- GIORDANO, F., BRUNI, G. y BETTINETTI, G.P., Solid-state microcalorimetry on drug-cyclodextrin binary systems. *J. Therm. Anal.*, **38**, (1992) 2683-2691.
- GLOMOT, F., BENKERROUR, L., DUCHENE, D. y POELMAN, M.C., Improvement in availability and stability of a dermocorticoid by inclusion in β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, **46**, (1988) 49-55.
- GREEN, A.R., MILLER, E.S. y GUILLORY, J.K., Physical properties of the complexes formed between heptakis (2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin and chlorambucil. *J. Pharm. Sci.*, **80**, (2) (1991) 186-189.
- GUO, Q, LI, Z., REN, T., ZHU, X. y LIU, Y., Inclusion complexation of sodium alkyl sulfates with β -cyclodextrin. A ^1H NMR study. *J. Inclus. Phenom.*, **17**, (1994) 149-156.
- HAMILTON, J.A. y CHEN, L., Crystal structures and inclusion complexes of β -cyclodextrin with (S)-(+)- and R-(-)-fenpropfen. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, (110) 4379-4391.
- HANAWA, T, YONEMOCHI, E., OGUCHI, T., NAKAI, Y. y YAMAMOTO, K., Thermal behavior of ground mixtures of heptakis (2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin and benzoic acid. *J. Inclus. Phenom.*, **15**, (1993) 91-101.
- HARATA, K., UEKAMA, K., IMAI, T. HIRAYAMA, F. y OTAGIRI, M., Crystal structures of heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrin complexes with (R)- and (S)-flurbiprofen. *J. Inclus. Phenom.*, **6**, (1988) 443-460.
- HASSAN, M.A., SULEIMAN, M.S. y NAJIB, N.M., Improvement of the *in vitro* dissolution characteristics of famotidine by inclusion in beta-cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, **58**, (1990) 19-24.
- HIGUCHI, T. y CONNORS, K.A., Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instr.*, **4**, (1965) 117-212.

- HIRAYAMA, F. y UEKAMA, K., Methods of investigating and preparing inclusion compounds. En Cyclodextrins and their industrial uses (Ed. D. Duchêne), Editions de Santé, Paris, 1987
- HIRAYAMA, F., HIRASHIMA, N., ABE, K., UEKAMA, K., IJITSU, T. y UENO, M., Utilization of diethyl- β -cyclodextrin as a sustained release carrier for isosorbide dinitrate. *J. Pharm. Sci.*, **77**, (3) (1988) 233-236.
- HIRAYAMA, F., UTSUKI, T., UEKAMA, K., YAMASAKI, M. y HARATA, K., Prominent inclusion effect of dimethyl- β -cyclodextrin on photoisomerization of the thromboxane synthetase inhibitor (E)-4(1-imidazolylmethyl)cinnamic acid. *J. Pharm. Sci.*, **81**, (8) (1992) 817-822.
- HOLMES, B., HEEL, R.C., BROGDEN, R.N., SPEIGHT, T.M. y AVERY, G.S., Gliclazide. A preliminary review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in diabetes mellitus. *Drugs*, **27**, (1984) 301-327.
- HORIUCHI, Y., HIRAYAMA, F. y UEKAMA, K., Slow release characteristics of diltiazem from ethylated β -cyclodextrin complexes. *J. Pharm. Sci.*, **79**, (2) (1990) 128-132.
- IKEDA, K., UEKAMA, K. y OTAGIRI, M., Inclusion complexes of β -cyclodextrin with antiinflammatory drug fenamates in aqueous solution. *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, (1) (1975) 201-208.
- IMAI, T., OTAGIRI, M., SAITO, H. y UEKAMA, K., Inclusion mode of flurbiprofen with β -cyclodextrin, and heptakis (2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrin, and improvements of some pharmaceutical properties of flurbiprofen by complexation. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, (1) (1988) 354-359.
- INOUE, Y., KUAN, F.H. y CHUJO, R., ^1H and ^{13}C NMR studies of formation and molecular dynamics of methylated-cyclodextrins inclusion complexes with phenylalanine. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, (1987) 2539-2545.
- INOUE, Y., KITAGAWA, M., HOSHI, H., SAKURAI, M. y CHUJO, R., Geometry of α -cyclodextrin inclusion complex with *m*-nitrophenol deduced from quantum chemical analysis of carbon-13 chemical shifts. *J. Inclus. Phenom.*, **5**, (1987) 55-58.

