

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**INFLUENCIA DEL ENANTIOMORFISMO EN LA SOLUBILIDAD
Y VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN DE DISTINTOS FÁRMACOS
RACÉMICOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Covadonga Álvarez Álvarez

Bajo la dirección del doctor

Juan José Torrado Durán

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-2021-8

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA



**INFLUENCIA DEL ENANTIOMORFISMO EN LA SOLUBILIDAD Y
VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN DE DISTINTOS FÁRMACOS
RACÉMICOS**

Memoria de tesis doctoral presentada por:

Dña. Covadonga Álvarez Álvarez

Dirigida por:

Dr. Juan José Torrado Durán

MADRID, OCTUBRE 2002

*A mis padres,
y a mi hermano*

A Nacho,

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento más emotivo a la memoria del Profesor Dr. Don Rafael Cadórniga Carro fallecido en Agosto de 1999. Siguiendo atentamente sus consejos decidí comenzar mi carrera investigadora realizando, bajo su tutela, mi tesis doctoral sobre fármacos racémicos, en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la U.C.M. en el año 1996. Durante los años que tuve la suerte de disfrutar de su saber aprendí muchas cosas que a lo largo de estos años me han servido para seguir adelante en este mundo de la investigación.

En segundo lugar quiero expresar mi agradecimiento al Profesor Dr. Don José Luis Lastres García, Catedrático y Director del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica por haberme permitido realizar mi tesis doctoral en el departamento a su cargo.

Mi más sincero agradecimiento también para mi otro director de tesis, Dr. Don Juan José Torrado Durán ya que gracias a su apoyo, sabiduría y consejo este proyecto de tesis doctoral ha llegado a su fin.

A la Dra. Paloma Frutos Cabanillas, Dra. María Paloma Ballesteros Papantonakis, Dra. Susana Torrado Durán y al Dr. Santiago Torrado Durán, por sus consejos y ayuda, y por tantas conversaciones y momentos agradables pasados durante todos estos años.

También deseo expresar un agradecimiento especial al Profesor Dr. Luc Delattre, director del Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Lieja en Bélgica, así como a todas las personas que integraban el departamento. Gracias a todos ellos por haberme acogido de manera tan cariñosa durante los seis meses que estuve allí. También decir que parte del trabajo que realicé durante ese tiempo me ha servido para aplicar los conocimientos adquiridos a mi tesis doctoral.

Al Profesor Dr. Irving W. Wainer, jefe del Departamento de Química Bioanalítica, en el Centro de Investigaciones Geriátricas, de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América, y también al resto de investigadores que formaban parte de su equipo.

A mis compañeros del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, tanto a los que ya se fueron Malena, Isabel, David, Cristina, Marco... como a los que continúan trabajando Rosa, Celia, Laura, José Antonio, Eva, Manoli, Paloma, Begoña, Ana Lucía, Rodrigo..., por todos los momentos, cafés y Coca-Colas agradables compartidas durante todos estos años. También al resto de profesores de este gran Departamento.

A mis padres, Benjamín y Adela, por su paciencia, apoyo y comprensión durante estos años y por tanto haber hecho posible que haya cumplido mi deseo de realizar la tesis doctoral. Al pequeño de mi casa, Miguel, por su cariño, apoyo y humor. Gracias a ellos también por haber estado a mi lado cuando más lo necesitaba en circunstancias que se alejaban de lo académico.

También para ti Nacho por haber estado a mi lado durante todos los años de la tesis y varios años de licenciatura. Gracias por haberme ayudado y escuchado, en tantos y tantos, buenos y malos momentos. En la toma de decisiones aunque... no siempre compartiésemos opiniones...siempre hemos llegado a un buen entendimiento.

A mis amigos de aquí y de allá, a los que conocí hace tiempo, como a los que han ido apareciendo al paso de la vida. Los nombres no los escribo porque los que lo son ya lo saben...

Por último deseo expresar mi agradecimiento a la Universidad Complutense de Madrid por haberme concedido la Beca de Formación de Personal Investigador y haberme permitido desplazarme al extranjero.

Gracias a todos ellos

INTRODUCCIÓN

Aproximadamente la mitad de los 700 principios activos más frecuentemente utilizados en terapéutica son moléculas quirales que se encuentran comercializadas en forma de compuestos racémicos¹. Conforme se va conociendo cuál de los enantiómeros de estas moléculas es la activa se plantea la posibilidad de utilizar comercialmente el estereoisómero puro en lugar de la mezcla racémica. Así por ejemplo, recientemente se han registrado dos formulaciones con el ketoprofeno S(+) como principio activo (Desketoprofeno® y Enantium®). Desde el punto de vista galénico la sustitución de un principio activo racémico por un enantiómero puede dar lugar a una formulación con distintas características de velocidad de disolución que la formulación inicial con el fármaco racémico. Esto es especialmente posible si en la composición de la formulación existen excipientes quirales que puedan producir interacciones con los enantiómeros que influyan en la solubilidad.

Más concretamente existen dos tipos de excipientes: ciclodextrinas e hidroxipropilmetilcelulosas, que pueden tener, al menos teóricamente esta interacción con los enantiómeros.

El objeto de esta tesis ha sido el estudio de la influencia del enantiomerismo en la solubilidad y velocidad de disolución de los siguientes fármacos: ketoprofeno, talidomida y ricobendazol.

Probablemente podemos considerar al ketoprofeno como un fármaco modelo para este tipo de estudios ya que se encuentra disponible en forma de enantiómeros puros y en forma racémica y existe bastante bibliografía sobre el mismo.

Un poco más raro, por difícil de conseguir, es la talidomida aunque recientemente se ha vuelto a utilizar y existe un renovado interés clínico en esta molécula.

Por último, se ha seleccionado el ricobendazol como un tercer fármaco, en el que nuestro grupo tiene bastante experiencia, para completar la serie de principios activos objeto de este estudio.

¹ Tomaszewski, J. Y Rumore, M.M., Stereoisomeric drugs: FDA's policy statement and the impact on drug development, Drug Dev. Ind. Pharm. 20, 119-139, 1994.

Todos estos fármacos se caracterizan por ser compuestos con un centro quiral y por tener una baja solubilidad. Debido a su pequeña solubilidad en medio acuoso decidimos estudiar su interacción con ciclodextrinas en una tesis anterior², donde concluíamos que no existían diferencias enantioselectivas en la interacción, por formación de complejos, entre las ciclodextrinas estudiadas y estos fármacos. En esta tesis que presentamos actualmente hemos añadido agentes hidrotrópicos (polivinilpirrolidonas e hidroxipropilmetilcelulosas), modificadores de pH (ácido cítrico, ácido tartárico y trietanolamina) y técnicas de solubilización por sobrepresión (autoclave), para comprobar si en estas condiciones extremas se consigue encontrar alguna diferencia enantioselectiva en la solubilidad de estos fármacos.

Además se ha estudiado el posible efecto en la velocidad de disolución enantioselectiva a partir de comprimidos matriciales de hidroxipropilmetilcelulosa.

Las técnicas analíticas enantioselectivas se basan en la utilización de procedimientos de HPLC con columnas quirales tipo AGP^{3,4}.

Con la presente Tesis se continua una línea de investigación comenzada con la tesina de licenciatura de D. José Antonio Castillo Castillo, "Aplicaciones de las β CD en la solubilización del albendazol" que se defendió en 1994. En dicha tesina se estudio las posibilidades de solubilización del albendazol, un antihelmíntico del grupo de los benzimidazol carbamatos, con distintos tipos de β ciclodextrinas y la formación y caracterización de complejos de inclusión. Este tema fue ampliado posteriormente con los trabajos de D. Javier Palomo Canales y finalizó en una reciente publicación⁵ y en la tesis doctoral descrita anteriormente de D. José Calero Montoya.

² Calero Montoya, J. Efecto de la utilización de ciclodextrinas en la solubilidad y estabilidad de aciclovir, ketoprofeno, ricobendazol y talidomida. Tesis Doctoral. U.C.M. Marzo 2001.

³ Álvarez, C., Torrado, J. J., Cadórniga, R. Stereoselectivity drug release from ketoprofen and ricobendazole matrix tablets *Chirality*, 11 (8), 611-615 (1999)

⁴ Álvarez, C., Sánchez-Brunete, J. A., Torrado, S., Torrado, J. J. Enantioselective separation of thalidomide on an immobilized alpha1-acid glycoprotein chiral stationary phase. *Chromatographia*, 52, 455-458 (2000).

⁵ Castillo, J. A., Palomo, J., García, J.J., Lastres, J. J. Bolas, F., Torrado, J. J. Preparation and characterization of albendazole β -cyclodextrin complexes. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 (12), 1241-1248 (1999).

Queremos aprovechar la ocasión para agradecer a aquellas personas e instituciones que nos han facilitado muestras para la realización de esta tesis:

- Al Dr. Mauleón de laboratorios Menarini por las muestras de ketoprofeno.
- A la empresa Grünenthal GmbH por los patrones de talidomida y a la Dra. Elena García por la talidomida calidad reactivo.
- A la empresa Chemo Ibérica (Sr. Picornel) por las muestras de ricobendazol.
- A las empresas Cerestar y Roquette por los distintos tipos de ciclodextrinas empleados en este trabajo.

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO

OBJETIVO

Determinar la posible aparición de diferencias enantioselectivas en la solubilidad y velocidad de disolución de ketoprofeno, ricobendazol y talidomida.

PLANTEAMIENTO

1. Caracterización de la estructura interna y externa. Por medio de las técnicas de difracción de Rayos X (D.R.X.), análisis térmico diferencial (D.S.C.), punto de fusión y microscopía electrónica de barrido.
2. Estudios de solubilidad en distintas condiciones:
 - Distintos pH's. Soluciones tamponadas entre 1.2 y 9.0, adición al medio de ácido cítrico o tartárico (talidomida y ricobendazol) o trietanolamina (ketoprofeno).
 - Soluciones con ciclodextrinas (β -CD, HP β CD y γ -CD).
 - Agentes hidrotrópicos (PVP o HPMC).
 - Condiciones de agitación y temperatura.
3. Estudios de velocidad de disolución a partir de comprimidos matriciales:
 - Distintas dosis (condiciones "sink" y "no sink").
 - Distintos excipientes matriciales (HPMC y polímero del ácido acrílico, Eudragit RL).

PARTE TEÓRICA

1. LA QUIRALIDAD EN LOS MEDICAMENTOS.

El fenómeno de la quiralidad ha ido tomando importancia en el transcurso de los años debido al gran número de fármacos que poseen dicha propiedad.

La asimetría molecular y la luz polarizada comienzan a estudiarse en 1815 cuando el francés Jean-Baptiste Biot observa que algunos compuestos orgánicos son capaces de hacer rotar el plano de polarización de la luz, y en 1848, el también francés Louis Pasteur realiza observaciones que le llevan años más tarde, a proponer lo que sería el fundamento de la estereoquímica al afirmar que la actividad óptica de compuestos orgánicos, y sus disoluciones, viene determinada por la asimetría molecular del producto. También se debe a Pasteur la primera observación del diferente comportamiento biológico de los enantiómeros. En efecto, en 1882 presenta una comunicación a la Academia de Ciencias de Francia en la que indica que los enantiómeros de la arginina tienen distinto sabor: un isómero es dulce y el otro insípido. Fenómeno similar ocurre con el limoneno, uno de cuyos enantiómeros huele a naranja y el otro a limón.

En el primer lustro de nuestro siglo, en el mismo año 1904, aparecen dos trabajos que demuestran el diferente comportamiento de dos fármacos: la atropina y los ésteres del ácido mandélico. Cushy comprueba que el efecto anticolinérgico de la dextro-atropina es mayor que el de la levo-atropina, y Dakin observa que la hidrólisis “*in vivo*” de los ésteres del ácido mandélico es enantioselectiva: un enantiómero se hidroliza más rápido que el otro. Son, probablemente, las dos primeras aportaciones sobre la influencia de la estereoquímica en la farmacología.

Para poder continuar con los antecedentes en el estudio de la quiralidad es necesario conocer una serie de conceptos que serán frecuentemente utilizados:

- Esteroisómeros: Son moléculas con la misma constitución pero que difieren en la ordenación espacial de ciertos átomos o agrupaciones.

- Enantiómeros: Son estereoisómeros cuyas imágenes en el espejo no son superponibles. Tienen idénticas propiedades fisico-químicas, excepto en que hacen rotar el plano de la luz polarizada en sentido opuesto, aunque en la misma cuantía (figura 1).

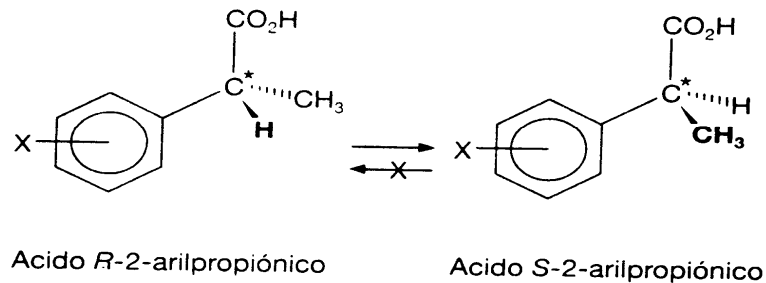


Figura 1. Ejemplo de enantiómeros

- Molécula quiral: Es una molécula que tiene al menos un par de enantiómeros. (El término quiral se usa tanto para los racémicos como para los enantiómeros puros, entendiendo por racémico la mezcla equilibrada de los dos enantiómeros).
- Centro quiral: Es el centro asimétrico (átomo de carbono al que se unen cuatro grupos diferentes). (Figura 2).

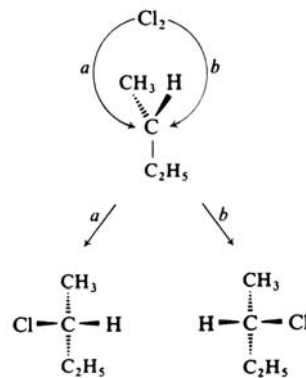


Figura 2. Ejemplo de molécula con un centro quiral y los dos posibles enantiómeros (el racémico es el compuesto formado por cantidades iguales de ambos enantiómeros)

- Diastereoisómeros: Son isómeros ópticos que no guardan la relación de un objeto y su imagen en el espejo. (Generalmente la molécula diastereoisoméricas tienen más de un centro quiral). (Figura 3)

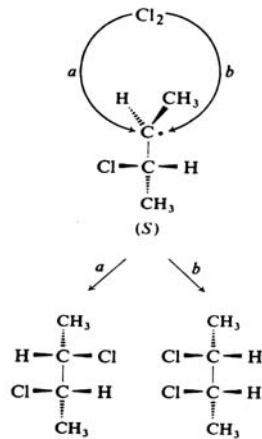


Figura 3. Ejemplo de diastereoisómeros

- Racémico: Es una mezcla equimolecular (1:1) de enantiómeros.
- Producto enantiopuro: Es un producto constituido por un solo enantiómero, sin cantidad significativa del otro.
- Estereoselectividad: Afinidad selectiva de una macromolécula, o estructura macromolecular, por uno de los dos enantiómeros con respecto al otro.
- Índice de estereoselectividad: Relación entre los valores de un determinado parámetro farmacocinético en cada uno de los dos enantiómeros. Se admite la existencia de estereoselectividad cuando el índice es mayor que 1.2.

Varios autores han especulado acerca de la notación de dichas moléculas quirales. Por ejemplo, E. Fischer en 1919 propone una notación frecuentemente inexacta y que ofrece una serie de

dificultades en su aplicación y ha sido sustituida por la propuesta por Cahn y col. conocida también como “Regla de Secuencias” ya que designa la secuencia de sustituyentes alrededor del centro de asimetría. A partir del sustituyente más voluminoso unido al átomo quiral se inicia el giro en el sentido del sustituyente que le sigue en tamaño. Si el giro tiene lugar en el sentido de las agujas del reloj, se asigna las letras R (right), y si es al contrario S (sinister). Es la notación de elección cuando se conoce la configuración absoluta de la molécula. Si no está establecida la configuración se aplica la notación (+) y (-) para diferenciar los enantiómeros.

La notación de Cahn-Ingold-Prelog resulta muy útil para describir diastereoisómeros, ya que permite desglosar la distribución de sustituyentes en cada uno de los carbonos asimétricos de la molécula. Así, la existencia de dos centros quirales originará cuatro diastereoisómeros, RR, RS, SR y SS.

Teniendo en cuenta que los organismos vivos están constituidos predominantemente por moléculas estereogénicas (L-aminoácidos, D-carbohidratos, etc...), y que los procesos vitales tienen lugar en un medio caracterizado por su quiralidad, no puede sorprender que diferentes enantiómeros de un mismo compuesto presenten distintas afinidades por distintos receptores, de lo que resultan diferencias cuantitativas, y también cualitativas, en los efectos farmacológicos que puedan desencadenar.

Es conocida la existencia de estereoespecificidad en la unión fármaco-receptor y la mayor parte de los procesos enzimáticos. Luego el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico de uno u otro enantiómero pueden ser diferentes y, de hecho, lo son con mucha frecuencia. Ello ha llevado a Lehman y col.⁶ a introducir los términos de "eutómero" y “distómero”, el primero de los cuales designa al enantiómero más activo y el segundo al que ha mostrado menos actividad biológica. Puede darse la circunstancia de que un enantiómero tenga distinta estereoselectividad para cada una de las acciones que pueda producir un determinado fármaco, de tal manera que sea eutómero con respecto a un tipo de respuesta y “distómero” con respecto a otro⁷.

⁶ Lehman, F.P.A., Rodrigues de Miranda, J.F., Ariens, E.J. "Progress in Drug Research". 20, 101, (1976).

⁷ Cao, B.J., Rodgers, R.J. Different behavioural profiles of the R(+)- and S(-)-enantiomers of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin in the murine elevated plus-maze. Behav. Pharmacol. 7(8), 810-819 (1996).

Debido a este hecho, la industria farmacéutica se ha visto obligada, para determinados fármacos, a variar sus formulaciones desarrollando otras nuevas que posean en su composición sólo aquel enantiómero responsable de la actividad.

Heydorn, director de desarrollo farmacéutico de "Synaptic Pharmaceutical Corporation", señalaba en 1995 que varias compañías farmacéuticas han adoptado la medida, de no desarrollar en el futuro ninguna mezcla racémica. Se orientaran al desarrollo de isómeros individuales, comprobar la actividad farmacológica de cada enantiómero, y desarrollar solamente aquel con acción más potente y selectiva.

Entre el 20 y el 25 % de los fármacos comercializados hoy día, son compuestos quirales y en su gran mayoría se siguen utilizando como racémicos. La consecuencia más inmediata de la estereoespecificidad, desde el punto de vista de su aplicación terapéutica, se basa en la posibilidad de que los diferentes enantiómeros presenten, entre sí, distinto comportamiento farmacodinámico, farmacocinético y toxicológico, que a su vez, puede diferir de la actividad biológica del racémico.

1.1. ESTEREOSELECTIVIDAD EN FARMACODINAMIA

La actividad farmacodinámica diferencial de los fármacos enantiómeros se conoce desde principios de este siglo, cuando Cushny⁸ demostró la potencia superior de la (-) hiosciamina respecto a la de su enantiómero (+). Esta selectividad es previsible en las interacciones entre un receptor y los fármacos, puesto que muchos ligandos naturales son quirales (P. ej. neurotransmisores, hormonas, opiáceos endógenos, etc.). A fin de racionalizar las diferencias observadas entre los enantiómeros en cuanto a su actividad farmacodinámica, Easson y Stedman⁹ propusieron un modelo de acoplamiento de tres puntos entre el receptor de mayor actividad y su receptor (figura 4).

⁸ Cushny, A.R. Biological relations of optically isomeric substances. London: Bailliere, Tindall and Cox, 1926.

⁹ Easson, L.H., stedman, E. Studies on the relationship between chemical constitution and physiological constitution. V. Molecular dissimetry and physiological activity. Biochem. J. 27, 1257-66, (1933).

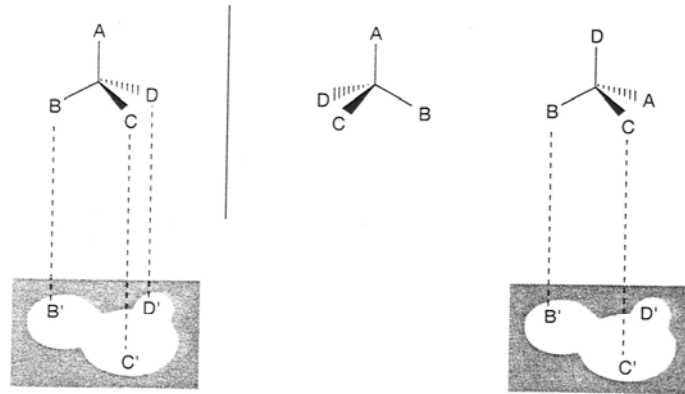


Figura 4. Ejemplo de posibles interacciones enantioméricas con una molécula biológica quiral.

Según este modelo propuesto el enantiómero con mayor actividad presentará al menos tres interacciones intermoleculares con la superficie del receptor, mientras que el menos potente sólo será capaz de interactuar con dos puntos. Así pues el acoplamiento de los enantiómeros al receptor es distinto, al igual que lo son sus energías de enlace. Pero no debemos obviar que quizás dicho modelo propuesto por Easson y Stedman sea demasiado simple, puesto que supone que el fármaco debe adoptar una orientación concreta con respecto al receptor. Además, la interacción entre el fármaco y el receptor puede producir cambios conformacionales tanto en el fármaco como en el receptor. Por tanto, el modelo de interacción final resultante podría ser mucho más complejo, teniendo en cuenta además la estereoquímica y flexibilidad conformacional del ligando.