- ISMAIL, S., β -cyclodextrin as a direct compression excipient compared to conventional ones. *J. Pharm. Belg.*, **48**, (5) (1993) 371-377.
- JAYACHANDRA-BABU, R. y PANDIT, J.K., Enhancement of dissolution rate and hypoglycemic activity of glibenclamide with β -cyclodextrin. *S.T.P. Pharma Sciences*, **5**, (3) (1995) 196-201.
- JOB, P., Recherches sur la formation de complexes minéraux en solution et sur leur stabilité. *Ann. Chim.*, **10**, (1928) 113-203.
- KEDZIEREWICZ, F., HOFFMAN, M. y MAINCENT, P., Comparison of tolbutamide- β -cyclodextrin inclusion compounds and solid dispersions. Physicochemical characteristics and dissolution studies. *Int. J. Pharm.*, **58**, (1990) 221-227.
- KITAMURA, S., SHIGETAKA, K. y YASUDA, T., Moisture adsorption-desorption effect on the structure of inclusion complex of 6-chloro-2-pyridylmethyl nitrate and β -cyclodextrin. *J. Pharm. Pharmacol.*, **42**, (9) (1990) 611-614.
- KOBAYASHI, K., KIMURA, M., SAKOGUCHI, T., HASE, A., MATSUOKA, A. y KANAKO, S., Pharmacokinetics of gliclazide in healthy and diabetic subjects. *J. Pharm. Sci.*, **73**, (12) (1984) 1684-1687.
- KOHATA, S., JYODOI, K. y OHYOSHI, A., Thermal decomposition of cyclodextrins (α -, β -, γ -, and modified β -CyD) and of methal-(β -CyD) complexes in the solid phase. *Thermochim. Acta*, **217**, (1993) 187-198.
- KRENN, M., GAMCSIK, M.P., VOGELSANG, G.B. y COLVING, O.M., Improvements in solubility and stability of thalidomide upon complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J. Pharm. Sci.*, **81**, (7) (1992) 685-689.
- LEROY-LECHAT, F., WOUESSIDJEW, D., HERRENKNECHT, C. y DUCHENE, D., Preparation and stability of iodine/ α -cyclodextrin inclusion complex. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **18**, (17) (1992) 1853-1863.
- LIN, S.Y., KAO, Y.H. y YANG, J.C., Grinding effect on some pharmaceutical properties of drugs by adding β -cyclodextrin. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **14**, (1) (1988) 99-118.

- LIN, S.Y. y LEE, C.S., The effect of mechanical grinding on the formation and crystallinity changes of the inclusion complex of acetaminophen and β -cyclodextrin. *J. Inclus. Phenom.*, **7**, (1989) 477-485.
- LIN, S.Y., Effect of humidity on the formation and stability of acetaminophen- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **16**, (15) (1990) 2221-2241.
- LIN, S.Y. y PERNG, R., Inclusion complex formation of acetaminophen by heating and cogrinding with cyclodextrins. *J. Inclus. Phenom.*, **14**, (1992) 149-156.
- LING, S.Z., WOUESSIDJEW, D., POELMAN, M.C. y DUCHENE, D., Indomethacin and cyclodextrin complexes. *Int. J. Pharm.*, **69**, (1991) 211-219.
- LIU, F.Y., KILDSIG, D.O. y MITRA, A.K., Complexation of 6-acyl-O- β -cyclodextrin derivatives with steroids. Effects of chain length and substitution degree. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **18**, (15) (1992) 1599-1612.
- LIVERI, V.T., CAVALLARO, G., GIAMMONA, G., PITARRESI, G., PUGLISI, G. y VENTURA, C., Calorimetric investigation of the complex formation between surfactants and α - and β -cyclodextrins. *Thermochim. Acta*, **199**, (1992) 125-132.
- LOFTSSON, T., OLAFSDOTTIR, B.J., FRIDRIKSDOTTIR, H., Comparative study on inclusion complexation of acetylsalicylic acid, cholecalciferol and melphalan with β - and γ -cyclodextrin and some of their derivatives. *Acta Pharm. Nord.*, **2**, (5) (1990) 303-312.
- MATSUYAMA, K., EL-GIZAWY, S. y PERRIN, J.H., Thermodynamics of binding of aromatics aminoacids to α -, β - and γ -cyclodextrin. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **13**, (15) (1987) 2687-2691.
- MAZZI, G., VINCIERI, F.F., FORNI, F., MULINACCI, N. y CELLI, S., Formation of inclusion complex between the non-steroidal anti-inflammatory drug (RS)-2-(4-isobutylphenyl)-propiohydroxamic acid and β -cyclodextrin. *Acta Pharm. Technol.*, **34**, (1) (1988) 17-21.
- MCCORMACK, B. y GREGORIADIS, G., Drugs-in-cyclodextrins-in liposomes: a novel concept in drug delivery. *Int. J. Pharm.*, **112**, (1994) 249-258.
- MENARD, F.A., DEDHIYA, M.G. y RHODES, C.T., Potential pharmaceutical applications of a new beta cyclodextrin derivatives. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **14**, (11) (1988) 1529-1547.

- MIYAJI, T., INOUE, Y., ACARTURK, F., IMAI, T., OTAGIRI, M. y UEKAMA, K., Improvement of oral bioavailability of fenbufen by cyclodextrin complexations. *Acta Pharm. Nord.*, **4**, (1) (1992) 17-22.
- MOYANO, J.R., Estudio biofarmacéutico y estructural de inclusiones de oxacepam con diferentes ciclodextrinas. *Tesis de Licenciatura*, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 1993.
- MOYANO, J.R., GINES, J.M., ARIAS, M.J. y RABASCO, A.M., Evaluation of dissolution characteristics of oxazepam-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin binary systems. *Pharm. Acta Helv.*, **69**, (1994) 81-90.
- MOYANO, J.R., GINES, J.M., ARIAS, M.J. y RABASCO, A.M., Utilidad de ciclodextrinas y derivados en el campo farmacéutico (I). *Ind. Farm.*, **9**, (4) (1994) 71-76.
- MOYANO, J.R., GINES, J.M., ARIAS, M.J. y RABASCO, A.M., Métodos de elaboración de compuestos de inclusión con ciclodextrinas (II). *Ind. Farm.*, **10**, (1) (1995) 57-63.
- MOYANO, J.R., GINES, J.M., ARIAS, M.J. y RABASCO, A.M., Application of the complexation with γ -cyclodextrin on the improvement of dissolution characteristics of oxazepam. *Il Farmaco*, **50**, (11), 791-799 (1995).
- MOYANO, J.R., GINES, J.M., ARIAS, M.J. y RABASCO, A.M., Study of the dissolution characteristics of oxazepam via complexation with β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, **114**, (1995) 95-102.
- MOYANO, J.R., ARIAS, M.J., GINES, J.M., RABASCO, A.M., PEREZ-MARTINEZ, J.I., MOR, M. y GIORDANO, F., NMR investigations of the inclusion complexation of gliclazide with β -cyclodextrin. *J. Pharm. Sci.* (1996a) (en prensa).
- MOYANO, J.R., GINES, J.M., ARIAS, M.J. PEREZ-MARTINEZ, J.I. y RABASCO, A.M., Dissolution behaviour of oxazepam in presence of cyclodextrins: evaluation of oxazepam - DIMEB binary system. *Drug Dev. Ind. Pharm.* (1996b) (en prensa).
- MULLER, B.W. y ALBERS, E., Complexation of dihydropyridine derivatives with cyclodextrins and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in solution. *Int. J. Pharm.*, **79**, (1992) 273-288.