Interesará utilizar un enantiómero en lugar del racémico si las acciones secundarias ejercidas por cada uno de ellos justifica la elección. Los dos enantiómeros (R y S) de la disopiramida¹⁰ tienen el mismo efecto antiarrítmico, pero el S tiene un efecto anticolinérgico tres o cuatro veces superior que el R. La elección se basará en elegir si interesa, o no, el discreto efecto anticolinérgico del enantiómero S en una prescripción de disopiramida.

¹⁰ Powell, J.R., Ambre, J.J., Ruo, T.I. The efficacy and toxicity of drug stereoisomers. In: Wainer, I.W., Drayer, D.E., editors. Drug stereochemistry. Analytical methods and pharmacology. New York, Marcel Dekker, 245-70, (1988).

También se conocen casos en los que los enantiómeros individuales poseen un efecto farmacológico opuesto. Por ejemplo, el enantiómero (+) del piconadol, derivado de la fenilpiperidina, es un analgésico agonista de los receptores opiáceos, mientras que el (-) actúa como antagonista de estos mismos receptores⁴. Se comprobó que el racemato muestra una actividad agonista parcial, a causa de la acción más potente ejercida por el enantiómero (+). Del mismo modo, los enantiómeros de diversos bloqueadores de los canales de calcio dihidropiridínicos quirales, utilizados en el tratamiento de la angina de pecho y la hipertensión arterial, tienen acciones opuestas sobre la funcionalidad de los canales de calcio¹¹. Los enantiómeros S actúan como potentes activadores de los canales de calcio dependientes del voltaje de tipo L, mientras que los enantiómeros R son antagonistas. En este ejemplo, los enantiómeros interaccionan con estados diferentes del canal de calcio, abierto (activado) y cerrado (inactivado) que presentan requisitos espaciales opuestos con respecto a la unión del fármaco.

Puede ser también que el efecto sea producido por sólo uno de ellos, así las acciones analgésicas y anti-inflamatoria de los derivados del ácido 2-aril propiónico se atribuyen, con carácter, casi exclusivo, al enantiómero S. Ello no implica que la forma R carezca de actividad biológica en administración oral porque algunos analgésicos del grupo presentan bioinversión¹² transformándose el enantiómero "inactivo" R en el "activo" S.

1.2. ESTEREOSELECTIVIDAD EN FARMACOCINÉTICA

La estereoselectividad se puede observar en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción, destacando sobre todo aquellos procesos que dependen de la interacción de los esteroisómeros del fármaco y una molécula biológica quiral¹³. La magnitud de las diferencias entre isómeros en cuanto a sus parámetros farmacocinéticos tiende a ser relativamente modesta, a menudo de una a tres veces¹⁴, a diferencia de las que se observan con respecto a sus propiedades farmacodinámicas; sin embargo son muy importantes.

¹¹ °Triggle, D.J. On the other hand: the stereoselectivity of drug action at ion channels. *Chirality*, 6, 58-62, (1994).

¹² Chen, C-H., Shieh, W-R, Lu, P.H., Harriman, S., Chen, C-Y. Metabolic stereoisomeric inversion of ibuprofen in mammals. *Biochim. and Biophys. Acta.* 1078, 411-417, (1991).

¹³ Caldwell, J., Winter, S.M., Hutt, A.J. The pharmacological and toxixological significance of the stereochemistry of drug dispossition. *Xenobiotica*, 18 suppl. 1, 59-70. (1988).

¹⁴ Tucker, G.T., Lennard, M.S. Enantiomer specific pharmacokinetics. *Pharmacol. Ther.* 45, 309-29, (1990).

Como consecuencia de la estereoselectividad en los procesos de disposición del fármaco, los perfiles plasmáticos de los enantiómeros de un fármaco administrado en forma racémica pueden diferir de forma notable. Así, las estimaciones de los parámetros farmacocinéticos o el examen de las relaciones entre el efecto y la concentración plasmática del fármaco que se basan en la determinación del fármaco total presente en las muestras biológicas son esencialmente carentes de sentido y potencialmente engañosas¹⁵.

1.3. SIGNIFICACIÓN CLÍNICA

La disposición de los estereoisómeros de los fármacos y la respuesta farmacológica producida depende de una serie de factores inherentes al paciente. Tales factores deben ser tenidos en cuenta debido a que la respuesta a la administración de un fármaco puede estar condicionada a tales factores.

1.3.1. Metabolismo de primer paso.

Por ejemplo, al administrar propranolol racémico vía oral se produce un efecto más potente que tras la administración intravenosa¹⁶. Ésto se debe a un mayor aclaramiento tras la administración oral del enantiómero R menos activo comparado con el del S-propranolol (2.78 l/min vs 1.96 l/min; los cocientes de aclaramiento del enantiómero S son de 1.42 y 1.17, respectivamente tras la administración oral e intravenosa), además de la formación del metabolito activo 4-hidroxiopropranolol¹⁷.

1.3.2. Enfermedad.

Los fármacos que sufren un metabolismo de primer paso importante y enantioselectivo pueden presentar diferencias, tanto en sus efectos farmacodinámicos como en sus perfiles farmacocinéticos, en pacientes con determinadas enfermedades, como por ejemplo cirrosis hepática.

¹⁵ Ariens, E.J. Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. Eur. J. Clin. Pharmacol. 26, 663-8, (1984).

¹⁶ Coltart, D.J., Shand, D.G., Plasma propranolol levels in the quantitative measurement of β -adrenergic blockade in man. BMJ, 3, 731-4, (1970).

¹⁷ Walle, T., Webb, J.G., Bagwell, E.E. et al. Stereoselective delivery and actions of beta receptor antagonists. Biochem. Pharmacol. 37, 115-24, (1988).

La cirrosis hepática se ha comprobado que altera la disposición de los enantiómeros del ibuprofeno¹⁸, de tal manera que la vida media plasmática de ambos enantiómeros se incrementa aproximadamente 2 veces más en los enfermos con dicha enfermedad en comparación con los voluntarios sanos. El área bajo la curva (ABC) de concentración plasmática total *versus* tiempo no difirió entre los dos grupos, pero el índice enantiomérico (*S/R*) disminuyó desde aproximadamente 1.3 en voluntarios sanos hasta 0.94 en los pacientes con cirrosis, siendo las concentraciones plasmáticas del enantiómero activo *S* más bajas que las del *R*-ibuprofeno, al contrario de lo que se observa en los voluntarios sanos¹². Pero debido a la bioinversión metabólica del enantiómero *R* al *S*¹⁹, el perfil farmacocinético se complica. En la bibliografía no se ha podido encontrar ningún trabajo que presente datos que concluyan si el proceso de bioinversión se reduce o si el aumento de las concentraciones plasmáticas del *R*-ibuprofeno con respecto a las del *S*-ibuprofeno es una consecuencia del bloqueo estereoselectivo de una ruta metabólica alternativa, o si actúan ambos mecanismos.

1.3.3. Edad y sexo.

Las diferencias en la disposición del fármaco asociado con la edad están bien establecidas, y las alteraciones de la expresión de los enzimas relacionadas con la edad pueden influir de forma distinta en la farmacocinética de los enantiómeros de un fármaco racémico.

También se han observado diferencias relacionadas con la edad entre distintos sexos en la disposición enantiomérica del fármaco²⁰.

Tales cambios en la disposición enantiomérica con la edad y el sexo pueden influir en la respuesta terapéutica, dependiendo si afecta más el eutómero o el distómero, y pueden contribuir a las diferencias encontradas en los ancianos en cuanto a la sensibilidad frente a los fármacos, ya sea como potenciación de la actividad farmacológica o de los efectos adversos. Esa es sin duda un área importante en la que se precisa mayor investigación.

¹⁸ Li, G., Treiber, G., Maire, K. Et al. Disposition of ibuprofen in patients with liver cirrhosis. Stereochemical considerations. Clin. Pharmacokinet. 25. 154-63, (1993).

¹⁹ Chen, C-Y., Chen C-S. Stereoselective disposition of ibuprofen in patients with compromised renal haemodynamics. Br. J. Clin. Pharmacol. 40, 67-72, (1995).

²⁰ Hooper, W.D., Qing M.S. The influence of age and gender on the stereoselective metabolism and pharmacokinetics of mephobarbital in humans. Clin. Pharmacol. Ther. 48, 633-40, (1990).

1.3.4. Interacciones farmacológicas.

Como ejemplo, la warfarina, anticoagulante racémico es probablemente el fármaco más ampliamente estudiado en cuanto a sus interacciones farmacológicas estereoselectivas. Algunos fármacos pueden interactuar selectivamente con la S-warfarina, el eutómero, por ejemplo la fenilbutazona, sulfipirazona, o con la R-warfarina, por ejemplo la cimetidina, el enoxacino, mientras que otros, como por ejemplo la amiodarona no presentan estereoselectividad²¹. Estas interacciones pueden llegar a ser muy complejas y no pueden explicarse racionalmente hasta que no se estudien sus aspectos estereoquímicos.

1.3.5. Factores genéticos.

Los factores genéticos tienen suma relevancia en la disposición del fármaco, sobre todo para aquellos compuestos cuyo metabolismo está asociado con el polimorfismo genético de la oxidación de la debrisoquina¹⁵. Aproximadamente el 10 % de la población caucásica, el llamado fenotipo metabolizador lento (ML), tiene una expresión deficiente del isoenzima CYP 2D6 del citocromo P450; el resto constituye el llamado fenotipo metabolizador rápido (MR). Cuando un fármaco quiral (administrado en forma racémica) es un sustrato del CYP 2D6, tanto las concentraciones del fármaco como la composición enantiomérica en el plasma pueden variar dependiendo del fenotipo, lo que puede influir en la respuesta terapéutica. Por ejemplo el β -bloqueador racémico metoprolol parece ser menos eficaz en los individuos con el fenotipo ML que en aquellos con el fenotipo MR cuando la relación concentración efecto está basada en la concentración total de fármaco. Sin embargo, el análisis de los enantiómeros aislados tras la administración del compuesto racémico indica que las concentraciones plasmáticas y el ABC del eutómero, S-metoprolol, son mayores que las del R-metoprolol en aquellos sujetos con el fenotipo MR, mientras que en el caso de los individuos con el fenotipo ML ocurre lo contrario. Así, la proporción de concentración plasmática total debida al isómero activo es mayor en individuos con el fenotipo MR, lo que explica el cambio en la relación concentración-efecto dependiendo del fenotipo²².

²¹ Lennard, M.S., Tucker, G.T., Woods, H.F. Stereoselectivity in pharmacokinetics and drug metabolism. In: Taylor JB, editor. Comprehensive medicinal chemistry. Vol. 5. Biopharmaceutics Oxford, Pergamon Press, 187-204, (1990).

²² Lennard, M.S., Tucker, G.T., Silas J.H. et al. Differential stereoselective metabolism of metoprolol in extensive and poor debrisoquin metabolisers. Clin. Pharmacol. Ther. 34, 732-7, (1983).

1.4. ENANTIÓMEROS *versus* MEZCLA RACÉMICA

Existen diversas ventajas potenciales asociadas al uso de productos enantioméricos puros, entre las que se incluyen:

- Un aumento en la selectividad del perfil farmacológico del fármaco;
- La posibilidad de presentar un índice terapéutico mayor;
- Un perfil farmacocinético menos complejo;
- Una menor capacidad para producir interacciones medicamentosas complejas;
- Una relación concentración plasmática-efecto simplificada.

Como veremos a continuación uno de los fármacos que se estudiaron, la talidomida, ha sido objeto de polémica a nivel de prensa, debido a los efectos teratogénicos provocados por uno de los enantiómeros. Un estudio realizado a finales de la década de los 70 indicó que, tras administrar a la cepa SWS de ratones, los dos enantiómeros de la talidomida manifestaron efectos sedantes, mientras que la actividad teratogénica residía en el enantiómero con la configuración S^{23} . Sin embargo, los roedores son poco sensibles a los efectos teratogénicos del fármaco²⁴, y un estudio anterior había indicado que ambos enantiómeros y el racemato eran teratogénicos en el conejo albino de Nueva Zelanda, una especie de laboratorio más sensible²⁵.

Recientemente se ha publicado que las muestras sintéticas de los enantiómeros utilizadas en el estudio en conejos podrían haber sido de menor pureza estereoquímica que el material obtenido cromatográficamente en el estudio de los años 70²⁶. Sin embargo, esta observación probablemente sea irrelevante, puesto que los enantiómeros de la talidomida racemizan rápidamente en disolución²⁷ e *in*

²³ Blaschke, G., Kraft, H.P., Fickenstcher, K. Et al. Chromatographische racemattrennung von thalidomid und terogene wirkung der enantiomere. *Arzneimittelforschung*, 29, 1640-2, (1979).

²⁴ Scott, W.J., Fradkin, R., Wilson, J.G. Non-confirmation of thalidomide-induced teratogenesis in rats and mice. *Teratology*, 16, 333-6, (1977).

²⁵ Fabro, S., Smith, R.L., Williams, R.T. Toxicity and teratogenicity of optical isomers of thalidomide. *Nature*, 215-69, (1967).

²⁶ Eriksson, T., Bjorkman, S., Roth, B. et al. Stereospecific determination, chiral inversion *in vitro* and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. *Chirality*. 7, 44-52, (1995).

²⁷ Testa, B., Carrupt, P-A, Gal, J. The so-called "interconversion" of stereoisomeric drugs: an attempt at clarification. *Chirality*, 5, 105-11, (1993).

vivo en el ser humano²⁰. Así pues, la situación de este fármaco de ningún modo está clara como dan a entender algunas referencias bibliográficas.

1.4.1. Enantiómeros con perfiles farmacológicos similares.

Los dos enantiómeros de la flecaidina son equipotentes con respecto a su actividad antiarrítmica y a su efecto sobre los canales cardiacos de sodio, y no muestran diferencias significativas en cuanto a sus propiedades farmacocinéticas²⁸. Los conocimientos acerca de la toxicidad de los isómeros individuales son relativamente escasos, aunque en la actualidad el uso de un isómero aislado no parece aportar ventaja terapéutica alguna. De modo parecido, los dos enantiómeros del antihistamínico, prometacina poseen propiedades farmacológicas y toxicológicas similares.

1.4.2. Enantiómeros con indicaciones terapéuticas distintas.

El β -bloqueante timolol es un ejemplo de compuesto en el que este tipo de enfoque puede ofrecer alguna ventaja terapéutica. En la actualidad, el enantiómero S-timolol está comercializado en formulaciones orales, y de aplicación local, para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular y del glaucoma, respectivamente. Tras la administración ocular se absorben sistémicamente cantidades significativas del fármaco, habiéndose observado efectos cardiovasculares y pulmonares^{29,30}; se han descrito casos de broncoconstricción grave en pacientes con asma y, en algunos casos, muerte²⁴. El R-timolol es entre 50 y 90 veces menos potente que el enantiómero S en cuanto al bloqueo β , pero sólo unas tres veces menos potente en la reducción de la presión intraocular³¹. Además el enantiómero R incrementa el flujo sanguíneo coroidal y retiniano, mientras que el enantiómero S produce el efecto contrario³². Por lo tanto, estos datos sugieren que el timolol constituye un ejemplo de fármaco en el cual los dos enantiómeros podrían comercializarse con sus propias indicaciones terapéuticas

²⁸ Gross, A.S., Mikus, G., Fischer, C. et al. Stereoselective disposition of flecaidine in relation of the sparteine/debrisoquine metaboliser phenotype. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 28, 555-6, (1988).

²⁹ Richards, R., Tattersfield, A.E. Bronchial β -adrenoceptor blockade following eyedrops of timolol and its isomer L-714, 465 in normal subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 20, 459-62, (1985).

³⁰ Fraunfelder, F.T., Barker, A.F. Respiratory effects of timolol. *N. Engl. J. Med* 311-1441, (1985).

³¹ Baldwin, J.J., Abrams, W.B. Stereochemically pure drugs, and industrial perspective. In: Wainer, I.W., Drayer D.E., editors *Drug stereochemistry: Analytical methods and pharmacology*. New York. Marcel dekker, 311-356, (1988).

³² Chiou, G.C.W., Zhao, F., Shen, Z-H. et al. Effects of D-timolol and L-timolol on ocular blood flow and ocular blood pressure. *J.Ocular Pharmacol.* 6, 23-9, (1990).

específicas, el enantiómero S para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular y el R-timolol para el tratamiento del glaucoma.

1.4.3. Compuestos racémicos cuyos enantiómeros pueden ofrecer ventajas clínicas.

La ketamina es un anestésico general, con propiedades analgésicas, que también posee un cierto potencial de adicción³³. Su uso queda restringido a causa de las reacciones postanestésicas, como alucinaciones y agitación (el llamado delirio del despertar). Ambos enantiómeros tienen propiedades anestésicas, pero la S-ketamina es entre 3 y 4 veces más potente y tiene aproximadamente el doble de afinidad por los receptores opiáceos que la R-ketamina³⁴. La incidencia de reacciones del despertar es mayor tras la administración de R-ketamina que tras la del racemato o el enantiómero S³⁵. Así pues, parece que el desarrollo de una preparación del enantiómero aislado sería terapéuticamente ventajoso y reduciría el riesgo de adicción al fármaco.

1.4.4. Mezclas no racémicas con posibles ventajas clínicas.

En algunos casos ambos enantiómeros pueden contribuir al perfil farmacológico global de actividad, pero la proporción óptima de cada enantiómero puede no ser la misma que contiene la mezcla racémica (1:1).

Por ejemplo, la indacrinona es un diurético del asa de Henle que ha sido evaluado para el tratamiento de la hipertensión y de la insuficiencia cardiaca congestiva. Este fármaco también tiene una actividad uricosúrica que puede llegar a ser significativa, ya que a partir de estudios epidemiológicos se ha sugerido que los niveles séricos altos de urato pueden constituir un factor de riesgo asociado a hipertensión, arteriopatía coronaria y mortalidad cardiovascular³⁶. Las propiedades diuréticas de la indacrinona residen en el enantiómero R, mientras que las propiedades uricosúricas de

³³ Lanning C.F., Harmel, M.H. Ketamine anesthesia. *Ann. Rev. Med.* 26, 137-41, (1975).

³⁴ White, P.F., Schutter, J., Shafer, A. et al. Comparative pharmacology of the ketamine isomers. *Br. J. Anaesth.* 57, 197-203, (1985).

³⁵ White, P.F., Ham, J., Way, W.L. et al. Pharmacology of ketamine isomers in surgical patients. *Anesthesiology.* 52, 231-9, (1980).

³⁶ Baldwin, J.J., Abrams, W.B. Stereochemically pure drugs, and industrial perspective. In: Wainer, I.W., Drayer D.E., editors *Drug stereochemistry: Analytical methods and pharmacology.* New York. Marcel dekker, 311-356, (1988).

la indacrinona recaen principalmente en la S-indacrinona³⁷. La semivida de eliminación de la S-indacrinona en el ser humano es demasiado breve para poder observar una actividad uricosúrica clínicamente significativa. No obstante, el incremento en la proporción del S, mediante la manipulación de la composición enantiomérica del medicamento, mejora su propiedad uricosúrica. Con una relación entre S- y R-indacrinona de 4/1, la mezcla es isouricémica, mientras que un aumento mayor en la proporción del enantiómero S hasta 8/1 produce hipouricemia³⁸. De aquí que el uso de una mezcla no racémica de enantiómeros produzca un mejor perfil terapéutico del fármaco.

1.4.5. Racematos cuyos isómeros puros podrían utilizarse en nuevas indicaciones.

El sotalol, un β -bloqueador no selectivo, se emplea como racemato, aunque el enantiómero (-) es entre 14 y 50 veces más potente que el enantiómero (+), dependiendo del método de ensayo utilizado. El sotalol racémico también posee actividad antiarrítmica en la que ambos enantiómeros son equipotentes³⁹. Se ha sugerido por tanto que el (+)-sotalol se podría utilizar como agente antiarrítmico carente de actividad β -bloqueadora, uso que se ha ido investigando en varios ensayos clínicos³³. Sin embargo, uno de tales estudios SWORD [Survival With Oral d-Sotalol; Supervivencia con d-Sotalol Oral], en pacientes con función ventricular deprimida después de un infarto de miocardio, se ha suspendido recientemente debido a la mortalidad más elevada (4.6 %) observada en los pacientes tratados con (+)-sotalol respecto a la de aquellos que recibieron placebo (2.6 %)³³. Es preciso sopesar la importancia de estas observaciones, pero puede que sea más un reflejo del enfoque dado al tratamiento farmacológico de este grupo de pacientes que del valor terapéutico del enantiómero puro del sotalol⁴⁰.

³⁷ Vlases, P.H., Irvin, J.D., Huber, P.D. et al. Pharmacology of the enantiomers and (-)-p-OH metabolite of indacrinone. Clin. Pharmacol. Ther. 29, 344-50, (1981).

³⁸ Tobert, J.A., Cirillo, V.J. Hitzengerger, G. et al. Enhancement of uricosuric properties of indacrinone by manipulation of the enantiomer ratio. Clin. Pharmacol. Ther. 29, 344-50, (1981).

³⁹ Advani, S.V., Singh, B.N. Pharmacodynamic, pharmacokinetic and antiarrhythmic properties of d-sotalol, the dextro-isomer of sotalol. Drugs. 49, 664-79, (1995).

⁴⁰ Colatsky, T.J. Antiarrhythmic drugs: where are we going?. Pharmaceuticals News, 2-17-23, (1995).