- MULINACCI, M, MELANI, F., MAZZI, G. y VINCIERI, F.F., Molecular modelling and NMR NOE experiments: complementary tools for the investigation of complex ibuproxam- β -cyclodextrin topology. *Int. J. Pharm.*, **90**, (1993) 35-41.
- NAKAI, Y., NAKAJIMA, S., YAMAMOTO, K., TERADA, K. y KONNO, T., Effects of grinding on the physical and chemical properties of crystalline medicinals with microcrystalline cellulose V: comparison with tri-O-methyl- β -cyclodextrin ground mixtures. *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, (5) (1980) 1152-1558.
- NAKAI, Y., YAMAMOTO, K., TERADA, K. y WATANABE, D., New methods for preparing cyclodextrin inclusion compounds I. Heating in a sealed container. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, (11) (1987) 4609-4615.
- NAKAI, Y., YAMAMOTO, K., TERADA, K. y EL-GENDY, G.A., Effects of solid dispersion with Heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin on the dissolution and sublimation of naphthalene. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, (10) (1988) 4039-4044.
- NAKAI, Y., YAMAMOTO, K., TERADA, K., OGUCHI, T., SAITO, H. y WATANABE, D., New methods for preparing cyclodextrin inclusion compounds. II. Effects of heating temperature, water content and drug properties on the inclusion formation. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, (4) (1989) 1055-1058.
- NAKAI, Y., ABOUTALEB, A.E.S., YAMAMOTO, K., SALEH, S.I. y AHMED, M.O., Study of the interaction of clobazam with cyclodextrins in solution and in the solid state. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, (3) (1990) 728-732.
- NAKAI, Y., YAMAMOTO, K., OGUCHI, T., YONEMOCHI, E. y HANAWA, T., New methods for preparing cyclodextrin inclusion compounds.IV. Enhancement of combining molar ratio by using a ground mixture in heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin and benzoic acid system. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, (6) (1991) 1532-1535.
- NDOU, T., MUKUNDAN, S. y WARNER, I.M., Complexation of ephedrine with β -cyclodextrin: a NMR spectroscopy study. *J. Inclus. Phenom.*, **15**, (1993) 9-25.
- NOVAK, C., ARIAS, M.J., GINES, J.M., IZVEKOV, V. y POKOL, G., Investigation of the cyclodextrin complexes of mandelic acid derivatives. *Proceedings 7th International Cyclodextrins Symposium*, Tokyo, Abril, 1994, pp. 206-209

- NOZAWA, Y., OSADA, N. y KISHIMOTO, H., Dissolution behaviour of water-insoluble drugs roll mixed with β -cyclodextrin and its complexations in amorphous solid mixture. *Pharm Ind.*, **53**, (7) (1991) 691-694.
- OTAGIRI, M., MIYAJI, T., UEKAMA, K. e IKEDA, K., Inclusion complexation of barbiturates with β -cyclodextrin in aqueous solution. I. Spectroscopic study on the mode of interaction. *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, (6) (1976) 1146-1154.
- OTERO-ESPINAR, F.J., ANGUIANO-IGEA, S., TORRES LABANDEIRA, J.J, BLANCO-MENDEZ, J. y VILA-JATO, J.L., Influence of the pH medium on the obtention of inclusion compounds by the coprecipitation method. *Proceedings of the 5th International Conference on Pharmaceutical Technology*, Paris, Mayo-Junio, 1989, vol. V, pp. 137-143
- OTERO-ESPINAR, F.J., ANGUIANO-IGEA, S., BLANCO-MENDEZ, J. y VILA-JATO, J.L., Reduction in the ulcerogenicity of naproxen by complexation with β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, **70**, (1991) 35-41.
- PALMER, K.J. y BROGDEN, R.N., Gliclazide. An update of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Drugs*, **46**, (1993) 93-125.
- PALMIERI, G.F., WEHRLE, P. y STAMM, A., Inclusion of vitamin D2 in β -cyclodextrin. Evaluation of different complexation methods. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **19**, (8) (1993) 875-885.
- PARROT-LOPEZ, H., DJEDAINI, F., PERLY, B., COLEMAN, A.W., GALONS, H. y MOICQUE, M., An approach to vectorisation of pharmacologically active molecules: the covalent binding of leu-enkephalin to a modified β -cyclodextrin. *Tetrahedron*, **31**, (14) (1990) 1999-2002.
- PEREZ-MARTINEZ, J.I., GINES, J.M., ARIAS, M.J., MOYANO, J.R., RABASCO, A.M. y MORILLO, E., Preparation and characterisation of 2,4-D complexes with beta-cyclodextrin, *Proceedings 14th Pharmaceutical Technology Conference*, Barcelona, Abril, 1995, pp. 235-251
- PERI, D., WYANDT, C.M., CLEARY, R.W., HIKAL, A.H. y JONES, A.B., Inclusion complexes of tolinaftate with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **20**, (8) (1994) 1401-1410.