2. CARACTERÍSTICAS DE KETOPROFENO, RICOBENDAZOL Y TALIDOMIDA

Como fármacos quirales objeto de estudio práctico en esta tesis se han seleccionado los siguientes fármacos quirales que se describen a continuación:

2.1. KETOPROFENO

El ketoprofeno (KP), 2-(3-benzoilfenil) propiónico, (figura 5) es un ácido débil ($pK_a=5.02$)⁴¹ que se presenta como un polvo cristalino, blanco e inodoro, con un peso molecular de 254.3 g/mol. Es prácticamente insoluble en agua, y soluble en etanol al 96 %, éter, acetato de etilo, acetona y cloroformo.

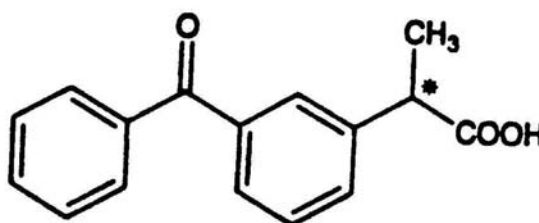


Figura 5. Estructura química de KP. (Centro quiral marcado con asterisco)

Forma parte de los derivados del ácido propiónico también denominados AINEs (Anti-inflamatorios no esteroideos), tales como ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, fenbufeno, piktetoprofeno, ácido tiaprofeno, los cuales forman un grupo relativamente homogéneo por sus características químicas y farmacológicas.

2.1.1. Acción farmacológica

Todos los fármacos de este grupo presentan acciones similares: antitérmica, analgésica y anti-inflamatoria. Su principal acción farmacológica consiste en la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (mediadores del dolor y de la inflamación) en uno o más de los pasos de la vía biosintética endoperóxida. Todos son capaces de inhibir la subunidad ciclooxigenasa de la enzima prostaglandín sintetasa, aunque su potencia difiere entre unos y otros. Pero no existe una buena relación entre esta potencia inhibidora y la eficacia analgésica y anti-inflamatoria. Se consideran anti-inflamatorios moderados, incluso inferior a la del ácido acetil salicílico (A.A.S.).

Dichos derivados propiónicos poseen un carácter quiral, en su mayoría las formas farmacéuticas son preparados racémicos de los enantiómeros R(-) y S(+), siendo la forma S(+) la farmacológicamente activa, aunque la mayoría de ellos sufren bioinversión⁴² "in vivo" de R(-) a S(+). Debemos señalar que en el KP⁴³ dicha bioinversión ocurre de manera muy ligera prácticamente inexistente en humanos.

⁴¹ Chi, S.C., Jun, H.W. Release rates of ketoprofen from poloxamer gels in a membraneless diffusion cell. *J. Pharm. Sci.* 80: 280-283, (1991).

⁴² Chen, Ch.-Sh., Shieh, W-R, Lu, P-H., Harriman, S., Chen, Ch-Y. Metabolic stereoisomeric inversion of ibuprofen in mammals. *Biochi. Biophys. Acta*, 1078, 411-417, (1991).

⁴³ M.J.Barbanoj, R.M., Antonijoan, Gich, I. Clinical pharmacokinetic of desketoprofen. *Clin. Pharmacokinet.* 40(4), 245-62. (2001). Review.

2.1.2. Farmacocinética

Las principales características farmacocinéticas de este grupo se resumen en la tabla.

Tabla 1. Características farmacocinéticas de los fármacos del grupo de los ácidos aril propiónicos.

Fármaco	Absorción (%)	Metabolismo Presistémico	$t_{1/2}$	Vd (l)	Unión a Proteínas (%)	Cl (ml/Kg/min)	Excreción urinaria (%)
Ketoprofeno	> 90	Escaso	1-3	7,7	95	1,2	<1
Fenbufeno	80	---	10-17	7	98	---	----
Fenoprofeno	80-90	Escaso	1,4-2,9	7	99	0,5-1,1	2-5
Flurbiprofeno	> 95	---	3-6	7	99	0,3	<15
Ibuprofeno	> 95	---	2	7	99	0,75	<1
Naproxeno	100	5 %	12-15	63	99	0,13	<1

2.1.2.1. Absorción:

Como puede observarse todos se absorben de forma completa por vía oral debido a sus características lipófilas, con t_{max} comprendidos entre 1-2 horas. En general la comida reduce la velocidad de absorción pero no la cantidad total de fármaco absorbido.

2.1.2.2. Distribución:

El grupo de los AINEs se caracteriza porque estos fármacos se unen intensamente a la albúmina⁴⁴, en un 99 % a las concentraciones que alcanzan en plasma. Cuando la concentración de albúmina disminuye, por ejemplo en la artritis reumatoide, la fracción libre aumenta. Difunden bien, y pasan al líquido sinovial, donde alcanzan concentraciones que suelen ser la mitad de la plasmática, ya que la concentración de albúmina es menor. La posible estereoselectividad en cuanto a la unión a proteínas plasmáticas para el KP ha sido estudiada⁴⁵, obteniéndose resultados parecidos para los dos enantiómeros (99,20 % para el R(-) y 99,22 % para el S(+)). A altas concentraciones, se observa un pequeño grado de estereoselectividad en la unión a la albúmina sérica humana, siendo la cantidad de

⁴⁴ Muller, N., Payan, E., Lopicque, F., Bannwarth, B., Netter, P. Pharmacological aspects of chiral nonstereoidal antiinflammatory drugs. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 4:617:634 (1990).

S(+)-KP libre mayor a R(-)-KP. Cuando la administración es de tipo crónico (p.ej. monitorización en artritis reumatoide) se alcanzan concentraciones que fluctúan menos que las plasmáticas y permiten distanciar más la administración. Pasan la barrera placentaria y alcanzan concentraciones muy bajas en la leche.

2.1.2.3. Metabolismo:

Como habíamos citado previamente la inversión enantiomérica se observa para la mayoría de los AINEs, y ha sido descrita en la bibliografía⁴⁶. La dirección de la inversión quiral en humanos es unidireccional del isómero R(-) al S(+), aunque para los ratones se ha encontrado bioinversión bidireccional⁴⁷. La bioinversión del KP es muy extensa en rata, mono, ratón, siendo baja en humanos, cobaya y conejos.

Además de la inversión quiral, la enantioselectividad puede observarse en otras vías metabólicas como, por ejemplo, en la oxidación y conjugación del ácido glucurónico. El KP está sometido a un metabolismo⁴⁸ significativo por parte de la unión difosfoglucuroniltransferasa hepática, produciendo metabolitos, acil glucurónidos, los cuales poseen actividad reactiva propia, sufriendo diversas transformaciones químicas en condiciones fisiológicas de pH y temperatura.

2.1.2.4. Excreción:

Las semividas de eliminación oscilan entre las 2 y 4 horas, excepto el naproxeno (12-15 horas) y los metabolitos activos del fenbufeno (aproximadamente 10 horas). Se ha descrito en la bibliografía la existencia de estereoselectividad en la excreción biliar del KP en rata⁴⁹ y en pacientes colestomizados⁵⁰.

⁴⁵ Hayball, P.J., Nation, R.L., Bochner, F. Plasma protein binding of ketoprofen enantiomers in man. Method development and its application. *Chirality*, 3: 460-466 (1991).

⁴⁶ Nakamura, Y., Ymaguchi, T., Takahashi, S., Hashimoto, S., Iwatani, K., Nakagawa, Y. Optical isomerization mechanism of R(-)-hydratopic acid derivatives. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 4:s-1 (1981).

⁴⁷ Mauleón, D., Artigas, R., García M.L., Carganico, G. Preclinical and clinical development of desketoprofen. *Drugs*, 5:24-46 (1996).

⁴⁸ Upton, R.A., Buskin, J.N., Williams, R.L. et al. Negligible excretion of unchanged ketoprofen, naproxen and probenecid in urine. *J. Pharm. Sci.* 69:1254-1257, (1980).

⁴⁹ Foster, R.T.; Jamali, F. Stereoselective of ketoprofen in the rat. Influence of route of administration. *Drug Metab. Disp.*, 16: 623-626, (1988).

⁵⁰ Foster, R.T.; Jamali, F.; Russel, A.S.; Alballa, S.R. Pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers in healthy subjects following simple and multiple doses. *J. Pharm. Sci.*, 77: 70-73 (1988).

La principal vía de eliminación del KP es la urinaria, en su mayor parte metabolizado. Presenta un aclaramiento disminuido en pacientes con disfunción renal, en ancianos⁵¹ en los que se espera que la función renal esté disminuida y en pacientes que reciben probenecid de forma concomitante⁵². Se cree que este fenómeno ocurre paralelamente a la disminución de la excreción renal de acil glucurónidos, que provoca la acumulación sistémica de estos conjugados lábiles seguida de su fácil hidrólisis inversa hacia el fármaco original. Dicha regeneración sistémica del AINE original tendría ciertas implicaciones estereoquímicas únicas para los derivados propiónicos sujetos a la posible inversión quiral metabólica. Por tanto, tras la administración del fármaco racémico podría presumirse una exposición desproporcionada del isómero S(+) desconjugado y farmacológicamente activo. El KP sufre un retraso en el aclaramiento del R(-) y S(+)-KP en pacientes con artritis reumatoide debido a este hecho.

2.1.3. Reacciones adversas

En general son similares a las de los restantes AINEs. Sin embargo, hay que destacar que, en conjunto, se asocian a una menor incidencia de alteraciones gastrointestinales que el AAS (ácido acetil salicílico), la fenilbutazona o la indometacina. No presentan los problemas sanguíneos de las pirazolonas y producen menos molestias neurológicas que la indometacina. Pero por otro lado los derivados propiónicos siguen produciendo el mismo tipo de reacciones adversas que los demás AINEs, teniendo en cuenta que además su eficacia clínica no alcanza la de los fármacos más potentes del grupo.

Pueden originar en grado diverso: dispepsia, erosiones y ulceraciones gastrointestinales; alteraciones neurológicas en forma de sedación, somnolencia, mareo o cefalea; erupciones dérmicas y diversas reacciones de hipersensibilidad incluida la fototoxicidad; son infrecuentes las reacciones hematopoyéticas y hepáticas. En cuanto a las alteraciones renales, cabe esperar una interferencia de la función renal cuando ésta depende críticamente de la actividad local de los eicosanoides. Pueden aumentar el tiempo de hemorragia debido a su acción antiagregante.

⁵¹ Advenier, C., Roux, A., Gobert, C. et al. Pharmacokinetics of ketoprofen in the elderly. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 16:65-70, (1983).

2.1.4. Estado actual del ketoprofeno

Como ya hemos señalado anteriormente, el KP, es uno de los fármacos de primera elección por sus propiedades analgésicas y anti-inflamatorias, en patologías tales como la artritis reumatoide, o bien como analgésico en dolores agudos de carácter simple.

Debido a que la responsabilidad de la acción (analgésica, anti-inflamatoria y también de los efectos adversos que presentan los derivados del ácido propiónico) se debe a S(+)-KP, y que apenas existe biotransformación R(-) en S(+)-KP "in vivo" en humanos. Se han desarrollado dos formulaciones, que son actualmente comercializadas (Desketoprofeno ® y Enantium ®) conteniendo el fármaco en su forma enantiomérica S(+)-KP. Lógicamente estas nuevas formulaciones obligan a una pauta posológica diferente a la utilizada cuando se utiliza la mezcla racémica. Se reduce a la mitad la dosis de fármaco en el caso del medicamento que contiene el S(+)-KP.

⁵² Foster, R.T., Jamali, F., Russell, A.S. Pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers on cholecystectomy patients: influence of probenecid. Eur. J. Clin. Pharmacol., 37:589-594, (1989).

2.2. RICOBENDAZOL

El ricobendazol (RBZ) es un fármaco derivado del grupo de los bencimidazol carbamatos, el [5-(propyltio)-1*H*-bencimidazol-2-yl] éster metílico del ácido carbámico, (figura 6) es una base débil que posee dos pK_a (0.20 - 9.79) que se presenta como un polvo cristalino, blanco e inodoro, con un peso molecular de 281.3 g/mol. Es prácticamente insoluble en agua.

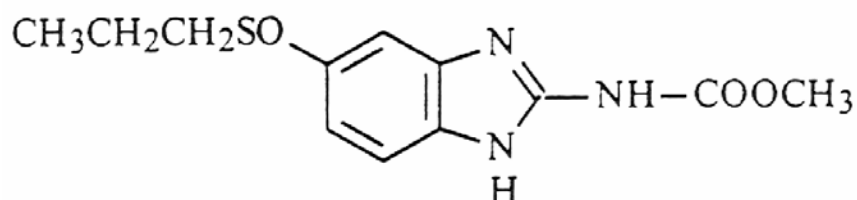


Figura 6. Estructura química de RBZ

El RBZ es un fármaco originariamente derivado del albendazol (ABZ), es el metabolito activo que aparece tras la oxidación de su grupo sulfuro en sulfóxido ($ABZ-SO^{\ominus} = RBZ$) que posee un centro sulfuroso asimétrico responsable de la aparición de actividad quiral. Tras una segunda oxidación del grupo sulfuro aparece otro metabolito, en este caso la sulfona ($ABZ-SO_2$), que no posee actividad quiral. En la figura 7 se muestra la cadena de reacciones que originan la aparición de los metabolitos del ABZ entre los cuales se encuentra el RBZ también denominado $ABZ-SO^{\ominus}$ objetivo de nuestro estudio.

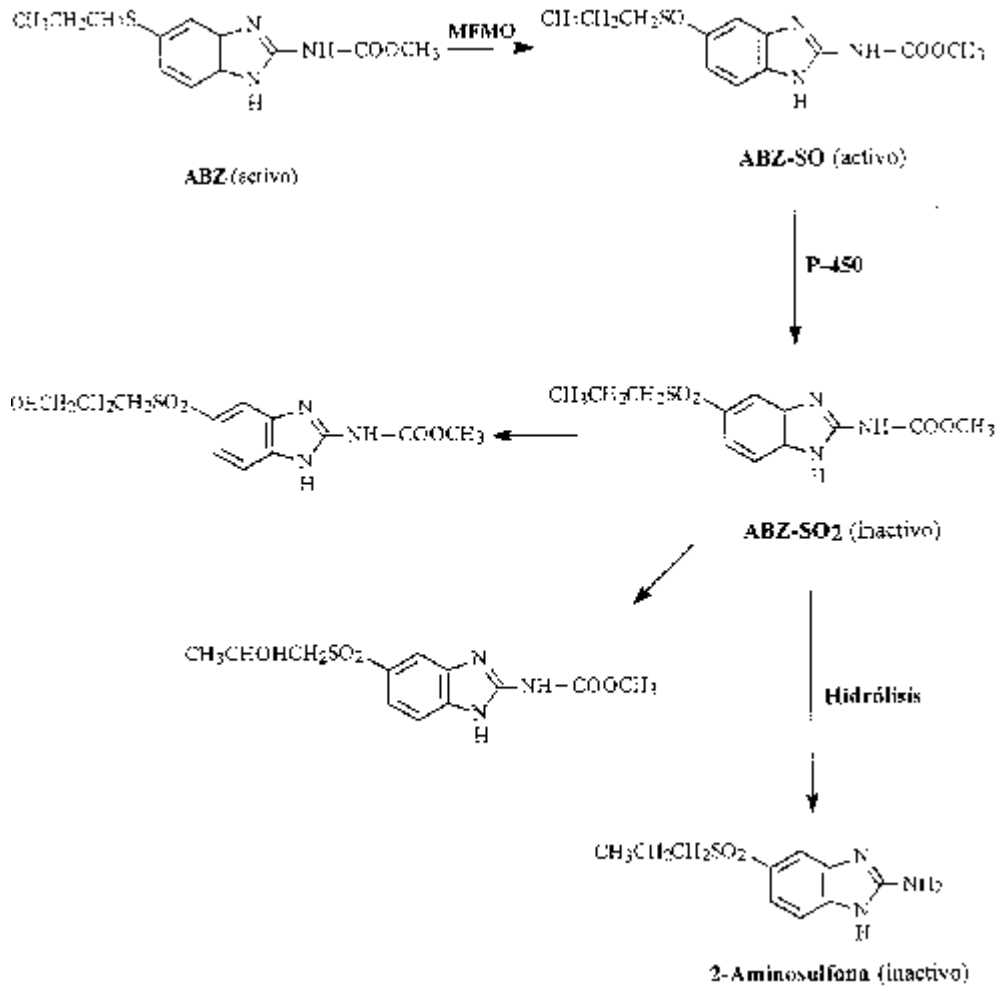


Figura 7. Metabolismo del ABZ.

El ABZ, RBZ y mebendazol (MBZ) son fármacos derivados del benzimidazol carbamato con características antihelmínticas usados para el tratamiento de la helmintiasis tanto en animales como en humanos. Actualmente son especialmente utilizados para el tratamiento del *Echinococcus alveolar* (AE). Las características generales de este grupo de fármacos se describen a continuación.

2.2.1 Actividad antihelmíntica

En los gusanos inhiben de manera irreversible y selectiva la captación de glucosa deplecionando los depósitos de glucosa; provocan la desaparición selectiva de microtúbulos citoplasmáticos en las células tegumentarias e intestinales. Como consecuencia, inducen la inmovilización y la muerte de los parásitos.

2.2.2. Características farmacocinéticas

El MBZ se absorbe muy escasamente en el tracto gastrointestinal y lo poco que se absorbe muestra una biodisponibilidad muy pequeña, debido a que sufre una gran eliminación consecuencia del efecto de primer paso en el hígado (80%); la absorción aumenta, sin embargo con la comida. Tras la administración crónica las concentraciones plasmáticas aumentan; el MBZ absorbido se une intensamente a proteínas (95%), se metaboliza parcialmente en el hígado y es excretado, tanto en forma activa como metabolizada, por la orina.

En el caso del ABZ, éste es absorbido en mayor cantidad que el MBZ en el tracto gastrointestinal, por tanto alcanza concentraciones más elevadas en el plasma sin necesidad de administraciones crónicas, y por lo tanto en el líquido quístico de la hidátide. Se metaboliza en hígado originando sus dos metabolitos $ABZ-SO^- = RBZ$ y $ABZ-SO_2$. Como ya hemos señalado anteriormente la forma sulfóxido, es decir, $ABZ-SO^-$ es el metabolito activo que posee un centro de asimetría. En la bibliografía se pueden encontrar diferentes trabajos en los cuales se estudia la farmacocinética de cada uno de los enantiómeros de RBZ ⁵³.

⁵³ Marques, M.P., Takayanagui, O.M., Bonato P.S., Santos SR, Lanchote, V.L . Enantioselective kinetic disposition of albendazole sulfoxide in patients with neurocysticercosis. *Chirality*, 11(3):218-23, (1999).

Por otro lado, no existe hasta este momento constancia de las diferencias enantioselectivas en cuanto a la actividad de dicho fármaco. Se desconoce, qué enantiómero de RBZ es responsable de la actividad antihelmíntica o si por el contrario son ambos los que contribuyen de la misma manera.

2.2.3. Reacciones adversas

Son escasas y de poca intensidad; a veces produce molestias gastrointestinales, picor, erupción dérmica y fiebre. Con dosis altas, como las utilizadas en la triquinosis y el quiste hidatídico, puede provocar neutropenia reversible. Facilita la secreción de insulina por lo que puede potenciar la hipoglucemia inducida por la insulina e hipoglucemiantes orales. Produce teratogenia en rata pero no en otras especies animales; se recomienda limitar su uso en embarazadas.

2.3. TALIDOMIDA

La talidomida (TH) ((±)-N(2,6-Dioxo-3-piperinidil) de ftalidimida) (figura 8) es un polvo blanco, con un olor característico, y con un peso molecular de 258.2 g/mol. Es prácticamente insoluble en agua, pero soluble en dimetilsulfóxido (DMSO). Se debe mantener protegido de luz, ya que ésta provoca su hidrólisis. Posee un centro asimétrico en su estructura química, que le hace responsable de la aparición de los enantiómeros: R(+)-TH y S(-)-TH.

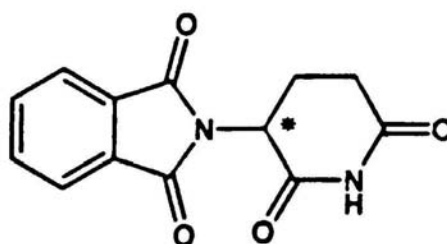


Figura 8. Estructura química de la TH. (Centro quiral marcado con asterisco).

2.3.1. Actividad farmacológica

La TH posee propiedades inmunológicas y anti-inflamatorias. También se conocen sus propiedades inmunosupresivas. Es efectiva y por tanto utilizada en el tratamiento de la lepra tipo 2 (*erythema nodosum leprosum*)⁵⁴, y se suele utilizar en dosis de 400 mg/día durante dos semanas. Posteriormente se reduce a dosis de mantenimiento (50-100 mg/día). No resulta efectivo, sin embargo, para la lepra tipo 1.

La TH comenzó siendo utilizada como agente inductor del sueño. También sus características inmunosupresivas la han hecho útil para el tratamiento de diversas enfermedades en las cuales se encuentra implicado el sistema inmunológico. Recientemente, ha sido reevaluada, por la FDA, por sus efectos moduladores de la inmunidad, y en los desordenes autoinmunes, y en el

⁵⁴ Höglund, P., Eriksson, T., Björkman, S. A double-blind study of the sedative effects of the thalidomide enantiomers in humans. *J. Pharma. Biopharm.* 26 (4), 363-83, (1998)

SIDA^{55,56}. La TH también modula la producción de TNF (alpha)^{57,58}, una citoquina conocida para inducir el sueño en animales de experimentación.

2.3.2. Efectos adversos

La TH fue retirada de uso como hipnótico no barbitúrico a principio de los años 60 tras haberse descubierto que producía efectos teratogénicos en mujeres embarazadas⁵⁹. Tras diferentes estudios para dilucidar el verdadero proceso fisiológico que provocaba la aparición de dichas malformaciones en los fetos, se comprobó que era debido principalmente a uno de los enantiómeros S(-)-TH. Höglund et al.⁶⁰ demostraron en 1998 que los efectos positivos de la molécula se debían fundamentalmente al enantiómero R(+)-TH. Se ha comprobado también la aparición de bioinversión, proceso que justifica la imposibilidad de formular el enantiómero S(-)-TH sólo.