- PITHA, J. y PITHA, J., Amorphous water-soluble derivatives of cyclodextrins: nontoxic dissolution enhancing excipients. *J. Pharm. Sci.*, **74**, (9) (1985) 987-990.
- PITHA, J., ANAISSIE, E.J. y UEKAMA, K., γ -cyclodextrin: testosterone complex suitable for sublingual administration. *J. Pharm. Sci.*, **76**, (10) (1987) 788-790.
- PITHA, J., Amorphous water-soluble cyclodextrin derivatives: 2-Hydroxypropil, 3-Hydroxypropil, 2-Hydroxyisobutyl and Carboxymidomethyl derivatives of β -Cyclodextrin. *Pharm. Res.*, **5**, (1988) 713-717.
- PITHA, J. y HOSHINO, T., Effects of ethanol on formation of inclusion complexes of hydroxypropylcyclodextrins with testosterone or with methyl orange. *Int. J. Pharm.*, **80**, (1992) 243-251.
- PITHA, J., HOSHINO, T., TORRES-LABANDEIRA, J. e IRIE, T., Preparation of drug:hydroxypropylcyclodextrins complexes by a method using ethanol or aqueous ammonium hydroxide as co-solubilizers. *Int. J. Pharm.*, **80**, (1992) 253-258.
- PRANKERD, R.J., STONE, H.W., SLOAN, K.B. y PERRIN, J.H., Degradation of aspartame in acidic aqueous media and its stabilization by complexation with cyclodextrins or modified cyclodextrins. *Int. J. Pharm.*, **88**, (1992) 189-199.
- PUGLISI, G., SANTAGATI, N.A., PIGNATELLO, R., VENTURA, C., BOTTINO, F.A., MANGIAFICO, S. y MAZZONE, G., Inclusion complexation of 4-biphenylacetic acid with β -cyclodextrin. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **16**, (3) (1990) 395-413.
- PUGLISI, G., SANTAGATI, N.A., VENTURA, C., PIGNATELLO, R., PANICO, A.M. y SPAMPINATO, S., Enhancement of 4-biphenylacetic acid bioavailability in rats by its β -cyclodextrin complex after oral administration. *J. Pharm. Pharmacol.*, **43**, (1991) 430-432.
- RAHMAN, A.A.A., KHIDR, S.H., AHMED, M.O. y ABOUTALEB, A.E., Evaluation of chloramphenicol- β -cyclodextrin inclusion complex. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **37**, (1) (1991) 34-37.
- RAHMAN, A.A.A., SALEH, S.I., NAKAI, Y., ABOUTALEB, A.E. y AHMED, M.O., Inclusion complexation between trimethyl- β -cyclodextrin and clobazam or flunitrazepam during sealed heating. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **39**, (2) (1993) 82-86.

- RAJAGOPALAN, N., CHEN, S.C. y CHOW, W.S., A study of the inclusion complex of amphotericin-B with γ -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, **29**, (1986) 161-168.
- REYNOLDS, J.E.F. (Ed.), Martindale: The Extra Pharmacopeia, 30th ed., The Pharmaceutical Press, London, 1993
- RIPMEESTER, J.A., CP/MAS ^{13}C NMR study of dianin's compound [4-(*p*-hydroxyphenyl)-2,2,4-trimethylchroman] clathrates. *J. Inclus. Phenom.*, **1**, (1983) 87-91.
- RIPMEESTER, J.A., NMR studies on solid cyclohexaamylose inclusion compounds. *J. Inclus. Phenom.*, **4**, (1986) 129-134.
- RUSSELL, N.R., McNAMARA, M., FT-IR and Raman spectral evidence for metal complex formation with β -cyclodextrin as a first sphere ligand. *J. Inclus. Phenom.*, **7**, (1989) 455-460.
- SAENGER, W., Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.*, **19**, (1980) 344-362.
- SHANGRAW, R.F., PANDE, G.S., GALA, P., Characterization of the tableting properties of β -cyclodextrin and the effects of processing variables on inclusion complex formation, compactibility and dissolution. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **18**, (17) (1992) 1831-1851.
- SCOTT, R.L., Some comments on the Benesi-Hildebrand equation. *Rec. Trav. Chim.*, **75**, (1956) 787-789.
- SEKIKAWA, H., FUKUDA, N., TAKADA, M., OHTANI, K. ARITA, T. y NAKANO, M., Dissolution behavior and gastrointestinal absorption of dicumarol from solid dispersion system of dicumarol-polivynilpirrolidone and dicumarol- β -cyclodextrin. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, (4) (1983) 1350-1356.
- SENEL, S., CAKOGLU, O., SUMNU, M., DUCHÊNE, D. y HINCAL, A.A. Preparation and investigation of the tenoxicam/ β -cyclodextrin complex. *J. Inclus. Phenom.*, **14**, (1992) 171-179.
- SI-NANG, L., CHAPERON, F., LEINOT, M. y POURRAT, A., Enhancement of pharmacological activity of CERM 3276 with a ground mixture of β -cyclodextrin in mice. *Pharm. Acta Helv.*, **62**, (12) (1987) 335-336.

- SI-NANG, L., BOBIER-RIVAL, C., SEJALON, C. y POURRAT, A., Use of β -cyclodextrin to enhance solubility of CERM 11884: potential value in preformulation. *Pharm. Acta Helv.*, **64**, (7) (1989) 188-191.
- STEFFAN, B., FISCHER, W., CORDES, G., HABON, I. y MÜLLER, R., ^1H -nuclear magnetic resonance (NMR) studies on the inclusion complex of prostaglandin E_1 (PGE_1) with α -cyclodextrin. *Pharm. Res.*, **9**, (4) (1992) 575-577.
- SUENAGA, A., BEKERS, O., BEIJNEN, J.H., UNDENBERG, W.J.M., TANIMOTO, T., KOIZUMI, K. y OTAGIRI, M., Stabilization of daunorubicin and 4-demethoxydaunorubicin on complexation with octakis(2,6-di-*O*-methyl)- γ -cyclodextrin in acidic aqueous solution. *Int. J. Pharm.*, **82**, (1992) 29-37.
- SYBYL Theory Manual, Tripos Inc., St. Louis USA.
- SZAFRANEK, A. y SZAFRANEK, J., Thermogravimetric properties of inclusion complexes of β -cyclodextrin with benzene, acetylsalicylic acid and methyl salicylate. *J. Inclusion Phenom.*, **15**, (1993) 351-358.
- SZEJTLI, J., BOLLA-PUSZTAI, J., SZABO, E. y FERENCZY, T., Enhancement of stability and biological effect of cholecalciferol by cyclodextrin complexation. *Pharmazie*, **35**, (1980) 779-787.
- SZEJTLI J., (Editor), "Cyclodextrins and their inclusion complexes", Akademiai Kiado, Budapest, 1982
- SZEJTLI, J., Dimethyl- β -cyclodextrin as parenteral drug carrier. *J. Inclusion Phenom.*, **1**, (1983) 135-150.
- SZEJTLI, J., Highly soluble β -cyclodextrin derivatives. *Starch/Stärke*, **36**, (12) (1984) 429-432.
- SZEJTLI, J. (Editor), "Cyclodextrin technology", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1988
- SZEJTLI, J., The properties and potential uses of cyclodextrin derivatives. *J. Inclusion Phenom.*, **14**, (1992) 25-36.

- SZEMAN, J., UEDA, H., SZEJTLI, J., FENYVESI, E., MACHIDA, Y. y NAGAI, T., Complexation of several drugs with water-soluble cyclodextrin polymer. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, (1) (1987) 282-288.
- SZENTE, L. y SZEJTLI, J., Wettability of cyclodextrin complexes. *Acta Pharm. Hung.*, **57**, (1987) 73-76.
- SZENTE, L., APOSTOL, I. y SZEJTLI, J., Suppositories containing β -cyclodextrin complexes. Part 1. Stability studies. *Pharmazie*, **39**, (1985) 697-699.
- TAN, X. y LINDENBAUM, S., Studies on complexation between β -cyclodextrin and bile salts. *Int. J. Pharm.*, **74**, (1991) 127-135.
- TOKUMURA, T., NANBA, M., TSUSHIMA, Y., TATSUISHI, K., KAYANO, M., MACHIDA, Y. y NAGAI, T., Enhancement of bioavailability of cinnarizine from its β -cyclodextrin complex on oral administration with DL-phenylalanine as a competing agent. *J. Pharm. Sci.*, **75**, (4) (1986) 391-394.
- TORRES-LABANDEIRA, J.J., OTERO-ESPINAR, F., ANGUIANO-IGEA, S., BLANCO-MENDEZ, J. y VILA-JATO, J.L., Influence of storage on the biopharmaceutical properties of the tolbutamide/ β -cyclodextrin inclusion complex. *S.T.P. Pharma Sciences*, **1**, (5) (1991) 326-330.
- TORRES-LABANDEIRA, J.J., ECHEZARRETA-LOPEZ, M., SANTANA-PENIN, L. y VILA-JATO, J.L., Glibornuride- β -cyclodextrin inclusion complexes: preparation, structural characterization and in vitro dissolution behaviour. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **39**, (6) (1993) 255-259.
- TOUS, S.S., Availability of nitrofurantoin/ β -cyclodextrin inclusion complex. *S.T.P. Pharma Sciences*, **6**, (9) (1990) 635-643.
- UEKAMA, K., HIRAYAMA, F., ESAKI, K. y INOUE, M., Inclusion complexes of cyclodextrins with cinnamic acid derivatives: dissolution and thermal behavior. *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, (1) (1979) 76-79.