⁵⁵ Gorin, I. Thalidomide in hyperalgetic pharyngeal ulceration of AIDS. *Lancet*, 335, 1343, (1990).

⁵⁶ Bessis, D. Thalidomide for systemic lupus erythematosus. *Lancet*, 339, 549-550, (1992).

⁵⁷ Sampaio, E.P.J. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated humane monocytes. *Exp. Med.*, 173, 699-703, (1991).

⁵⁸ Nishimura, K. (S)-form of alpha-methyl-N(alpha)-phthalimidoglutamide, buty noits ®-form, enhanced phorbol ester-induced tumor necrosis factor.alpha production by human leukemia cell HL-60:implication of optical resolution of thalidomide effects. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 2, 455-460, (1994).

⁵⁹ Lenz, W. Malformations caused by drugs in pregnancy. *Lancet*, 45, (1962).

⁶⁰ Höglund, P., Eriksson, T., Björkman, S. A double-blind study of the sedative effects of the thalidomide enantiomers in humans. *J. Pharm. Biopharm.*, 26, 363, (1998).

3. ESTRUCTURA CRISTALINA INTERNA DE FÁRMACOS Y QUIRALIDAD

La estructura cristalina que posea el fármaco es importante debido a que de ella se deducen muchas propiedades físicas. Para determinar el grado de cristalinidad se puede observar el comportamiento de la sustancia en estudio frente a la temperatura. Existe una relación directa entre el punto de fusión y la cristalinidad y posteriormente se relacionarán ambos factores con la solubilidad.

Las técnicas que permiten estudiar comparativamente el comportamiento frente a la temperatura de las muestras y su estructura interna son las siguientes:

Determinación visual del punto de fusión obtenido de manera directa por calentamiento de la sustancia problema en un capilar.

Punto de fusión obtenido a partir de la técnica de análisis térmico diferencial (DSC).

La estructura interna, se puede caracterizar por distintas técnicas complementarias: microscopía electrónica de barrido, espectroscopía infrarroja o difracción por rayos X. Esta última técnica será especialmente útil para la diferenciación entre las formas amorfas y las cristalinas, y así como pequeñas modificaciones en la estructura cristalina.

3.1. FORMAS POLIMÓRFICAS

Los principios activos y los excipientes pueden presentarse en estado amorfo o cristalino. La forma amorfa se presenta cuando las moléculas de una sustancia al estado sólido no están dispuestas de forma regular, sino que presentan una disposición desordenada y aleatoria, claramente diferenciada en su estructura de las formas cristalinas. Estas últimas pueden presentar diferentes disposiciones moleculares en estado sólido, dando lugar a diferentes formas polimórficas. Estas diferencias en la disposición molecular de sustancias con la misma composición química se traducen en modificaciones de algunas propiedades, tales como: solubilidad, punto de fusión, densidad, comportamiento óptico, estabilidad., etc., que tienen importantes implicaciones tanto en operaciones farmacotécnicas como en aspectos biofarmacéuticos.

Aunque muchos fármacos se presentan en dos o más formas polimórficas, sólo una de ellas es termodinámicamente estable para unas condiciones fijas de presión y temperatura, presentando además, un mayor punto de fusión y una menor solubilidad. Las restantes revierten con el tiempo a la

forma más estable de acuerdo a procesos cinéticos que deben ser adecuadamente caracterizados siempre que se recurra a la utilización de formas metaestables. La utilización de estas formas está justificada, siempre que se asegure una estabilidad física y química, para mejorar las propiedades de solubilidad. La selección de una forma metaestable exige, por tanto, mantener su integridad bajo las diferentes condiciones a las que va a ser sometido el fármaco en las distintas operaciones tecnológicas. Transformaciones polimórficas pueden producirse durante operaciones, tales como pulverización, mezclado, granulación, secado, compresión. Así, por ejemplo, el fenobarbital⁶¹, o la clorpropamida⁶² constituyen ejemplos de fármacos que experimentan transformaciones polimórficas atribuidas a diferentes procesos farmacotécnicos.

3.2. ESTRUCTURA CRISTALINA QUIRAL

Si antes hablamos de las formas polimórficas como una particularidad que poseen algunos fármacos, y sus implicaciones en las diferencias físico-químicas que poseen, debemos entrar a describir minuciosamente las particularidades que poseen en su estructura los fármacos quirales.

Así podemos hablar de las interacciones, homo y heteroquirales (figura 9).

- Interacciones homoquirales: Son las fuerzas de atracción o repulsión, que poseen entre sí, moléculas de la misma especie quiral, (R---R).
- Interacciones heteroquirales: Son las fuerzas de atracción o repulsión que poseen entre sí, moléculas de diferente quiralidad, (R---S).

Las interacciones homo y heteroquirales, no son de la misma magnitud:

⁶¹ Otsuka, M., Onoe, M., Matsuda, Y. Physicochemical stability of phenobarbital polymorphs at various levels of humidity and temperature. *Pharm. Res.* 10(4), 577-82, (1993)

⁶² Otsuka M, Matsumoto T, Kaneniwa N. Effects of the mechanical energy of multi-tableting compression on the polymorphic transformations of chlorpropamide. *J. Pharm. Pharmacol.*, 41(10), 665-669, (1989)

($\Delta G_{\text{hetero}} \neq \Delta G_{\text{homo}}$) $G =$ Energía libre de Gibbs

Este hecho es debido a que las dos especies de agregados son diastereómeros, es decir (R---R) *versus* (R---S)⁶³. Esta diferencia se encuentra sólo al estado sólido, ya que no hay o es prácticamente nula en el medio líquido y gaseoso. Sin embargo en medios quirales al estado sólido, la diferencia ($\Delta G = \Delta G_{\text{hetero}} - \Delta G_{\text{homo}}$) es significativa, debido a que el racemato frente al enantiómero puro posee distintas propiedades físicas o diferente actividad biológica. Esta diferencia se denomina: Discriminación enantiomérica.

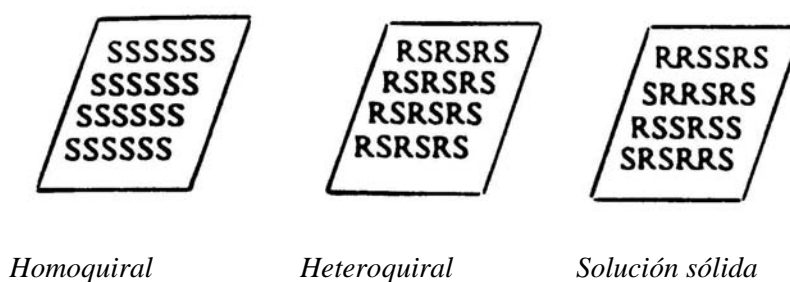


Figura 9. Especies homo y heteroquirales.

La cristalización es un proceso que consiste en la organización de las moléculas en una simetría determinada y adecuada. La estructura cristalina de una molécula base con propiedades quirales puede ser: homoquiral, como cristal enantiomórfico, o heteroquiral, como los cristales racémicos. Las diferencias termodinámicas existentes entre las distintas estructuras son mostradas en la figura 10.

⁶³ Eliel, E.L., Wilen, S.H., Mander, L.N. Stereochemistry of organic compounds; John Wiley & sons:New York, (1994).

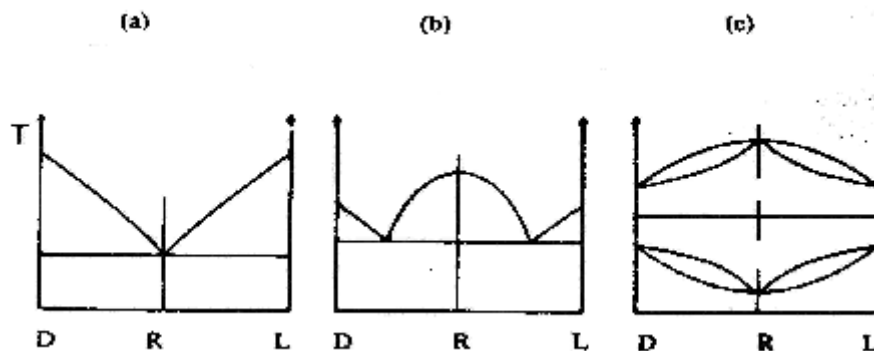


Figura 10. Diagramas de fase binarios de los distintos tipos de racematos cristalinos (a) Conglomerado racémico, (b) Compuesto racémico y (c) Pseudoracemato..

En la figura 10 se observan los distintos diagramas de fases de los distintos tipos de racematos cristalinos, de los cuales, el conglomerado representa sólo el 5-10 % de los racematos cristalinos, mientras que los compuestos racémicos representan el 90-95 % de los racematos cristalinos. Este hecho se justifica debido a que estos últimos son más estables termodinámicamente que los conglomerados. La mayor estabilidad de los compuestos racémicos frente a los conglomerados, se comenzó a estudiar hace un siglo. Wallach et al.⁶⁴ tras estudiar 12 pares de cristales homoquirales y heteroquirales, concluyó que la organización cristalina es más fácil en aquellas estructuras que poseen ambas especies enantiómeras (R---S), que en aquellas estructuras en las cuales sólo existe una de las formas enantioméricas, es decir (R---R) ó (S---S). Varios estudios⁶⁵ fueron realizados años después para comprobar que el postulado de Wallach era cierto. Finalmente Brock et al.⁶⁶ concluye afirmando en 1991 que los cristales racémicos son intrínsecamente más densos y estables que su equivalente quiral.

⁶⁴ Wallach, O. Ueber gebromte Derivate der Carvonreihe. Liebigs. Ann. Chem, 286, 90-143, (1895).

⁶⁵ Jacques, J., Collet, A., Wilen, S.H. Enantiomers, Racemates and Resolutions. John Wiley & Sons. New York, 1981 (edición 1991, modificada por, Krieger Publishing Company, Malabar, FL, 1994).

⁶⁶ Brock, C.P., Schweizer, W.B., Dunitz, J.D. On the validity of wallach's rule: on the density and stability of racemic crystals compared with their crystal counterparts. J. Am. Chem. Soc. 113, 9811-9820, (1991).

Para observar las posibles diferencias cristalinas⁶⁷ de los racematos puros y de sus equivalentes quirales, se utiliza la técnica de difracción de rayos X, y de resonancia magnética nuclear ¹³C (R.M.N.).

Pero también se debe tener en cuenta el punto de vista termodinámico. Como ya hemos comentado anteriormente una especie racémica puede encontrarse como compuesto racémico, conglomerado o como pseudoracemato. Se pueden distinguir construyendo sus fases binarias, a partir de la medida del punto de fusión de la especie racémica y de sus correspondientes enantiómeros. De los resultados obtenidos, y como se puede observar en la figura 10 se puede identificar el tipo de especie cristalina. Normalmente se obtendrán compuestos racémicos o conglomerados^{68,69}; más inusual es la presencia de especies racémicas como pseudoracematos. Varios estudios desarrollados por Li y Grant⁷⁰, demuestran que la entalpía de fusión de los compuestos racémicos es mayor que la de sus equivalentes quirales. Los resultados que obtuvieron para 25 moléculas quirales estudiadas, muestran los tres tipos de especies racémicas (compuestos racémico, conglomerado y pseudoracemato) pueden ser caracterizados por sus características termodinámicas. La energía de formación es siempre negativa para el compuesto racémico indicativo de ser la forma más favorable. La entropía de mezcla al estado líquido del conglomerado racémico es prácticamente igual que el asumido como ideal ($1.38 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

Pero este estudio no sería adecuado como único en algunos casos, en particular cuando la especie racémica pueda existir como un compuesto racémico metaestable o como conglomerado. Por tanto, se deben utilizar complementariamente las siguientes técnicas previamente mencionadas: la difracción de rayos X (DRX), o bien la resonancia magnética nuclear (RMN). También puede ser utilizada la espectroscopía infrarrojo (IR) de barrido

⁶⁷ Li, Z.J. Implications of chirality on the Physical properties and crystallizations of chiral drugs. Ph.D. Dissertation, University of Minnesota, (1997).

⁶⁸ Neau, S.H., Shinwari, M.K., Hellmuth, E.W. Melting point phase diagrams of free base and hydrochloride salts of bevantolol, pindolol and propranolol. *Int. J. Pharm.*, 99, 303-310, (1993).

⁶⁹ Pranker, R.J., elsabee, M. Thermal analysis of chiral drug mixtures: The DSC behavior of mixtures of ephedrine HCl and pseudoephedrine HCl enantiomers. *Thermochim. Acta.*, 248, 147-160, (1995). Li, Z.J., Grant, D.J. W. Thermal analysis as a method for characterizing racemic species. *Pharm. Res.* 13(9) suppl, 340, (1996).

⁷⁰ Li, Z.J., Grant, D.J. W. Thermal analysis as a method for characterizing racemic species. *Pharm. Res.* 13(9) suppl, 340, (1996).

SOLUBILIDAD Y RECURSOS TECNOLÓGICOS PARA AUMENTARLA

Se puede considerar la solubilidad como una consecuencia de la cristalinidad de la molécula. Podemos decir que generalmente a mayor grado de cristalinidad, menor solubilidad, y al contrario, a menor cristalinidad mayor solubilidad.

4.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA SOLUBILIDAD

Existen diversos factores que pueden influir en la solubilidad de los fármacos:

- El tamaño y la forma de las zonas apolares del fármaco a solubilizar. Ambos factores condicionan el punto de ebullición de la solución. Cuanto mayor sea dicho punto de ebullición menor será la solubilidad del fármaco.
- El punto de fusión es indicativo de la cohesión molecular que se produzca. Además, el punto de fusión, incluso de aquellas moléculas que forman soluciones no-ideales, es indicativo para predecir la solubilidad de un fármaco. En la tabla 2 se muestran las diferentes solubilidades de los derivados de sulfonamida.

Tabla 2. Solubilidad de los distintos derivados de la sulfonamida.

<i>Compuesto</i>	<i>Punto de fusión (°C)</i>	<i>Solubilidad</i>
Sulfadiacina	253	0,077 g/l
Sulfameracina	236	0,200 g/l
Sulfapiridina	192	0,290 g/l
Sulfatiazol	174	0,590 g/l

La influencia de los diferentes sustituyentes en la solubilidad de los fármacos en agua, depende directamente de las propiedades del soluto, por ejemplo, de la fuerza de cohesión del propio fármaco, o por las posibles interacciones que se produzcan entre dicho sustituyente y las moléculas de agua.

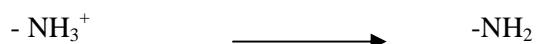
- El grado de ionización es otro factor importante en la solubilidad de los fármacos. Dicho factor depende directamente del pH de la solución en que se encuentre. Será uno de los factores más importantes a la hora de la administración “*in vivo*” del fármaco, debido a que de él dependen varios estadios de LADME: la absorción, distribución y excreción. A la vez será importante en la biodisponibilidad del fármaco administrado al organismo, por la posibilidad de mantener una proporción adecuada de porcentaje ionizado/porcentaje no ionizado.

El efecto del pH en la ionización de ácidos y bases débiles, puede resumirse de la siguiente manera:

Durante la disociación de los mismos, un determinado grupo químico pasa de ser un grupo apolar a ser polar:



o también:



Lógicamente, el grupo químico cargado favorece la solubilización de la sustancia en agua, mientras que ocurrirá lo contrario si el grupo químico no está cargado. Al cambiar el pH en un intervalo cercano al pK de este grupo químico, cambia la proporción de sustancia con el grupo químico cargado, por lo que la solubilidad de aquella también cambiará con el pH.

Los compuestos racémicos son moléculas formadas por cantidades equimoleculares de ambos enantiómeros (1:1). Como ya hemos mencionado anteriormente, los enantiómeros poseen las mismas propiedades físico-químicas, y en principio, lo único que les diferencia es la capacidad que poseen de desviar la luz polarizada hacia la izquierda (LEVO) o la derecha (DEXTRO). Por lo tanto las posibles modificaciones realizadas en un solvente simple y aquiral, pH, temperatura, sólo deberían afectar, al resultado total de los dos enantiómeros.

Por otro lado, la existencia en el solvente de sustancias quirales, como por ejemplo la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), algunos ácidos orgánicos (ac. tartárico), ciclodextrinas (CD), etc...pueden provocar la aparición de posibles diastereoisómeros que den lugar a la aparición de diferencias enantioselectivas entre ambos enantiómeros. Esta interacción sí puede originar cambios en la solubilidad y velocidades de cesión enantioselectivas y ha sido objeto de varios estudios y trabajos publicados anteriormente⁷¹.

4.2. SOLUBILIDAD EN CONDICIONES FORZADAS DE PRESIÓN Y TEMPERATURA.

Como hemos observado anteriormente, en los estudios previos de solubilidad, el KP, RBZ y TH se caracterizan por poseer una baja solubilidad en agua. Una forma de aumentar la solubilidad de dichas moléculas será por medio del uso de las ciclodextrinas (CD). Las CD poseen en su estructura una cavidad interna de carácter hidrófobo, siendo capaces de englobar en su interior al fármaco o alguna de sus partes hidrófobas.

Existen en la bibliografía diferentes métodos cuyo objetivo es aumentar la eficacia de penetración del fármaco dentro de la cavidad hidrófoba de la CD, añadiendo polímeros hidrosolubles, y/o ácidos orgánicos^{72,73}.

La influencia tanto de las CD como de los ácidos orgánicos ha sido descrito para el miconazol⁷⁴, otro derivado de los benzilmilcarbamatos poco soluble en agua. Por medio de la combinación de la hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) con el ácido láctico, se obtiene un gran aumento en su solubilidad, respecto a los resultados obtenidos cuando ambos compuestos se utilizan por separado. Este hecho supone también la posibilidad de reducir la cantidad de CD necesarias para la solubilización total, que como se comentará a continuación entre sus propiedades posee la de cierta toxicidad⁶⁶.

⁷¹ Duddu, D.P., Vakilynejad, M., Jamali, F., Grant, D.J.W. Stereoselective dissolution of propranolol hydrochloride from HPMC matrices. *Pharm. Res.*, 10 (11), 1648-1653, (1993).

⁷² Loftsson, T., Friðriksdóttir, H. The effect of water soluble polymers on the aqueous solubility and complexing abilities of β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* 163, 115-121, (1998).

⁷³ Savolainen, J., Jarvinen, K., Taipale, H., Jarho, P., Loftsson, T., Jarvinen, T. Co-administration of a water-soluble polymer increases the usefulness of cyclodextrin in solid oral dosage forms. *Pharm. Res.* 15, 1696-1701, (1998).

⁷⁴ Piel, G., Evrard, B., Fillet, M., Llabres, G., Delattre, L. Development of non-surfactant parenteral formulation of miconazole by the use of cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* 169, 15-22, (1998).

La cantidad óptima de polímero hidrosoluble necesario en la solución acuosa de CD oscila entre 0.05 y 0.25 %⁶⁵. Mayores concentraciones suelen provocar una disminución en la estabilidad de los complejos formados. Asimismo, para conseguir este efecto las mezclas deberán ser calentadas en un autoclave⁶⁵ entre 120 y 140°C por un tiempo que oscila entre 20 y 40 minutos.

4.2.1. Ciclodextrinas

Las CD forman un grupo de oligosacáridos estructuralmente relacionados que están formados por ciclación del almidón por un grupo de amilasas llamadas glucotransferasas, contienen 6, 7 y 8 unidades de D-glucopiranosas (α , β y γ -CD) unidas por enlaces glucosídicos α -(1-4). Tienen forma de receptáculo, son apolares, poseen una actividad hidrofóbica rica en electrones, con tamaños de cavidades internas de 0.5, 0.6 y 0.8 nm respectivamente. Los hidroxilos de estas macromoléculas están orientados hacia el exterior creando sitios disponibles para interacciones hidrofílicas. Inicialmente, la cavidad de la CD está ocupada por moléculas de agua. La presencia de moléculas hidrofóbicas dispersas en medio acuoso conduce a la formación de complejos de inclusión no covalentes a través de desplazamientos de las moléculas de agua por dichas moléculas hidrofóbicas.

Como se ha señalado anteriormente una de las características principales de las CD será su forma cilíndrica, su cavidad central algo hidrófoba, así como su superficie exterior hidrofílica. La polaridad de la cavidad de la CD ha sido estimada⁷⁵ como similar a la de una mezcla de etanol 40% en agua. Debido a la carencia de rotación libre de los enlaces que conectan los enlaces de glucopiranosas, las ciclodextrinas no son moléculas perfectamente cilíndricas pero sí con algo de forma cónica. Todos los grupos hidroxilos primarios se localizan en el lado más amplio. Las CD naturales más comunes son las α , β y γ -CD. Para mejorar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las CD originales, éstas han sido modificadas. Los derivados de las CD pueden ser obtenidos haciendo reaccionar la CD con glucosa o maltosa. Otros derivados comunes de las CD son las formadas por alquilación (metil y etil β -CD) o por hidroxialquilación de los grupos hidroxilos (hidroxipropil e hidroxietil derivados de la α , β y γ -ciclodextrina). Estas manipulaciones frecuentemente transforman a la CD cristalina en mezclas

⁷⁵ Szejtli, J., Frömming, K.H. Cyclodextrin in Pharmacy, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (1994).

amorfos de derivados de CD isoméricas y en consecuencia, la solubilidad acuosa de los derivados es generalmente mayor que la de las CD originales.

Las CD naturales son solubles en agua. Debido a las características de flexibilidad que posee en su estructura la γ -CD es la que más se solubiliza. La tabla 3 muestra las diferentes solubilidades de las CD naturales en función de la temperatura:

Tabla 3. Solubilidad de las CD a diferentes temperaturas.

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Ciclodextrina (g/100ml)</i>		
	α	β	γ
25	17.70	1.88	25.60
35	20.40	2.83	39.00
45	28.50	4.40	58.50

La baja solubilidad de la β -CD se explica debido a la existencia de múltiples enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilos secundarios. El hidroxilo que se encuentra en el C₂ de una unidad de glucopiranososa puede formar un puente de hidrógeno con el hidroxilo adyacente. Debido a la formación de estos enlaces de hidrógeno intramoleculares se produce una estabilización de la estructura macrocíclica de la CD, formándose esta vez un anillo rígido. La formación de estos enlaces impiden que se hidrate la molécula, lo cual viene a acentuar probablemente la baja solubilidad de la β -CD⁷⁶.

Las moléculas de CD pueden presentar dos tipos de estructura cristalina: en entramado y en canal. 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.

⁷⁶ Szente, L. Hydroxypropyl β cyclodextrin, preparation and physicochemical properties. New trends in cyclodextrins and derivates. Pharm. Techn. Int., 2 (6), 21-29, (1991).

Dentro de este tipo de estructuras, las moléculas de CD pueden presentar tres formas de empaquetamiento: tipo canal, tipo empalizada y tipo pared de ladrillos⁷⁷.

Las estructuras tipo canal se diferencian de las de tipo entramado en que las moléculas de CD se encuentran apiladas unas encima de otras. Las moléculas del fármaco están embebidas dentro de los canales sin fin, constituidos por las alineaciones de las cavidades de las CD. Estas alineaciones pueden ser de dos tipos⁷⁸: cara/cara o bien cara/cruz.

Las CD cristalizadas obtenidas a partir de soluciones acuosas no poseen sus estructuras vacías, sino que contienen moléculas de agua en su interior. Los compuestos de inclusión se obtienen sustituyendo estas moléculas de agua por moléculas de un fármaco adecuado. También el agua de cristalización es parte integrante de la estructura cristalina de la CD⁷⁹.

Como se ha descrito anteriormente la β -CD posee una pequeña solubilidad, siendo la que posee un diámetro de cavidad de 6 Å, adecuada para albergar en su interior numerosos tipos de fármacos, incluso aquellos que poseen en su estructura grupos aromáticos. Por estas razones se han intentado hacer diversas modificaciones con el fin de aumentar su solubilidad.

Dichas modificaciones han dado origen a los distintos tipos de β -CD:

1. Alquiladas y metiladas. Las metiladas estuvieron incluidas entre los primeros grupos estudiados en vista de sus aplicaciones farmacéuticas⁸⁰. Al introducir grupos metilo entre los hidroxilos del C₂, C₃ y C₆ de la β -CD, se evita la formación de puentes de hidrógeno y se producen cambios radicales en las propiedades fisicoquímicas de la CD inicial, especialmente incrementándose su solubilidad.
2. Hidroxipropiladas e hidroxietiladas. (Figura 11).

⁷⁷ Szejtli, J. Cyclodextrin Technology, topics in inclusion science. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (1998).

⁷⁸ Moyano Méndez, J.R., Ginés Dorado, J.M. Arias Blanco, M.J. Rabasco Álvarez, A.M. Utilidad de ciclodextrinas y derivados en el campo farmacéutico. *Tecn. Farm.* 71-76, (1994).

⁷⁹ Szejtli, J. Cyclodextrin Technology, topics in inclusion science. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (1988)

3. Ramificadas: glucosil-, diglucosil-, maltosil- y dimaltosiladas.
4. Carboximetiladas.
5. Con radicales sulfoalquileter⁸¹. Estos tipos de CD se logran a partir de los grupos hidroxilos que se encuentran disponibles para hacer posibles estas modificaciones estructurales pudiéndose incorporar diferentes grupos funcionales a las moléculas de CD.
6. Poliméricas. Las cuales poseen al menos dos unidades de CD, y su peso molecular asciende al menos 3000 g/mol. El grado de polimerización depende del proceso de preparación, suelen ser una mezcla de pesos moleculares y por tanto se encontrarán en estado amorfo⁸².

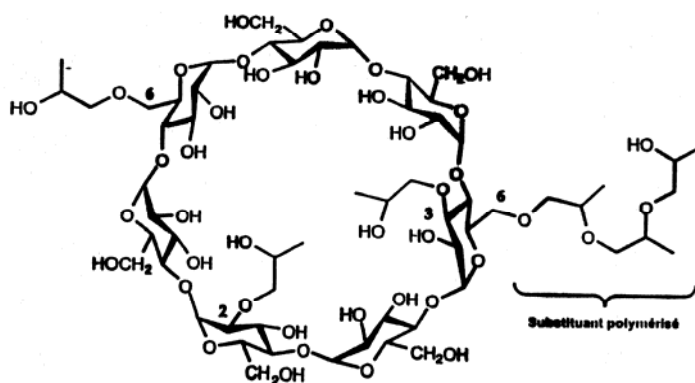


Figura 11. Estructura de la HPβCD

4.2.1.1. Características biofarmacéuticas y farmacocinéticas.

- a) Administración oral. La inclusión de un principio activo en un complejo de CD puede reducir sus características organolépticas (ej. sabor amargo)⁸³, además de algunos efectos

⁸⁰ Uekama, M. Pharmaceutical applications of methylated cyclodextrins. *Pharm. Int.* 6, 61-65, (1985).

⁸¹ Rajewski, R.A., Stella, V.J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins and derivatives. 2. In vivo drug delivery. *J. Pharm. Sci.* (85), 1142-1169, (1996).

⁸² Pitha, J., Milecki, J., Fales, H., Pannel, L., Uekama, K. Hydroxypropyl-β-cyclodextrin, preparation and characterization, effect on solubility of drugs. *Int. J. Pharm.* 29, 73-83, (1986).

⁸³ Fujioka, K., Kurosaky, Y. Sato, S. Noguchi, T., Yamahira, Y. Biopharmaceutical study of inclusion complexes of benzocaine fumarate. *Chem. Pharm. Bull.* 31, 2416, (1983).

secundarios nocivos, como por ejemplo la destrucción de las membranas de la mucosa gástrica por ciertas sustancias inflamatorias no esteroideas⁸⁴ (AINES).

En cuanto a la biodisponibilidad, se observa generalmente un aumento si la inclusión del ingrediente activo ya ha mejorado su disolución. No solamente es la concentración sanguínea máxima más alta ($>C_{\max}$), con la aparición más rápida de los picos ($<t_{\max}$), sino que el área bajo la curva es mayor ($>AUC$) (concentración plasmática/tiempo). En algunos casos, la mejoría en la biodisponibilidad causada por la inclusión es tal que algunas veces se puede considerar una reducción en la dosis a administrar, lo cual se reflejará en un aumento en el efecto terapéutico. Este hecho ha sido descrito en la bibliografía por varios autores^{85,86}

- b)** Administración rectal. La influencia de las CD en la cesión de diversos fármacos en ensayos tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” ha sido estudiado⁸⁷. Los ensayos *in vivo* mostraron un comportamiento diferente para cada fármaco evaluado, en el caso del diazepam forma un complejo con la γ -CD que se absorbe relativamente rápido; por otro lado en el ibuprofeno se observa que al ser administrado a dosis elevadas este hecho disminuye su absorción. Para la prednisona no se observa ningún incremento en la biodisponibilidad al formar complejo con la β -CD, y sin embargo se detectó una reducción en la variabilidad de la absorción.
- c)** Administración cutánea. En diversas citas bibliográficas^{88,89} se encuentran diversas líneas de investigación dedicadas al estudio de la liberación y absorción percutánea de dos corticoides incluidos en β -CD y formulados en bases hidrofílicas. Se observó que la liberación de los ingredientes activos fue aumentada por la inclusión, además de que uno de ellos mostró un incremento en el efecto constrictor lo que parece reflejar una mejoría en la absorción

⁸⁴ Otero espinar, F.J., Anguiano Igea, S., Blanco Méndez, J., Vila Jato, J.L. Reduction in the ulcerogenicity of naproxen by complexation with β -cyclodextrin. Int. J. Pharm. 70, 35-41, (1991).

⁸⁵ Koizumi, K., Miki, H., Kubota, Y. Enhancement of the hypnotic potency of barbiturates by inclusion complexation with β -cyclodextrin. Chem. Pharm. Bull. 28(1), 319-322, (1980).

⁸⁶ Soliman, E.O.A., Kimura, K., Hirayama, F., Uekama, K., El-Sabbagh, H.M. Amorphous spirinolactonehydroxypropilated cyclodextrin complexes with superior dissolution and bioavailability. Int. J. Pharm. 149, 73-83, (1997).

⁸⁷ Frijlink, H.W., Eissens, A.C., Schoonen, A.J.M., Lerck, C.F. The effects of cyclodextrins on drug release from fatty suppository bases. Application of cyclodextrin derivatives. Eur. J. Pharm. Biopharm. 38 (5), 174-179, (1992).

⁸⁸ Otagiri, M., Fujinaga, T., Sakai, A., Uekama, K. The effects of β - and γ -cyclodextrins on release of betamethasone from ointment bases. Chem. Pharm. Bull. 32 (6), 2401-5, (1984).

percutánea⁸². Otro estudio con complejos de piroxicam y β -CD⁹⁰ fue estudiado observándose que la CD incrementa directa o indirectamente el transporte de complejo. En este campo también se han realizado estudios en animales para observar los efectos de los derivados de CD formando complejos con diversos anestésicos locales⁹¹.

- d)** Administración ocular. Las β -CD⁹² son capaces de reducir la irritación local que se produce en algunas ocasiones. Se han estudiado también los efectos que producen las ciclodextrinas en la liberación tópica⁹³ de fármacos en el ojo. Se cree que las CD pueden ser útiles para reformular suspensiones oftálmicas y transformarlas en soluciones, superando en estos casos muchos de los problemas que se asocian con la formulación de fármacos escasamente solubles en agua⁹⁴.
- e)** Administración ocular. La inocuidad de las CD administradas vía oral parece ser altamente probable⁹⁵, pero ésto no puede extrapolarse a la administración de éstas por vía parenteral^{96,97}.

4.2.1.2. Toxicidad

Uno de los requisitos que deben cumplir los excipientes, y entre ellos las CD consisten en que no deben tener citotoxicidad intrínseca, o si tienen algo, deben ser niveles aceptablemente bajos. Un estudio con eritrocitos aislados, que no poseen núcleo, mitocondrias, retículo endoplasmático u otros

⁸⁹ Uekama, K., Otagiri, M., Sakai, A., Irie, T., Matsuo, N., Matsuoka, Y. J. Improvements in the percutaneous absorption of beclomethasone dipropionate by γ -cyclodextrin complexation. *Pharm. Pharmacol.* 37(8), 532-5, (1985).

⁹⁰ Bettini, R., Santi, P., Catellani, P. L., Massima, G., Bellotti, A., Guyot-Hermann, A. M., Trublin, F., Colombo, P. Permeation of piroxicam β -cyclodextrin through artificial membranes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 38 (6), 203-208, (1992).

⁹¹ Dollo, G., Thompson, D. O., le Corre, P., Chevanne, F., Le Verge, R. Inclusion complexation of amide-typed local anesthetics with β -cyclodextrin and its derivatives. III. Biopharmaceutics of bupivacaine-SBE7- β CD complex following percutaneous sciatic nerve administration in rabbits. *Int. J. Pharm.* 164, 11-19, (1998).

⁹² Masuda, K., Ito, A., Ikari, T., Terashima, A., Matsuyama, T. Protective effects of cyclodextrin on the local irritation induced by aqueous preparation of flurbiprofen. *Yakugaku Zasshi.* 104, 1075, (1984).

⁹³ Loftsson, T., Stefanson, E. Effect of cyclodextrins on topical drug delivery to the eye. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23 (5), 473-481, (1997).

⁹⁴ Davies, N. M., Wang, G., Tucker, I. G. Effect of a hydrocortisone/hydroxypropyl- β -cyclodextrin solution for ocular drug delivery. *Int. J. Pharm.* 156, 201-209, (1997).

⁹⁵ Szjtli, J. J. *Incl. Phenom.* 2, 487, (1987).

⁹⁶ Brewster, M. E., Anderson, W. R., Estes, K. S., Bodor, N. Development of aqueous parenteral formulations for carbamazepine through the use of modified cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.* 80 (4), 380-383, (1991).

⁹⁷ Frijlink, W. H., Visser, J., Hefting, N. R., Meijer, D. K. F., Lerck, C. F. The pharmacokinetics of β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin in the rat. *Pharm. Res.* 7 (12), 1248-1252, (1990).

organelos han proporcionado medidas simples y fiables para clasificar a las CD según su citotoxicidad a causa de su interacción con las membranas que es donde se produce el inicio del daño celular. Se sabe que las CD inducen cambios en la forma de la invaginación de la membrana en los eritrocitos humanos, y a altas concentraciones, inducen a la lisis^{98,99}.

Se ha descrito que la actividad hemolítica de las CD naturales se da en el siguiente orden: α -CD > β -CD > γ -CD. Esta categorización se debe a las diferentes velocidades de solubilización de los componentes de la membrana por cada una de las CD. La que tiene menor selectividad lipídica de las tres CD es la γ -CD.

Las CD después de ser administradas oralmente no se hidrolizan durante su tránsito por el intestino delgado; la degradación enzimática por hidrólisis de la flora bacteriana ocurre en el colon. Las CD naturales son resistentes a las β -amilasas, que atacan a las terminaciones libres de los grupos, pero pueden ser atacadas por las α -amilasas, que están activas dentro de la molécula. Las velocidades de degradación para α , β y γ -CD son muy diferentes; la velocidad máxima de hidrólisis para la β y γ -CD son, respectivamente casi 30 y 500 veces mayor que la medida para la α -CD. Hasta ahora se ha demostrado que la α , y la β -CD pueden ser absorbidas, pero muy poco, por el intestino delgado¹⁰⁰.

La administración oral de las CD no da lugar a problemas de toxicidad aguda o crónica ni a cambios significativos en los órganos o en los valores sanguíneos biológicos normales.

Las consecuencia derivadas de la administración parenteral de las CD naturales son completamente diferentes¹⁰¹. De hecho, la aplicación intramuscular de la β -CD da lugar a ulceraciones y la administración intravenosa produce nefrotoxicidad y efectos hemolíticos. Probablemente debida a su alta solubilidad y rápida degradación enzimática. La γ -CD no presenta tan marcada nefrotoxicidad,

⁹⁸ Irie, T., Otagiri, M., Sunada, M., Uekama, K., Ohtani, Y., Yamada, Y., Sugiyama, Y. Cyclodextrin-induced hemolysis and shape changes of human erythrocytes in vitro. *J. Pharmacobio-Dyn.* 5, 741-744, (1982).

⁹⁹ Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K., Pitha, J.J. Differential effects of alpha, beta and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 186 (1-2), 17-22, (1989).

¹⁰⁰ Irie, T., Tsunenari, K., Uekama, K., Pitha, J. Effect of bile on the intestinal absorption of cyclodextrin in rats. *Int. J. Pharm.* 43, 41-44, (1988).

y por lo tanto, su actividad hemolítica es mucho menor que las de las α -CD y la β -CD¹⁰². La actividad hemolítica de las CD puede ser la consecuencia de la rotura de membranas causado por la disolución y las separación de los componentes de dichas membranas tales como los fosfolípidos, proteínas y colesterol. Los derivados de CD presentan diferentes perfiles tóxicos y metabólicos.

La HP β CD no son hidrolizadas por las amilasas gastrointestinales. Estudios de toxicidad a largo plazo de HP β CD en ratas no revelan ni toxicidad, ni signos visibles de alteraciones patológicas, aunque el grupo experimental mostró un ligero incremento en peso cuando se comparó con el grupo control. Este hecho puede ser debido a la formación de complejos con los ácidos biliares, inhibiendo su acción desde el intestino y conduciendo por tanto a un incremento en su síntesis, que puede haber sido responsable del alargamiento observado del hígado.

La HP β CD presenta menor actividad hemolítica que la β -CD y la 2,3-HP β CD es algo menos hemolítica que la 2- y 3- hidroxipropilderivadas. La actividad hemolítica de la HP β CD disminuye linealmente con un aumento en su grado de sustitución¹⁰³. La capacidad que tiene la HP β CD de movilizar el colesterol y la proteína de la membrana del eritrocito humano es menor que la de la β -CD y de la 3-HP β CD (con el correspondiente grado de sustitución) y disminuye con un incremento en el grado de sustitución. Además la 2-HP β CD no causa irritación al músculo aún a una concentración de 100 mg/ml⁹⁷.

4.2.1.3. Ventajas y aplicaciones de los derivados de las ciclodextrinas.

Las CD se emplean por su buena capacidad para formar complejos de inclusión sin que sea necesario la aparición de enlaces químicos. La molécula huésped (fármaco) debe ser adecuada en tamaño y forma para poder encajar dentro de la cavidad de la estructura sólida formada por la molécula receptora (CD).

¹⁰¹ Szejtli, J. The metabolism, toxicity and biological effects of cyclodextrins. Cyclodextrins and their industrial uses. D. Ducheme. (Ed). Editions de Santé, Paris, (1987).

¹⁰² Uekama, K., Irie, T. Pharmaceutical applications of methylated cyclodextrin derivatives. Cyclodextrins and their industrial uses. D. Ducheme (Ed) Editions de Santé, Paris, (1987).

¹⁰³ Yoshida, A., Yamamoto, M., Irie, T., Hirayama, F., Uekama, K. Some pharmaceutical properties of 3-hydroxypropyl and 2,3-hydroxypropyl- β -cyclodextrins and their solubilizing and stabilizing abilities. Chem. Pharm. Bull. 37, 1059-1063, (1989).

Al igual que las CD naturales, los derivados de las CD pueden atrapar moléculas huéspedes, cambiando sus propiedades fisicoquímicas y farmacéuticas, y especialmente su solubilidad, biodisponibilidad, estabilidad y poder de irritación.

La CD son utilizadas habitualmente para aumentar:

- A) La solubilidad de fármacos poco solubles.
- B) La biodisponibilidad.
- C) La estabilidad.

4.2.2. Combinación de las CD con polímeros e hidroxiacidos.

Frecuentemente es posible facilitar la solubilización a través de la complejación con CD de fármacos ionizables mediante un ajuste de pH. Así, para algunos fármacos es posible favorecer la complejación y, por consiguiente, el efecto solubilizante de la CD mediante la adición de *polímeros hidrosolubles* y/o *hidroxiacidos* a las soluciones de CD¹⁰⁴. Se ha demostrado que polímeros tales como los derivados acuosolubles de la celulosa y otros agentes reológicos, pueden formar complejos con CD originales. En soluciones acuosas los polímeros acuosolubles aumentan el efecto solubilizante de las CD sobre varios fármacos hidrofóbicos mediante el aumento de la constante de formación del complejo fármaco-CD. Los polímeros serán capaces también de aumentar la solubilidad acuosa de las CD originales sin disminuir sus propiedades complejantes, haciéndolas más factibles como excipientes farmacéuticos¹⁰⁵.

Por otro lado, la adición de hidroxiacidos tales como los ácidos cítrico, málico y tartárico, pueden aumentar el efecto solubilizante de las CD a través de la formación de complejos ternarios/supercomplejos o sales⁹⁸. Frecuentemente es posible obtener mayores índices de solubilización mediante la aplicación simultánea de varios métodos. Esta combinación de métodos para aumentar la solubilidad del fármaco, tendrán también como fin el disminuir la cantidad de CD adicionada al medio, lo que puede ser útil para disminuir los costes económicos, y los efectos tóxicos que éstas pueden originar.

¹⁰⁴ Álvarez, C., Van Hess, T., Piel, G., Liégeois, J.F., Delattre, L., Evrard, B. Preparation of Mebendazole HPBCD complexes using water-soluble polymers and organic acids. S.T.P. Pharm. Sci. 11(6), 439-442, (2001).

¹⁰⁵ Loftsson, T., Gudmundsdóttir, T.K., Fridriksdóttir, H. Drug Dev. Ind. Pharm. 22, 403-407, (1996).

Como hemos señalado anteriormente y en concreto la HP β CD, presenta carbonos asimétricos en su estructura, lo cual le confiere propiedades quirales. Existen en la bibliografía¹⁰⁶ numerosas citas advirtiendo el posible efecto enantioselectivo que puede ejercer la combinación de un fármaco racémico con un excipiente que posea propiedades quirales.

A continuación se describen los polímeros hidrosolubles (HPMC y PVP) y los hidroxiácidos (el ácido cítrico y el ácido tartárico) utilizados en el estudio.

4.2.2.1. Polímeros hidrosolubles

A. Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)

Es un derivado de los éteres de celulosa¹⁰⁷, grupo muy utilizado en la formulación de matrices hidrofílicas¹⁰⁸. El proceso de semisíntesis de estos éteres consiste en hacer reaccionar celulosa purificada con diferentes agentes químicos en presencia de una base dando lugar a diversas macromoléculas dependiendo de los reactivos que se utilicen. La hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), cuya estructura se recoge en la figura 12, es el éter de celulosa más utilizado. Existen diferentes tipos en función del grado de sustitución de los grupos metoxilo e hidropropoxilo presentes en las unidades de glucosa anhidra, cuyas diferencias dan lugar a polímeros con diferentes grados de viscosidad. Se presenta en forma de polvo fibroso o granular de color blanco a crema, sin olor ni sabor. Es soluble en agua fría formando soluciones coloidales, prácticamente insoluble en cloroformo, etanol (95 %) y éter. La principal característica de dicho excipiente es la presencia de grupos asimétricos en su estructura la cual le confiere características quirales.