- UEKAMA, K., FUJINAGA, T., HIRAYAMA, F., OTAGIRI, M., YAMASAKI, M., SEO, H., HASHIMOTO, T. y TSUROKA, M., Improvement of the oral bioavailability of digitalis glycosides by cyclodextrin complexation. *J. Pharm. Sci.*, **72**, (11) (1983) 1338-1341.
- UEKAMA, K., FUJINAGA, T., OTAGIRI, M., MATSUO, N. y MATSUOKA, Y., Improvement of dissolution and chemical stability of proscillaridin by cyclodextrin complexation. *Acta Pharm. Suec.*, **20**, (1983) 187-294.
- UEKAMA, K., OH, K., OTAGIRI, M., SEO, H. y TSURUOKA, M., Improvement of some pharmaceutical properties of clofibrate by cyclodextrin complexation. *Pharm. Acta Helv.*, **58**, (12) (1983) 338-342.
- UEKAMA, K., HIRAYAMA, F., FUJISE, A., OTAGIRI, M., INABA, K. y SAITO, H., Inclusion complexation of prostaglandin F_{2α} with γ-cyclodextrin in solution and solid phases. *J. Pharm. Sci.*, **32**, (3) (1984) 382-384.
- UEKAMA, K. y OTAGIRI, M., Comparative study on inclusion complexation of β-cyclodextrin and tri-O-methyl-β-cyclodextrin. *Acta Pharm. Suec.*, **6**, (21) (1984) 357-365.
- UEKAMA, K., Pharmaceutical applications of methylated cyclodextrins. *Pharm. Int.*, **8**, (1985) 778-791.
- UEKAMA, K. e IRIE, T., Protection against the photosensitized skin irritancy of chlorpromazine by cyclodextrin complexation. *J. Pharmacobiol. Dyn.*, **8**, (1985) 778-791.
- UEKAMA, K., HIRASHIMA, N., HORIUCHI, Y., HIRAYAMA, F., IJITSU, T. y UENO, M., Ethylated β-cyclodextrins as hydrophobic drugs carriers: sustained release of diltiazem in the rat. *J. Pharm. Sci.*, **76**, (1987) 660-661.
- UEKAMA, K., ARIMORI, K., SAKAI, A., MASAKI, K., IRIE, T. y OTAGIRI, M., Improvement in percutaneous absorption of prednisolone by β- and γ-cyclodextrin complexations. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, (7) (1987) 2910-2913.
- UEKAMA, K., IKEGAMI, K., WANG, Z., HORIUCHI, Y. y HIRAYAMA, F., Inhibitory effect of 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin on crystal growth of nifedipine during storage: superior dissolution and oral bioavailability compared with polyvinylpyrrolidone K-30. *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, (1992) 73-78.