¹⁰⁶ Suedee, R., Srichana, T., Rattananont, T. Enantioselective release of controlled delivery granules based on molecularly imprinted polymers. *Drug Deliv.*, 9(1), 19-30, (2002).

¹⁰⁷ Wade, A., Weller, P.J. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 229-232. Second Edition, American Pharmaceutical Association, Washington, (1994).

¹⁰⁸ Melia, C.D. Hydrophilic matrix sustained-release systems based on polysaccharide carriers. *Critical reviews in Therapeutic Drug carrier Systems*, 8, 395-421, (1991).

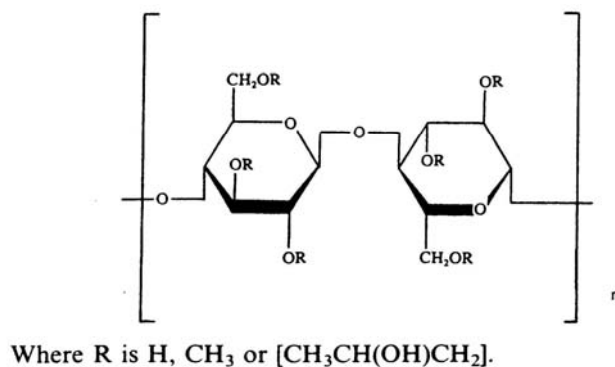


Figura 12. Estructura general de la HPMC

B. Polivinilpirrolidona (PVP)

Se trata de un polímero de la N-vinilpirrolidona (figura 13) que se comercializa con una serie de nombres, Kollidon®, Plasdone®, con un peso molecular de entre 10.000 a 700.000. Es un polvo blanco cremoso, higroscópico, fácilmente soluble en agua a temperaturas superiores a 60°C, y muy soluble en alcoholes o en disolventes orgánicos. Por encima del 10% forma soluciones viscosas, de reacción neutra o ligeramente ácida. La viscosidad depende directamente del peso molecular que posea y de su concentración. En solución se caracteriza por ser compatible con numerosas sales orgánicas.

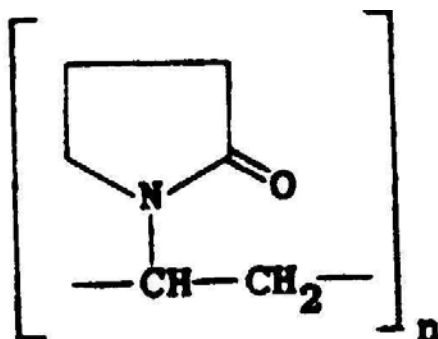


Figura 13. Estructura química de la PVP.

Pueden aumentar la hidrosolubilidad de los fármacos, utilizándose como soporte inerte soluble en la formación de dispersiones sólidas de fármacos con fines de modificar su solubilidad y su

velocidad de disolución. No obstante, hay que considerar la posibilidad de que origine complejos (por ejemplo, fenitoina¹⁰⁹) que pueden ser causa de inactividad.

Se trata, también, de un agente viscosizante y dispersante en formas líquidas; entre el 10 y el 15% origina geles plásticos extensibles con aplicación en tecnología de pomadas. Diluyente y aglutinante de comprimidos. Su variedad reticulada Polyplasdone® tiene especial aplicación como disgregante.

En la tabla 4 mostrada a continuación se muestran las principales características de la PVP¹¹⁰:

Tabla 4. Principales características de la PVP.

<i>Acidez/Alcalinidad</i>	PH 5.0-8.0
<i>Densidad</i>	1.22 g/cm ³
<i>Humedad</i>	Máx. 60%
<i>Tamaño de Partícula</i>	Polyplasdone® < 400 µm Polyplasdone® XL-10 < 74 µm Kollidon® CL < 50 µm (50 %) > 250 µm (max. 1%)
<i>Contenido de sodio</i>	39 ppm Kollidon CL 209 ppm Polyplasdone XL
<i>Superficie específica</i>	1.03 m ² /g

¹⁰⁹ Tanino T, Ogiso T, Iwaki M. Effect of sugar-modified beta-cyclodextrins on dissolution and absorption characteristics of phenytoin. Biol. Pharm. Bull. Mar;22(3), 298-304, (1999).

¹¹⁰ Wade, A., Weller, P.J. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 229-232. Second Edition, American Pharmaceutical Association, Washington, (1994).

4.2.2.2. Hidroxiácidos

A. Ácido cítrico monohidrato

El ácido cítrico monohidrato, (ac. 2-hidroxiopropano-1,2,3-tricarboxílico monohidrato), es comúnmente utilizado tanto en formulación farmacéutica, como en la industria de la alimentación para ajustar el pH de determinadas soluciones, enmascarar sabores desagradables, como agente antioxidante o como agente quelante. Su fórmula estructural se muestra a continuación:

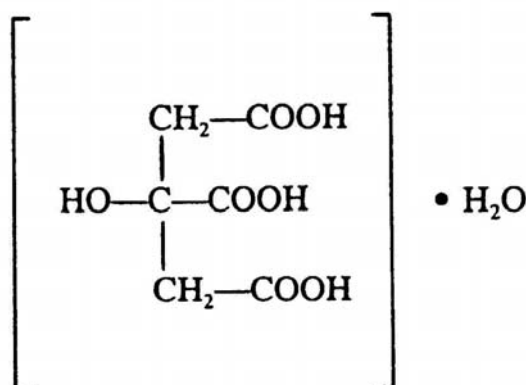


Figura 14. Fórmula estructural del ácido cítrico monohidrato.

Como se puede observar en su estructura, el ácido cítrico no posee átomos asimétricos, y así por tanto, no posee propiedades quirales. Será utilizado en nuestro trabajo como agente facilitador de la formación de complejos con las CD, debido a sus propiedades quelantes, así como acidificadoras de la solución. Los fármacos RBZ y TH, con propiedades estructurales claramente básicas, descritas con anterioridad, aumentan su solubilidad intrínseca en medio ácido. Este efecto sumado a su tendencia a facilitar la formación de complejos ternarios¹¹¹ con las CD, será un factor limitante a tener en cuenta en nuestros resultados.

¹¹¹ Álvarez, C., Van Hees, T., Piel, G., Liegois, J.F., Delattre, L., Evrard, B. Preparation of Mebendazole HPBCD complexes using water-soluble polymers and organic acids. S.T.P. Pharm. Sci. 11(6), 439-442, (2001).

En la tabla 5¹¹² que se muestra a continuación se ha anotado, distintas propiedades características del ácido cítrico:

Tabla 5. Principales características del ácido cítrico monohidrato.

<i>Acidez/Alcalinidad</i>	pH =2.2 (1% w/v en solución acuosa)
<i>Densidad</i>	1.542 g/cm ³
<i>Calor de combustión</i>	-1972 kJ/mol (-471 kcal/mol)
<i>Calor en solución a 25°C</i>	-16.3 kJ/mol (-3.9 kcal/mol)
<i>Higroscopicidad</i>	65-75% poca >75% alta captación de agua.
<i>Punto de fusión</i>	100°C
<i>Solubilidad</i>	1 en 1.5 partes de etanol (95%) 1 en menos de 1 parte de agua
<i>Tamaño de partícula</i>	Para textura granular: 99% a través de 4 mm, y un máximo del 10% a través de 590 µm. Para textura de polvo: Al menos un 95% a través de 250 µm, y al menos 65% a través de 73.7 µm.
<i>Viscosidad</i>	6.5 mPas (6.5 cP) para una solución acuosa al 50% (w/v) a 25°C.

B. Ácido Tartárico

El ácido tartárico (ac. 2,3-dihidroxisuccínico) es utilizado al igual que el ácido cítrico tanto en la industria farmacéutica como en la industria de la alimentación. Sus principales usos serán como agente acidulante y/o acidificante, enmascarador de sabores o antioxidante. Su estructura química se muestra a continuación:

¹¹² Wade, A., Weller, P.J. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 123-125. Second Edition, American Pharmaceutical Association, Washington, (1994).

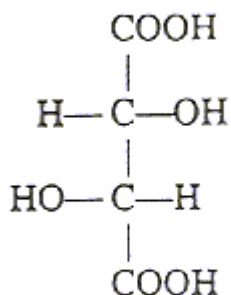


Figura 15. Estructura química del ácido tartárico.

Como se puede observar en la figura 15, el ácido tartárico posee asimetría en su estructura, característica que cobra relevancia en nuestro estudio experimental. Se utilizará el ácido tartárico como agente acidificador del medio así como facilitador de la formación de complejos con las CD de los fármacos con características básicas (RBZ y TH), y se observará comparativamente la influencia de su uso en comparación con el del ácido cítrico en la posible aparición de diferencias enantioselectividad en la solubilidad de los enantiómeros de ambos fármacos.

Dentro de las sustancias relacionadas podemos encontrar, el ácido D-(-)-tartárico, y el ácido DL-(±)-tartárico, siendo el primero obtenido a partir de la reacción del segundo con ciertos microorganismos, y el segundo a través de la ebullición del ácido L-(+)-tartárico en una solución de hidróxido sódico.

Las principales características del ácido tartárico se muestran en la tabla 6¹¹³ expuesta a continuación:

¹¹³ Wade, A., Weller, P.J. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 522-523. Second Edition, American Pharmaceutical Association, Washington, (1994).

Tabla 6. Principales características del ácido tartárico.

<i>Acidez/Alcalinidad</i>	pH = 2.2 (1.5% w/v en solución acuosa)
<i>Densidad</i>	1.76 g/cm ³
<i>Constantes de disociación</i>	PK _{a1} = 2.93 a 25°C PK _{a2} = 4.23 a 25°C
<i>Calor de combustión</i>	1151 kJ/mol (275.1 kcal/mol)
<i>Punto de fusión</i>	186-170 °C
<i>Osmolaridad</i>	3.9% w/v en solución acuosa es iso-osmótica con suero
<i>Solubilidad (a 20 °C)</i>	Cloroformo: Prácticamente insoluble Etanol (95 PK _{a1} = °C): 1 en 2.5 Eter: 1 en 250 Glicerina: Soluble Metanol: 1 en 1.7 Propanol: 1 en 10.5 Agua 1 en 0.75 1 en 0.5 a 100 °C
<i>Calor específico (a 20°C)</i>	1.20 J/g (0.288 cal/g)
<i>Rotación específica</i>	[α] _D ²⁰ : + 12.0° (20 % w/v en solución acuosa)

4.2.3. Combinación de las CD con polímeros hidrosolubles y trietanolamina (Ketoprofeno)

Como ya hemos descrito anteriormente se procede a realizar la combinación de los polímeros hidrosolubles, con hidroxiacidos para facilitar la formación de complejos con las CD. Dichos ácidos orgánicos acidificarán las soluciones y por tanto aumentaran la solubilidad de fármacos con características básicas, como ya se ha citado anteriormente, el RBZ y la TH.

Para el tercer fármaco estudiado, el KP, se ha decidido modificar el estudio. Como ya hemos comentado anteriormente, el KP es un fármaco con características ácidas, por lo tanto la inclusión de éste en un medio acidificado por los ácidos orgánicos (cítrico y tartárico) no verá favorecida su capacidad de solubilizarse, sino todo lo contrario, y por tanto tampoco la inclusión del mismo en la cavidad de la CD. Por lo tanto y para favorecer la solubilidad del KP, hemos decidido utilizar un agente alcalinizante como la trietanolamina (TEA).

4.2.3.1. Trietanolamina (TEA)

La TEA, (2,2',2''-Nitrilotrietanol) se caracteriza por ser un agente alcalinizante, así como emulsificante. Su fórmula química se describe a continuación:



Figura 16. Fórmula química de la TEA.

En la tabla 7¹¹⁴ a continuación se observan sus diferentes características fisico-químicas:

Tabla 7. Principales características de la TEA.

<i>Acidez/Alcalinidad</i>	pH = 10.5 en solución acuosa 0.1N
<i>Temperatura de autoignición</i>	620 °C
<i>Temperatura de fusión</i>	335 °C
<i>Densidad</i>	1.1242 g/cm ³ a 20 °C 1.0985 g/cm ³ a 60 °C
<i>Constante de disociación</i>	PK _a =7.8 a 25 °C
<i>Higroscopicidad</i>	Muy higroscópico
<i>Punto de fusión</i>	20-21 °C
<i>Solubilidad a 20 °C</i>	Acetona: Miscible Benceno: 1 en 24 Cloroformo: Soluble Etanol (95°C): Miscible Eter: 1 en 63 Metanol: Miscible Agua: Miscible
<i>Tensión superficial a 20 °C</i>	47.5 mN/m
<i>Viscosidad</i>	590 mPa s (590,5 cP) a 25 °C 65.7 mPa s (65,7 cP) a 60 °C

¹¹⁴ Wade, A., Weller, P.J. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 538-539 Wade, A., Weller, P.J. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 123-125. Second Edition, American Pharmaceutical Association, Washington, (1994).
Second Edition, American Pharmaceutical Association, Washington, (1994).

5. FORMULACIONES ORALES DE CESIÓN SOSTENIDA Y QUIRALIDAD.

La FDA considera las formulaciones de liberación sostenida como *"aquellas diseñadas para liberar un principio activo a velocidades que difieren significativamente de aquellas formulaciones de liberación inmediata"*.

Las principales ventajas que ofrecen se detallan a continuación:

- Se evitan algunos problemas por incumplimiento de la posología por parte de los pacientes. Se simplifica la posología por disminución de las tomas cotidianas de medicamentos.
- Se utiliza además menos cantidad de fármaco, con lo que se reducen o incluso se llegan a eliminar los efectos secundarios. (Por ejemplo: Intoxicación del paciente cuando se sobrepasa la concentración mínima tóxica)
- Se mejora su eficacia de tratamiento ya que la enfermedad remite o se controla antes debido a que se reduce la fluctuación del nivel de fármaco. Se mejora con ello la biodisponibilidad de algunos de éstos.

Según el mecanismo de liberación del principio activo, los sistemas de cesión sostenida que se administran por vía oral, pueden clasificarse de la siguiente manera ^{115,116}:

- Sistemas de difusión controlada:
 1. Sistema reservorio o de membrana
 2. Sistemas matriciales o monolíticos
- Sistemas de disolución controlada
- Sistemas bioerosionables
- Sistemas controlados por la presión osmótica
- Sistemas de intercambio iónico

¹¹⁵ Jantzen, G.M.; Robinson, J.R. Sustained and controlled-release drug delivery systems. En: Banker, G.S.; Rhodes, C.T. (eds). Modern Pharmaceutics. Marcel Dekker, Inc. New York (1996).

¹¹⁶ Swarbrick, J. Advances in controlled drug delivery. S.T.P. Pharm. Prat., 6:53-60, (1996).

Nos centraremos en los sistemas matriciales, debido a la tecnología simple que presentan y su bajo coste económico¹¹⁷.

5.1. SISTEMAS MATRICIALES

Los sistemas matriciales están constituidos por una dispersión uniforme de principio activo en el excipiente. La matriz es una red formada por canalículos de distinto calibre donde se halla incluido el principio activo sólido. Los excipientes utilizados para el desarrollo de sistemas matriciales son fundamentalmente de carácter inerte y forman un soporte poroso a modo de esponja. Dicho soporte constituye "el esqueleto de la matriz", y los poros estarán ocupados por el fármaco. La dosis del fármaco es dos o tres veces superior a la dosis normal, que se libera progresivamente por difusión lenta después de la penetración de los líquidos digestivos en los canalículos del soporte poroso. Los principales tipos de matrices son:

- Matrices inertes: Están constituidas por polímeros que tras el proceso de compresión, dan lugar a un esqueleto poroso. Por ejemplo: Polietileno, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, poliamida...
- Matrices hidrófilas: Elaboradas con agentes gelificantes que se hidratan progresivamente al entrar en contacto con los fluidos gástricos, permitiendo así la liberación del principio activo. Por ejemplo: derivados de los éteres de celulosa, alginatos, goma arábiga, gelatinas, carbopol...
- Matrices lipófilas: El fármaco se encuentra suspendido o incrustado en un material hidrófobo. Por ejemplo: alcoholes cetílico, esteárico y estearílico, aceite de ricino, polietilenglicol...

La cesión del principio activo a partir de un sistema matricial hidrófilo se puede producir de dos maneras distintas¹¹⁸, por erosión y desgaste de las capas más externas del gel con menor consistencia, o bien por disolución del principio activo en el medio, difundiendo a través de la barrera de gel una vez que éste se ha formado. Uno u otro proceso están relacionados directamente con la

¹¹⁷ Vila Jato, J.L., Delgado Charro, M.B. Matrices lipídicas como formas orales de liberación controlada. Industria farmacéutica, Sept-Oct. 85-95, (1992).

capacidad del polímero hidrófilo, utilizado para elaborar la matriz, para dar lugar a geles consistentes, y también con la hidrosolubilidad que posee el fármaco. Cuando el gel originado es muy débil o la solubilidad del fármaco muy baja, la importancia de la cesión por difusión será escasa y la liberación estará originada, entonces, principalmente por la erosión de la matriz, con lo que se obtendrán perfiles característicos de cinéticas de orden 0. Sin embargo, para aquellos medicamentos que posean una hidrosolubilidad aceptable, el mecanismo mayoritario responsable de la liberación será la difusión. La liberación del principio activo tendrá lugar de la manera siguiente¹¹⁹:

- Fase inicial: El agua disuelve el principio activo que se encuentra en la superficie de la matriz, se produce un efecto “BURST” o de liberación inmediata. Posteriormente, el agua se introduce por los poros de la matriz, que origina la gelificación del polímero. La velocidad de penetración depende de la porosidad del sistema y el gel formado no constituye, necesariamente, una capa continua, en especial, cuando las partículas del polímero son relativamente grandes.
- Fase estacionaria: El agua penetra de forma continua en el sistema, y se produce el hinchamiento del polímero. La cesión se encuentra controlada, en este momento, por el proceso de difusión, y no por la disolución del principio.
- Fase de agotamiento: La concentración del principio activo ha descendido por debajo del valor de su coeficiente de solubilidad. Se observa en esta etapa una disminución de la velocidad de cesión del fármaco.

Las matrices seleccionadas para este estudio son de carácter hidrófilo desarrolladas con un derivado de los éteres de celulosa; la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC 15), excipiente con características quirales y el Eudragit® RL, excipiente que no posee centros asimétricos en su estructura. Utilizaremos dichas matrices únicamente como vía tecnológica para observar la posible aparición de cesión enantioselectiva del KP, TH y RBZ.

¹¹⁸ Peppas, N.A. Analysis of fickian and Nonfickian drug release from polymers. *Pharm. Acta Helv.* 60, 110-11, (1985).

¹¹⁹ Doelker, E. Water swollen cellulose derivative in pharmacy. En: Peppas, N.A. (ed.) *Hydrogels in medicine and pharmacy*, vol. 2. CRC Boca Ratón. Florida, (1980).

En la bibliografía podemos encontrar estudios para otros fármacos quirales, propanolol¹²⁰, verapamilo¹²¹, ibuprofeno¹²² y salbutamol¹²³, los cuales estudiaron las posibles cesiones enantioselectivas de los enantiómeros a partir, de las matrices preparadas en cada caso. Los resultados difieren según los autores, y los fármacos estudiados. Según estos trabajos citados anteriormente, aparentemente existen pocas diferencias en la velocidad de cesión de los distintos enantiómeros, aunque en algunos casos, y dependiendo del tipo de excipiente utilizado para formar la matriz, si se han descrito velocidades de cesión enantioselectivas. Si bien es cierto que la posible relevancia clínica es mínima, puesto que son diferencias pequeñas en los valores de velocidad de cesión.

5.2. EXCIPIENTES PARA MATRICES DE CESIÓN SOSTENIDA

5.2.1. Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) (Ver apartado 4.2.2.1.A)

5.2.2. EUDRAGIT® (RL y RS) (Figura 17)

Se trata de un polímero acrílico (polimetacrilato¹²⁴) de carácter inerte, insoluble en agua, utilizado para el desarrollo de matrices que retrasan la cesión de los componentes activos de formulación independientemente del pH al que se trabaje. Otra utilidad de dicho polímero consiste en el recubrimiento de comprimidos y pelets. Su estructura se caracteriza por la presencia de ésteres de ácido metacrilato de carácter neutro con una pequeña proporción de clorhidrato de trimetilaminoetil metacrilato. Como se puede observar en su fórmula estructural no posee átomos asimétricos lo cual hace que dicho polímero no posea características quirales.

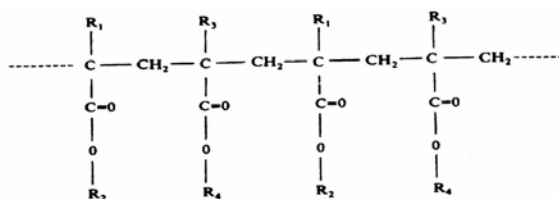
¹²⁰ Duddu, D.P., Vakilynejad, M., Jamali, F., Grant, D.J.W. Stereoselective dissolution of propanolol hydrochloride from HPMC matrices. *Pharm. Res.*, 10 (11), 1648-1653, (1993).

¹²¹ Aubrym, A.F., Wainer, I.W. An in vitro study of the stereoselective dissolution of (rac)-verapamil from sustained release formulations. *Chirality*, 5, 84-90, (1993).

¹²² Janjikhel, R.K., Adeyeye, C.M. Stereospecific formulation and characterization of sustained release ibuprofen microspheres. *J.Microencapsul.* 14(4), 409-426, (1997).

¹²³ Solinis, M.A., Lugará, S., Calvo, B., Hernández, R.M., Gascón, A.R., Pedraz, J.L. Release of salbutamol sulfate enantiomers from HPMC matrices. *Int. J. Pharm.*, 161, 37-43, (1998).

¹²⁴ Wade, A., Weller, P.J. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 362-366. Second Edition, American Pharmaceutical Association, Washington, (1994).



For *Eudragit E*:

$R_1, R_3 = CH_3$

$R_2 = CH_2CH_2N(CH_3)_2$

$R_4 = CH_3, C_4H_9$

For *Eudragit L* and *S*:

$R_1, R_3 = CH_3$

$R_2 = H$

$R_4 = CH_3$

For *Eudragit RL* and *RS*:

$R_1 = H, CH_3$

$R_2 = CH_3, C_2H_5$

$R_3 = CH_3$

$R_4 = CH_2CH_2N(CH_3)_3^+ Cl^-$

For *Eudragit NE 30 D*:

$R_1, R_3 = H, CH_3$

$R_2, R_4 = CH_3, C_2H_5$

For *Eudragit L 30 D-55* and *L 100-55*:

$R_1, R_3 = H, CH_3$

$R_2 = H$

$R_4 = CH_3, C_2H_5$

Figura 17. Fórmula estructural de los distintos tipos de polimetacrilato.

Dependiendo de la cantidad de amonios cuaternarios en su estructura encontramos los siguientes polímeros con características bien diferentes en cuanto a la cesión:

- A) EUDRAGIT RL. La proporción molar de los grupos amonios cuaternarios en su estructura con respecto a los ésteres neutros será de 1:20 (correspondiendo a aproximadamente 50 meq/100g).
- B) EUDRAGIT RS. La proporción molar en este caso será de 1:40 (correspondiendo a aproximadamente 25 meq/100g).

Debido a que los amonios cuaternarios determinan el hinchamiento del polímero, así como la permeabilidad de éste al agua, el EUDRAGIT RL, el cual posee mayor número de estos grupos formará matrices de cesión más rápida. Por el contrario, EUDRAGIT RS, con menos amonios cuaternarios en su estructura se hinchará más difícilmente y formará matrices menos permeables.

Debido a las características anteriormente descritas y haciendo mezclas de ambos tipos EUDRAGIT RS (cesión lenta) y EUDRAGIT RL (cesión rápida), se puede controlar la cesión del fármaco a nivel del tracto gastrointestinal.

Como hemos señalado anteriormente, este tipo de excipiente será utilizado debido a que carece de átomos asimétricos en su estructura, por lo que permite comparar con las matrices que serán desarrolladas con el excipiente quiral (HPMC), por lo que lo podríamos considerar como un control que se añade en el diseño de experimentos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Los enantiómeros tienen idénticas propiedades físicoquímicas en un ambiente aquiral, pero a menudo sus enantiómeros difieren en su actividad y disposición en el organismo, como consecuencia de la interacción con sistemas biológicos enantioselectivos. Por este motivo, la utilización de una mezcla de esteroisómeros en medicina necesitaría ser estudiada de la misma forma que cualquier otra combinación de compuestos, y por tanto, los fármacos quirales, ya sea la mezcla racémica o el isómero puro, requieren mayor información analítica que los aquirales. El uso de técnicas analíticas que no discriminan entre los enantiómeros puede llevarnos a cuestionar la relevancia de los datos farmacológicos y toxicológicos obtenidos para el fármaco en forma racémica.

Este creciente conocimiento de la importancia de la estereoquímica, ha conducido a un aumento de la demanda de métodos apropiados para determinar la composición enantiomérica y la pureza de los materiales, tanto de productos naturales, como de productos de síntesis asimétricas.

Las técnicas de cromatografía de gases (GC), electroforesis capilar (EC)^{125,126} y la cromatografía capilar de alta resolución (HPLC)¹²⁷ son las técnicas más utilizadas para las separaciones enantioselectivas.

En nuestro caso, para el análisis de los tres fármacos (KP, RBZ y TH) hemos elegido un método directo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con una columna quiral tipo AGP, que ya ha sido descrita anteriormente en el apartado correspondiente a los materiales y métodos utilizados.

Los métodos analíticos deben ofrecer una buena resolución de los enantiómeros, así como:

- Características *prácticas* sobre si el procedimiento analítico es fácil o difícilmente realizable.

¹²⁵ Owens, P.K., Fell, A.K., Coleman, M.W., Berridge, J.C. Separation of the voriconazole by capillary electrophoresis and liquid chromatography. *Enantiomer*, 4 (2), 79-90, (1999).

¹²⁶ Anderson, J.L., Ding, J., Mc.Culla, R.D., Jenks, W.S., Armstrong, D.W. Separation of sulfoxides and sulfinate esters on four derivatized cyclodextrins chiral stationary phases using capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 946, (1-2), 197-208, (2002).

¹²⁷ Karnes, H.T., Sarkar, M.A. Enantiomeric resolution of drug compounds by liquid chromatography. *Pharm. Res.* 4(4), m285-292, (1987).

- Características de *idoneidad*: demuestran, en el momento del análisis su aptitud para el uso.
- Características de *fiabilidad*: demuestran la capacidad del método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación. Proporcionan un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados. También permiten un conocimiento profundo de las características de funcionamiento del método. Asimismo produce una disminución en el número de fallos y por consiguiente de repeticiones a realizar. Generalmente se produce una optimización del método, por ejemplo, mejorando las características prácticas y las posibilidades de automatización.

Como se puede observar las características de fiabilidad serán las de mayor importancia a la hora de validar un método; comprenden los cinco criterios fundamentales de validación: LINEALIDAD, PRECISIÓN, EXACTITUD, SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD, que ya han sido descritos anteriormente en el apartado de materiales y métodos.

A continuación se muestran los resultados correspondientes a:

1. La validación de los métodos analíticos para el análisis de los enantiómeros de KP y RBZ.
2. La puesta a punto y validación del método analítico de los enantiómeros de TH.

1.1. KETOPROFENO: VALIDACIÓN DE SU MÉTODO ANALÍTICO.

1.1.1. Especificidad

Se estudia la especificidad para evaluar la posible interferencia analítica de otras sustancias sobre la cuantificación de los enantiómeros del KP, se inyectan alícuotas de una muestra placebo, y una muestra que contiene 10 $\mu\text{g/ml}$ de KP racémico (5 $\mu\text{g/ml}$ R(-)-KP y 5 $\mu\text{g/ml}$ S(+)-KP). Los resultados se muestran en las figuras 26 y 27.

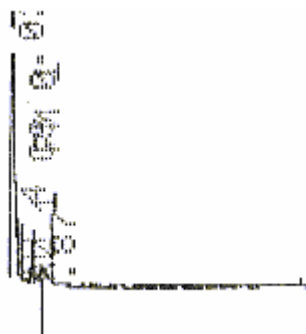


Figura 26. Cromatograma correspondiente a la muestra placebo.

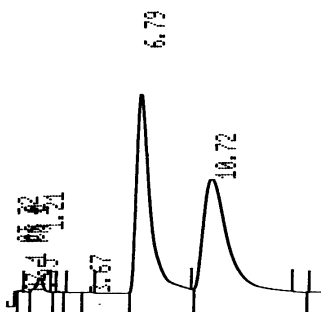


Figura 27. Cromatograma correspondiente a la muestra que contiene 10 $\mu\text{g/ml}$ de KP racémico (5 $\mu\text{g/ml}$ R(-)-KP y 5 $\mu\text{g/ml}$ S(+)-KP).

Como se puede observar en el cromatograma correspondiente a la muestra placebo, no se observa ningún pico que pueda interferir en el análisis de los enantiómeros del KP, por lo que de este modo queda demostrada la especificidad para los enantiómeros del KP.

1.1.2. Exactitud

Indica la capacidad del método analítico de dar resultados lo más próximos posible al valor real. Si la diferencia entre el valor hallado, y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada, y revela la existencia de errores determinados que deberán corregirse.

A un blanco se le añadieron distintas cantidades conocidas (concentración añadida) de KP racémico que posteriormente fueron analizadas, determinándose la cantidad por HPLC (concentración obtenida) para cada uno de los enantiómeros. Mediante reglas de tres relacionando la concentración añadida, y la obtenida en el análisis se calculó el porcentaje recuperado como se muestra en las tablas siguientes.

Tabla 33: Resultados obtenidos de porcentaje recuperado (%) de R(-)-KP.

<i>Concentración añadida ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>Áreas obtenidas</i>	<i>Concentración obtenida ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>% recuperado</i>
2.5	26745	2.33	93.20
2.5	27856	2.43	97.20
2.5	27960	2.44	97.60
5.0	58769	5.17	103.40
5.0	57980	5.10	102.00
5.0	58001	5.11	102.20
7.5	84567	7.46	99.46
7.5	85078	7.51	100.13
7.5	86032	7.59	101.20

Como se puede apreciar en la tabla 33 los porcentajes de recuperación están próximos al 100 %, por lo que el método es exacto para el enantiómero R(-)-KP.

Tabla 34: Resultados obtenidos de porcentaje recuperado (%) de S(+)-KP.

<i>Concentración añadida ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>Áreas obtenidas</i>	<i>Concentración obtenida ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>% recuperado</i>
2.5	27880	2.49	99.96
2.5	26899	2.41	96.41
2.5	26341	2.36	94.39
5.0	57973	5.21	104.37
5.0	56271	5.06	101.30
5.0	56990	5.13	102.60
7.5	86863	7.83	104.40
7.5	85859	7.73	103.19
7.5	85459	7.70	102.71

Como se puede apreciar en la tabla 34 los porcentajes de recuperación están próximos al 100 %, por lo que el método es exacto para el enantiómero S(+)-KP.

1.1.3. Reproducibilidad

Es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en distintas condiciones (diferentes días).

La solución madre se preparó pesando una cantidad exacta de materia prima, y siempre la misma. Se realizan tres diluciones iguales a 15 $\mu\text{g/ml}$ de KP racémico (7.5 $\mu\text{g/ml}$ R(-)-KP y 7.5 $\mu\text{g/ml}$ S(-)-KP), y analizamos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 35 para el enantiómero R(-)-KP y en la tabla 36 para el enantiómero S(+)-KP.

Tabla 35. Reproducibilidad de R(-)-KP

<i>Día</i>	<i>Concentración</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>Área 1</i>	<i>Área 2</i>	<i>Área 3</i>	<i>Media</i>	<i>C.V. (%)</i>
1	7.5	86907	86001	85812	86240	0.678
2	7.5	85340	86894	86263	86166	0.907
3	7.5	84630	84523	82453	83779	1.139

El coeficiente de variación entre días es del 1.639 %, y al ser menor del 5 %, lo consideramos aceptable para el análisis del enantiómero R(-)-KP.

Tabla 36. Reproducibilidad de S(+)-KP

<i>Día</i>	<i>Concentración</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>Área 1</i>	<i>Área 2</i>	<i>Área 3</i>	<i>Media</i>	<i>C.V.</i>
1	7.5	85784	85208	86305	85766	0.639
2	7.5	87004	84038	86710	85917	1.902
3	7.5	85039	86043	86192	85758	0.731

El coeficiente de variación entre días es del 0.104 %, y al ser menor del 5 %, lo consideramos aceptable para el análisis del enantiómero S(+)-KP.

1.1.4. Repetibilidad

Es la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos, y reactivos, y en el curso de la misma serie de análisis efectuados, generalmente en un corto intervalo de tiempo.

Se preparó una solución madre con una pesada exacta de materia prima. Analizamos una dilución de 15 µg/ml de KP racémico (7.5 µg/ml R(-)-KP y 7.5 µg/ml S(+)-KP), diez veces seguidas. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 37. Repetibilidad de R(-)-KP

85890	85443	85812	86907	86001
86234	85976	86432	85870	85464

Se calculó el valor medio, y el coeficiente de variación. El C.V. es del 0.51 %, es un valor aceptable, por tanto repetible para el enantiómero R(-)-KP.

Tabla 38. Repetibilidad de S(+)-KP

85784	85208	86305	85301	86341
84348	85740	84450	85765	86540

Se calculó el valor medio, y el coeficiente de variación. El C.V. es del 0.88 %, es un valor aceptable, por tanto repetible para el enantiómero S(+)-KP.

1.1.5. Linealidad

Se entiende como linealidad la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a las concentraciones de analito en la muestra dentro de un intervalo determinado.

Se determina la respuesta medida como el área a varias concentraciones diferentes. Se preparó una recta de calibrado pesando cantidades exactas de materia prima. A partir de la solución madre se hicieron diluciones de distintas concentraciones.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 39 para el enantiómero R(-)-KP y en la tabla 40 para el enantiómero S(+)-KP descritas a continuación:

Tabla 39: Enantiómero R(-)-KP

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Área 1	Área 2	Área 3
2.50	27527	27758	28001
5.00	56467	55235	56234
7.50	84694	83905	84325
10.00	111521	112789	111599
12.50	137636	136710	137659

Se calcularon los parámetros de la recta de regresión que relacionan las concentraciones, y las áreas obteniendo la recta:

$$\text{Área} = A + B \times C$$

Resultados obtenidos:

Tabla 40. Linealidad obtenida para R(-)-KP.

RECTA	A	B	r	r ²
1	987.40	11010.88	0.9997	0.9995
2	642.00	11018.32	0.9995	0.9990
3	1159.30	10987.24	0.9998	0.9997

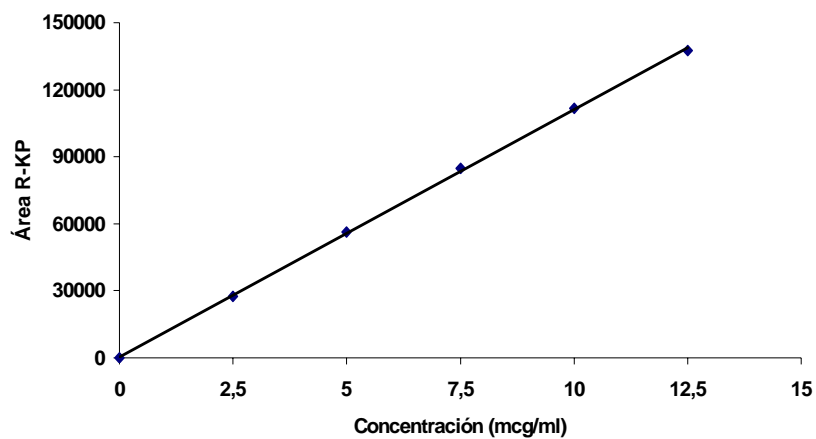


Figura 28. Recta de calibrado de R(-)-KP.

La linealidad se puede estudiar con los valores de los coeficientes de regresión (r) que en este caso son próximos a la unidad, con lo que concluimos que el método es lineal para el enantiómero R(-)-KP.

Tabla 41. Enantiómero S(+)-KP

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Área 1	Área 2	Área 3
2.50	27659	28508	26912
5.00	55029	56745	57001
7.50	84298	83964	85675
10.00	112346	111657	110989
12,50	136956	135990	137876

Se calculan los parámetros de la recta de regresión que relacionan las concentraciones, y las áreas obteniendo la recta:

$$\text{Área} = A + B \times C$$

Resultados obtenidos:

Tabla 42. Linealidad obtenida para S(+)-KP.

RECTA	A	B	r	r ²
1	484.30	11036.44	0.9996	0.9992
2	1052.00	11066.64	0.9999	0.9999
3	951.80	11029.44	0.9994	0.9988

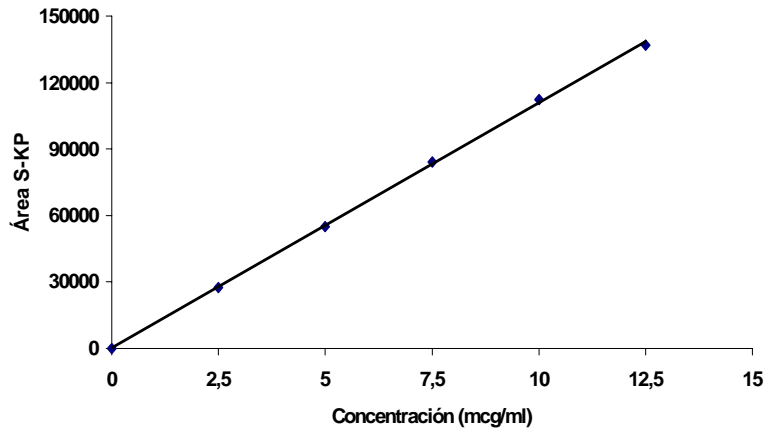


Figura 29. Recta de calibrado de S(+)-KP

La linealidad se puede estudiar con los valores de los coeficientes de regresión (r) que en este caso son próximos a la unidad, con lo que concluimos que el método es lineal para el enantiómero S(+)-KP.

1.2. RICOBENDAZOL: VALIDACIÓN DE SU MÉTODO ANALÍTICO.

1.2.1. Especificidad

Se estudió la especificidad para evaluar la posible interferencia analítica de otras sustancias sobre la cuantificación de los enantiómeros del RBZ, se inyectaron alícuotas de una muestra placebo, y una muestra que contiene 10 $\mu\text{g/ml}$ de RBZ racémico (5 $\mu\text{g/ml}$ (-)-RBZ y 5 $\mu\text{g/ml}$ (+)-RBZ). Los resultados se muestran en las figuras 30 y 31.

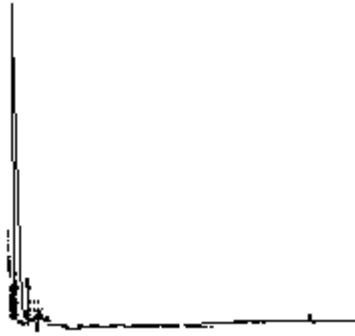


Figura 30. Cromatograma correspondiente a la muestra placebo

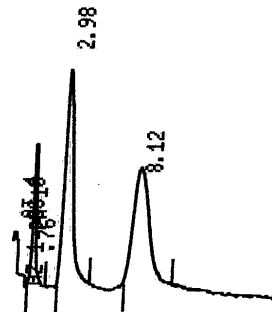


Figura 31 Cromatograma correspondiente a la muestra que contiene 10 $\mu\text{g/ml}$ de RBZ racémico (5 $\mu\text{g/ml}$ (-)-RBZ y 5 $\mu\text{g/ml}$ (+)-RBZ)

Como se puede observar en el cromatograma correspondiente a la muestra placebo, no se observa ningún pico que pueda interferir en el análisis de los enantiómeros del RBZ, por lo que de este modo queda demostrada la especificidad para los enantiómeros del RBZ.

1.2.2. Exactitud

Indica la capacidad del método analítico de dar resultados lo más próximos posible al valor real. Si la diferencia entre el valor hallado, y el valor verdadero es pequeña la exactitud es buena. Una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada, y revela la existencia de errores determinados que deberán corregirse.

A un blanco se le añadieron distintas cantidades conocidas (concentración añadida) de RBZ racémico que posteriormente se analizaron, y determinándose la cantidad por HPLC (concentración obtenida) para cada uno de los enantiómeros. Mediante reglas de tres relacionando la concentración añadida, y la obtenida en el análisis se calculó el porcentaje recuperado como se muestra en las tablas siguientes.

Tabla 43. Resultados obtenidos de porcentaje recuperado (%) de (-)-RBZ.

<i>Concentración añadida ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>Áreas obtenidas</i>	<i>Concentración obtenida ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>% recuperado</i>
2.5	42092	2.52	100.84
2.5	45623	2.72	109.16
2.5	43109	2.58	103.24
5.0	85607	5.08	101.65
5.0	83007	4.92	98.59
5.0	81208	4.82	96.47
7.5	129567	7.67	102.28
7.5	127400	7.54	100.57
7.5	126004	7.46	99.48

Como se puede apreciar en la tabla 43 los porcentajes de recuperación están próximos al 100 %, por lo que el método es exacto para el enantiómero (-)-RBZ.

Tabla 44. Resultados obtenidos de porcentaje recuperado (%) de (+)-RBZ.

<i>Concentración añadida ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>Áreas obtenidas</i>	<i>Concentración obtenida ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>% recuperado</i>
2.5	41956	2.56	102.77
2.5	42905	2.62	105.05
2.5	43033	2.63	105.35
5.0	84009	5.09	101.85
5.0	85618	5.19	103.78
5.0	84456	5.11	102.38
7.5	124402	7.51	100.21
7.5	123090	7.43	99.16
7.5	124198	7.50	100.05

Como se puede apreciar en la tabla 44 los porcentajes de recuperación están próximos al 100 %, por lo que el método es exacto para el enantiómero (+)-RBZ.

1.2.3. Reproducibilidad

Es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en distintas condiciones (diferentes días).

La solución madre se preparó pesando una cantidad exacta de materia prima, y siempre la misma. Se realizaron tres diluciones iguales a 10 $\mu\text{g/ml}$ de RBZ racémico (5 $\mu\text{g/ml}$ (-)-RBZ y 5 $\mu\text{g/ml}$ (+)-RBZ), y se analizó. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 40 para el enantiómero (-)-RBZ y en la tabla 41 para el enantiómero (+)-RBZ.

Tabla 45. Reproducibilidad de (-)-RBZ.

<i>Día</i>	<i>Concentración</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>Área 1</i>	<i>Área 2</i>	<i>Área 3</i>	<i>Media</i>	<i>C.V.</i>
1	7.5	127825	126834	128720	127793	0.738
2	7.5	125390	127342	129345	127359	1.552
3	7.5	128352	127342	129032	128242	0.663

El coeficiente de variación entre días es del 0.345 %, y al ser menor del 5 %, lo consideramos aceptable para el análisis del enantiómero (-)-RBZ.

Tabla 46. Reproducibilidad de (+)-RBZ.