- UEKAMA, K., SHIOTANI, K., IRIE, T., ISHIMARU, Y. y PITHA, J., Protective effects of cyclodextrin sulphates against gentamicin-induced nephrotoxicity in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.*, **45**, (16) (1993) 745-747.
- USP 23: The United States Pharmacopeia, 23rd rev., 1995
- VAN DOORNE, H. y BOSCH, E.H., Stability and in vitro activity of nystatin and its γ -cyclodextrin complex against *Candida albicans*. *Int. J. Pharm.*, **73**, (1991) 43-49.
- VANHOEVE, M, COURTEILLE, F., SANTONJA, R. y VUILHORGNE, M., Etude de l'inclusion d'un anti-inflamatoire non steroïden à la β -cyclodextrine. *Proceedings of the 5th International Conference on Pharmaceutical Technology*, Paris, Mayo-Junio, 1989, vol. V, pp. 153-161
- VENEMAN, T.F., VAN HAEFTEN, T.W., y VAN DER VEEN, E.A., Effect of acute administration of gliclazide on the glucose sensitivity of pancreatic β -cells in healthy subjects. *Clin. Sci.*, **81**, (1991) 101-106.
- VENTURA, C., PUGLISI, G., GIAMMONA, G. y BOTTINO, F.A., Comparative study on inclusion compounds of 4-biphenylacetic acid with β -cyclodextrin, hydroxypropylated- β -cyclodextrins, and methylated- β -cyclodextrins. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **20**, (14) (1994) 2245-2265.
- VIKMON, M., STADLER-SZÖKE, A. y SZEJTLI, J., Solubilization of amphotericin-B with γ -cyclodextrin. *J. Antibiotics*, **38**, (12) (1985) 1822-1823.
- VILA-JATO, J.L., BLANCO, J. y TORRES, J.J., Biopharmaceutical aspects of the glibornuride- β -cyclodextrin inclusion compound. *S.T.P. Pharma Sciences*, **3**, (1) (1987) 28-32.
- VINCIERI, F.F., MAZZI, G., PAPINI, P. y GELSOMINI, N., Monitoring by headspace gas chromatography (HSGC) of essential oils- β -cyclodextrin inclusion complexation. The case of *Cinnamomum zeilanicum* essential oil. *Pharm. Acta Helv.*, **63**, (9-10) (1988) 282-286.
- WANG, Z., HORIKAWA, T., HIRAYAMA, F. y UEKAMA, K., Design and in-vitro evaluation of a modified-release oral dosage form of nifedipine by hybridization of hydroxypropyl- β -cyclodextrin and hydroxypropylcellulose. *J. Pharm. Pharmacol.*, **45**, (1993) 942-946.

- WIESE, M. CORDES, H.P. CHI, P., SEYDEL, J.K., BACKENSFELD, T. y B.W. MÜLLER, Interaction of prostaglandin E₁ with α -cyclodextrin in aqueous systems: stability of the inclusion complex. *J. Pharm. Sci.*, **80**, (2) (1991) 186-189.
- WINTERS, C.S., SHIELDS, L., TIMMINS, P. y YORK, P., Solid-state properties and crystal structure of gliclazide. *J. Pharm. Sci.*, **83**, (3) (1994) 300-304.
- YAMAMOTO, M., HIRAYAMA, F. y UEKAMA, K. Improvement of stability and dissolution of prostaglandin E₁ by maltosyl- β -cyclodextrin in lyophilized formulation. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, (3) (1992) 747-751.
- YOSHIDA, A., ARIMA, H., UEKAMA, K. y PITHA, J., Pharmaceutical evaluation of hydroxyalkyl ethers of β -cyclodextrins. *Int. J. Pharm.*, **46**, (1988) 217-222.
- YOSHIDA, A., YAMAMOTO, M., IRIE, T., HIRAYAMA, F. y UEKAMA, K., Properties of 3-Hydroxypropyl and 2,3-Dihydroxypropyl β -Cyclodextrins and their solubilizing and stabilizing abilities. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, (4) (1989) 1059-1063.
- ZHANG, D., CHEN, J., YANG, Y., CAI, R., SHEN, X. y WU, S., Studies on methylated β -cyclodextrins and C₆₀ inclusion complexes. *J. Inclus. Phenom.*, **16**, (1993) 245-253.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Excmo. Sr. D. [Name], [Title]

JOSE RAMON MUÑOZ MENDEZ

ESTUDIO DE EFECTOS DE COMPLEJACION DE GLUCOSA CON DIFERENTES CICLO DEXTRINAS. ESTUDIO BIOPHARMACUTICO

APTO "UN LADO" POR UNIVERSIDAD

Sevilla, 2 de diciembre de 1996

El Vocal,

[Signature]

El Vocal,

[Signature]

El Vocal,

[Signature]

El Secretario,

[Signature]

El Doctorado

[Signature]