<i>Día</i>	<i>Concentración</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>Área 1</i>	<i>Área 2</i>	<i>Área 3</i>	<i>Media</i>	<i>C.V.</i>
1	7.5	126365	129034	126560	127320	1.168
2	7.5	128369	126920	130980	128756	1.598
3	7.5	125901	127893	129356	127717	1.358

El coeficiente de variación entre días es del 0.579 %, y al ser menor del 5 %, lo consideramos aceptable para el análisis del enantiómero (+)-RBZ.

1.2.4. Repetibilidad

Es la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con, los mismos aparatos, y reactivos, y en el curso de la misma serie de análisis efectuados, generalmente en un corto intervalo de tiempo

Se preparó una solución madre con una pesada exacta de materia prima. Se analizó una dilución de 15 µg/ml de RBZ racémico (7.5 µg/ml (-)-RBZ y 7.5 µg/ml (+)-RBZ), diez veces seguidas. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 47. Repetibilidad de (-)-RBZ

126493	127643	125390	124495	128001
126783	126734	127142	125092	126744

Se calculó el valor medio, y el coeficiente de variación. El C.V. es del 0.889 %, es un valor aceptable, por tanto repetible para el enantiómero (-)-RBZ.

Tabla 48. Repetibilidad de (+)-RBZ

128345	127342	126365	129034	126560
127105	128502	128991	129504	127403

Se calculó el valor medio, y el coeficiente de variación. El C.V. es del 0.862 %, es un valor aceptable, por tanto repetible para el enantiómero (+)-RBZ.

1.2.5. Linealidad

Se entiende como linealidad la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a las concentraciones de analito en la muestra dentro de un intervalo determinado.

Se determina la respuesta medida como el área a varias concentraciones diferentes. Se preparó una recta de calibrado pesando cantidades exactas de materia prima. A partir de la solución madre se hicieron diluciones de distintas concentraciones.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 49 para el enantiómero (-)-RBZ y en la tabla 43 para el enantiómero (+)-RBZ descritas a continuación:

Tabla 49. Enantiómero (-)-RBZ

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Área 1	Área 2	Área 3
2.50	41975	43001	42397
5.00	83949	84325	83421
7.50	126524	125649	126870
10.00	169199	171740	168305
12.50	211675	215467	213620

Se calculan los parámetros de la recta de regresión que relacionan las concentraciones, y las áreas obteniendo la recta:

$$\text{Área} = A + B \times C$$

Resultados obtenidos

Tabla 50. Linealidad obtenida para (-)-RBZ.

RECTA	A	B	r	r ²
1	-347.90	16944.25	0.9999	0.9999
2	-1667.70	17293.88	0.9998	0.9995
3	-1276.4	17093.2	0.9998	0.9997

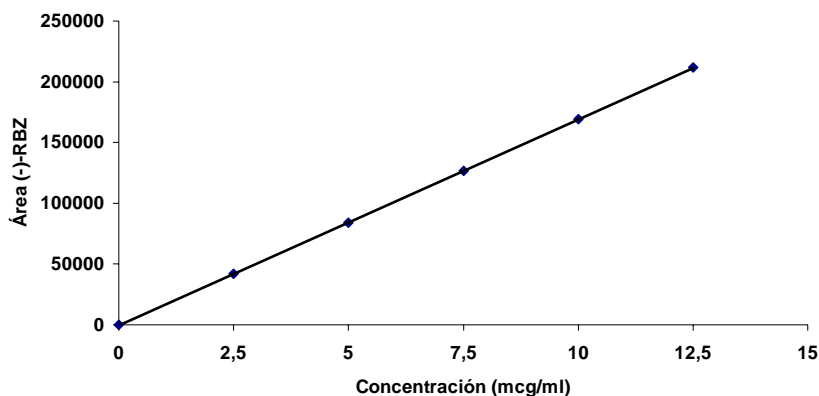


Figura 32. Recta de calibrado de (-)-RBZ

La linealidad se puede estudiar con los valores de los coeficientes de regresión (r) que en este caso son próximos a la unidad, con lo que concluimos que el método es lineal para el enantiómero (-)-RBZ.

Tabla 51. Enantiómero (+)-RBZ

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Área 1	Área 2	Área 3
2.50	40371	42946	41289
5.00	81729	82085	82939
7.50	127300	129637	130001
10.00	163406	165024	165501
12.50	207864	210975	211967

Se calculan los parámetros de la recta de regresión que relacionan las concentraciones, y las áreas obteniendo la recta:

$$\text{Área} = A + B \times C$$

Resultados obtenidos:

Tabla 52. Linealidad obtenida para (+)-RBZ.

RECTA	A	B	r	r ²
1	-864.90	16666.52	0.9995	0.9990
2	434.30	16759.88	0.9992	0.9984
3	-297.00	16754.07	0.9988	0.9976

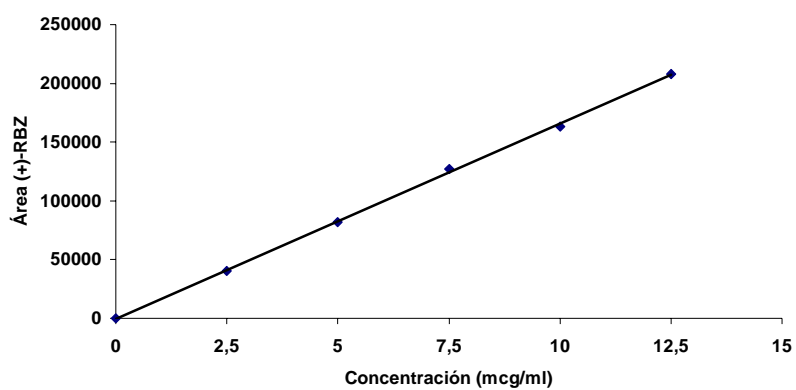


Figura 33. Recta de calibrado de (+)-RBZ.

La linealidad se puede estudiar con los valores de los coeficientes de regresión (r) que en este caso son próximos a la unidad, con lo que concluimos que el método es lineal para el enantiómero (+)-RBZ.

1.3. TALIDOMIDA: DESARROLLO DE SU MÉTODO ANALÍTICO.

Aunque existen en la bibliografía distintos métodos para el análisis de los enantiómeros de TH¹²⁸, ninguno de ellos describe el uso de columnas AGP. Debido a que como ya se ha comentado anteriormente el TH es una molécula muy inestable, la disminución en el tiempo de su análisis, disminuye a su vez los posibles errores en resultados por procesos de bioinversión o hidrólisis sufridos por la molécula.

Como se ha visto anteriormente, las columnas tipo AGP han sido utilizadas para el análisis del KP y RBZ, destacando la fiabilidad de los métodos y los bajos tiempos de retención obtenidos para los enantiómeros de ambos fármacos.

Por tanto, debido a la necesidad de poder analizar los enantiómeros de TH, se decidió desarrollar un método sencillo y original para su análisis con columna tipo AGP, cuyos resultados han sido publicados¹²⁹.

Primeramente debemos saber la longitud de onda de máxima absorción para la TH, por tanto se hace un barrido simple en el espectrofotómetro BECKMAN DU-7, que se muestra a continuación:

¹²⁸ Czjeka, M.J., Koch, H.P. Determination of thalidomide and its major metabolites by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* (23) 413, 181-187, (1987).

¹²⁹ Álvarez, C., Sánchez-Brunete, J.A., Torrado-Santiago, S., Cadórniga, R., Torrado, J.J. Enantioselective separation of thalidomide on an immobilized α_1 -Acid Glycoprotein chiral stationary phase. *Chromatographia* 52, 455-458, (2000).

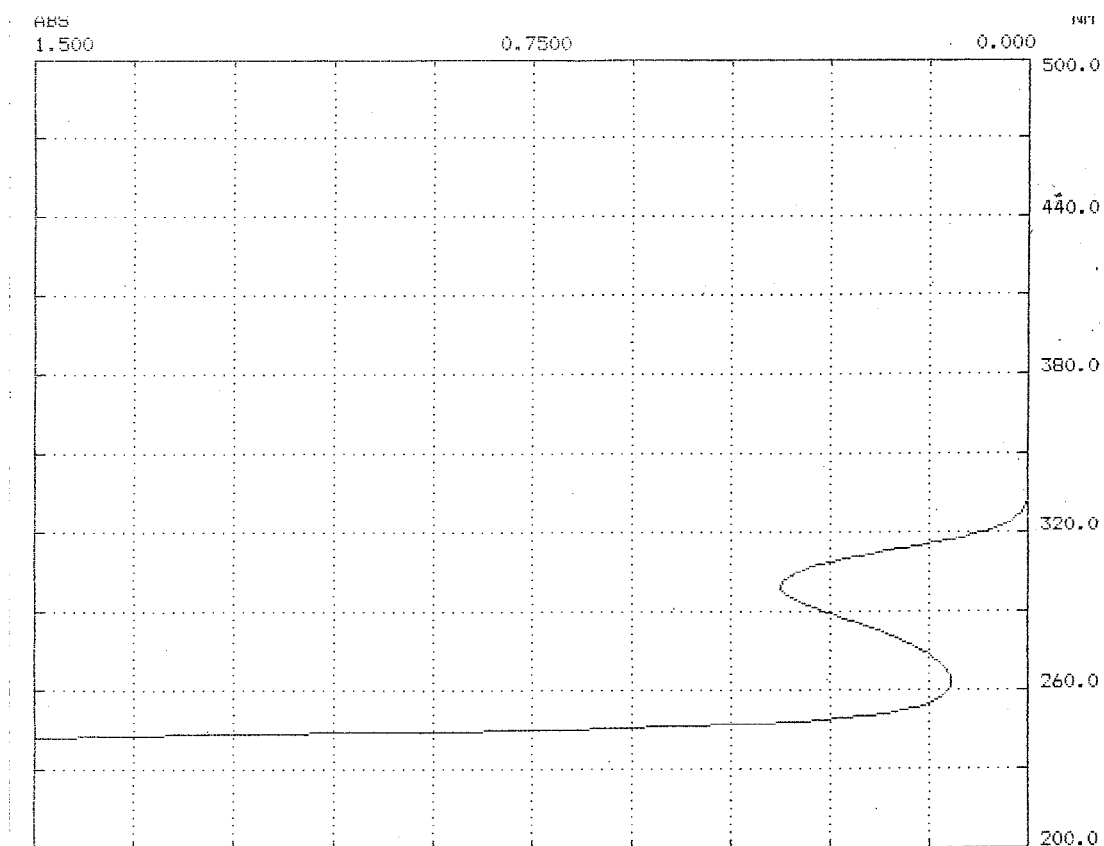


Figura 34. Barrido espectrofotométrico de una solución de 10 $\mu\text{g/ml}$ de TH

Una vez conocidas las características físico-químicas de la TH así como la longitud de onda de máxima absorción (230 nm) se procede a la búsqueda de la fase móvil óptima para el análisis de sus enantiómeros. Para ello se tuvieron en cuenta las recomendaciones de la casa comercial (ChromTech//Suecia) para el desarrollo de métodos analíticos de moléculas con características básicas. Se sugiere comenzar utilizando una fase móvil consistente en un tampón de acetato amónico 10 mM a pH 4.5. A partir de estas condiciones iniciales se comienzan a hacer modificaciones en la fase móvil. Se modifica el pH, la concentración del tampón acetato amónico y porcentaje de tetrahidrofurano (THF). Las distintas modificaciones se muestran a continuación.

- pH : 4.5, 5.5, 6.5 y 7.0. Se llega a los distintos pH añadiendo 0.1 M de HCl.
- Tampón de acetato amónico: 10, 20, 30, 40 y 50 mM.

- % THF: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 %.

En las distintas condiciones se calcularon los factores descritos en la USP 24¹³⁰, para observar la calidad de análisis, y poder llegar a la fase móvil óptima para el análisis de los enantiómeros de TH. Dichos factores se describen a continuación:

1. Resolución (R_S). Se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$R_S = 2(t_{R(S)} - t_{R(R)}) / (W_{(R)} + W_{(S)})$$

$t_{R(S)}$ = tiempo de retención de S(-)-TH.

$t_{R(R)}$ = tiempo de retención de R(+)-TH.

$W_{(R)}$ y $W_{(S)}$ son los anchos de la base de los picos R(+)-TH y S(-)-TH respectivamente, medidos extrapolando desde la mitad de su altura, en milímetros.

2. Factor de capacidad (k). Su fórmula se muestra a continuación:

$$K = (t_R/t_0) - 1$$

t_R = tiempo de retención del soluto.

t_0 = tiempo de retención del solvente.

3. Selectividad (α). Se calcula según la siguiente fórmula:

$$\alpha = k_{(S)}/k_{(R)}$$

$k_{(S)}$ y $k_{(R)}$ y son los factores de capacidad de S(-)-TH y R(+)-TH respectivamente, descritos anteriormente.

¹³⁰ United States Pharmacopeia 24. The United States Pharmacopoeial convention. Inc; Rockville. M.D. (2000).

4. Factor de simetría (T_f). Este factor nos da información acerca de la simetría del pico. Se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$T_f = W_{0,05} / 2f$$

$W_{0,05}$ = ancho de pico, medido al 5% de la altura.

f = distancia comprendida entre la perpendicular trazada entre el máximo del pico, y el borde de entrada y el veintavo de su altura.

Tras realizar los análisis pertinentes se observó que la fase móvil óptima para el análisis de los enantiómeros de TH consistía en un tampón de acetato amónico (30 mM) a pH 7,0, y modificado con un 0.3% de THF (figura 35).

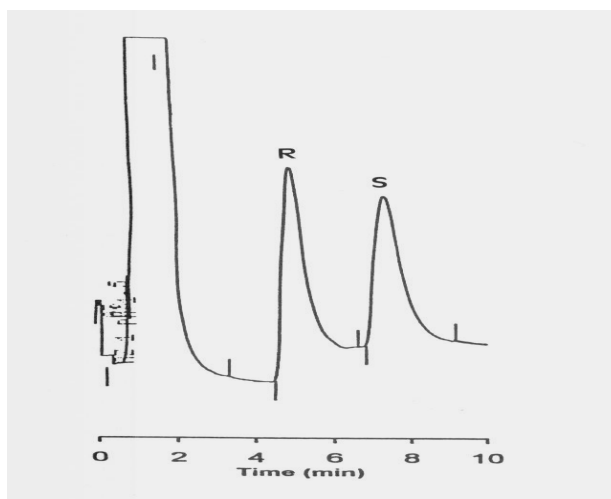


Figura 35. Separación de R(+)-TH y S(-)-TH bajo las condiciones óptimas para su análisis (Tampón acetato amónico 30 mM, pH 7.0 y 0.3% THF).

Las distintas modificaciones realizadas se muestran a continuación en la tabla 53 en la cual podemos observar el efecto de la concentración del tampón, el pH y el porcentaje de THF en los distintos parámetros descritos anteriormente: R_S , α , k , $T_f (R)$ y $T_f (S)$.

Tabla 53. Resolución (R_S), selectividad (α), factor de simetría ($T_{f(R)}$ y $T_{f(S)}$) y factor de capacidad ($k_{(R)}$ y $k_{(S)}$) para R(+)-TH y S(-)-TH a distintas concentraciones de tampón acetato amónico (fase móvil estándar: 0.3% THF, pH 7.0), distintos pH (fase móvil estándar: 0,3 THF, tampón acetato amónico 30 mM), y diferentes porcentajes de THF) (fase móvil estándar: tampón acetato amónico 30 mM, pH 7.0).

Efecto de la concentración de acetato amónico						
Concentración (mM)	R_S	α	$T_{f(R)}$	$T_{f(S)}$	$k_{(R)}$	$k_{(S)}$
50	2.41	1.63	1.33	1.50	6.33	10.35
40	2.56	1.61	1.40	1.80	5.91	9.51
30	2.59	1.60	1.60	1.50	6.10	9.76
20	2.34	1.60	1.40	1.67	5.59	8.82
Efecto del pH						
PH	R_S	α	$T_{f(R)}$	$T_{f(S)}$	$k_{(R)}$	$k_{(S)}$
7.0	2.59	1.60	1.60	1.50	6.10	9.76
6.5	2.06	1.53	1.14	1.25	5.19	7.90
5.5	----	1.33	----	----	5.83	7.80
4.5	----	1.17	----	----	4.50	5.32
Efecto de la concentración de tetrahidrofurano (THF)						
% THF	R_S	α	$T_{f(R)}$	$T_{f(S)}$	$k_{(R)}$	$k_{(S)}$
0.1	2.12	1.49	1.83	1.50	8.53	12.74
0.2	2.12	1.56	2.25	1.83	6.81	10.65
0.3	2.59	1.60	1.60	1.50	6.10	9.76
0.4	2.17	1.58	1.00	1.17	4.76	7.54
0.5	2.02	1.58	1.20	1.17	4.50	7.08

1.3.1. Efecto de la concentración del tampón acetato amónico y del pH.

Como ya se ha comentado anteriormente según la casa comercial de la columna AGP (ChromTech/Suecia) para la separación de enantiómeros de compuestos básicos recomienda comenzar probando una fase móvil que contiene tampón acetato amónico (10 mM) a pH 4.5. Utilizando dichas condiciones no se consiguió una separación apropiada para los enantiómeros de TH.

Se comprobó que aumentando la concentración del tampón, a partir de 20 mM se incrementaba a su vez la separación de los enantiómeros. La resolución (R_s) no se ve afectada por la concentración del tampón, en todos los casos el valor obtenido fue mayor de 2.34 para ambos enantiómeros. La selectividad (α) se ve ligeramente afectada cambiando de 1.60 a concentración de 20 mM a 1.63 para concentraciones de 50 mM. En la bibliografía encontramos un estudio similar realizado para la separación de los enantiómeros de flobufen¹³¹ en el cual se observa que la retención de los analitos se ve afectada por la concentración de la fase móvil. Sin embargo, en nuestros resultados observamos que la selectividad se ve más afectada por el pH de la fase móvil que por su concentración en acetato amónico. Así se refleja el incremento de la selectividad de 1.17 a 1.60 cuando se aumenta el pH.

Este efecto ha sido también observado por otros grupos de investigación¹³², los cuales estudian en profundidad el efecto de la variaciones de pH y de la adición de los agentes modificadores (disolventes orgánicos) de las fases móviles en la enantioselectividad de diferentes fármacos utilizando otro tipo de columna quiral, tipo HAS. Por otro lado otros autores¹³³ ponen de manifiesto la importancia que juega el pH en la separación de moléculas de origen básico. Dichos estudios no observan separación alguna a pH 3.02, en moléculas de origen básico, mientras que a pH 11.6 donde los enantiómeros se mostraban con un carácter neutro, se facilitó la separación enantioselectiva de los mismos.

La TH se ve afectada por el pH, la mejor separación se encuentra a pH 7.0, que a su vez coincide con el límite superior de pH recomendado para las columnas de tipo AGP.

Como se puede observar en la tabla 53, los factores de simetría (T_f) obtenidos para cada uno de los enantiómeros se ve también fuertemente influidos por cambios realizados en el pH de la fase móvil. Como se ha mencionado anteriormente, la TH es una molécula con características básicas, su

¹³¹ Sinibaldi, M., Vinci, M., Federici, F., Flieger, M. Enantioselectivity properties of serum albumin immobilized on anion-exchangers based on polyvinylimidazole coated silica. Effect of protein loaded on separation properties. *Biomed. Chromatogr.* 11, 307-310, (1997).

¹³² Taleb, N.B., Millot, M.C., Seville, B. Electrokinetic separation of enantiomers using a capillary coated with poly-tergutide. *J. Chromatogr. A.* 776, 45-53, (1997).

¹³³ Wang, F., Khaledi, M.G. Capillary electrophoresis chiral separations of basic compounds using cationic cyclodextrins. *Electrophoresis.* 19, 2095-2100, (1998).

ionización se ve condicionada por modificaciones de pH. La cantidad de TH no ionizada disminuye cuando el pH de la fase móvil se ve modificado entre 4.5 y 7.0. Por tanto se produce una mayor interacción entre los enantiómeros de la TH y la columna, obteniéndose por tanto diferentes resultados para R_s , α , k y T_f . Existen en la bibliografía algunos estudios¹³⁴ sobre el factor de asimetría (USP tailing factor) para solutos de carácter alcalino, que demuestran que la simetría está relacionada con el tipo de columna utilizada y la composición y pH de la fase móvil.

1.3.2. Efecto del Tetrahidrofurano

Para aumentar la resolución cromatográfica de los enantiómeros se suele adicionar un modificador de la fase móvil, por ejemplo el Tetrahidrofurano (THF)^{135,136,137,138}. En la tabla 53 se observa la disminución en el factor de capacidad (k) y en el factor de simetría (T_f) para ambos enantiómeros cuando se aumenta el porcentaje de THF adicionado a la fase móvil.

En nuestras condiciones experimentales la mejor resolución ($R_s = 2.59$) y selectividad ($\alpha = 1.60$) se obtuvieron utilizando un 0,3% de THF, porcentaje que fue utilizado en la fase móvil seleccionada como óptima para el análisis de los enantiómeros de TH.

¹³⁴ Law, B., Houghton, S.J., Ballard, P. An approach to the evaluation and comparison of reversed-phase high-performance liquid chromatography stationary phases. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17,443-453, (1998).

¹³⁵ Basci, N.E., Temizer, A., Bozkurt, A., Isirmer, A. Optimization of mobile phase in the separation of beta-blockers by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 18, 745-750, (1998).

¹³⁶ Levin, S., Sterin, M., Magora, A., Popescu, A. Resolution of enantiomers of uridine analogs, potential, antiviral agents. *J. Chromatogr. A.* 752, 131-146, (1996).

¹³⁷ Peterson, A.G., Foley, J.P. Influence of the organic counterion on the chiral micellar electrokinetic separation of basic drugs using the surfactant N-dodecoyl-L-valine. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 695, 131-145, (1997).

¹³⁸ Andrisano, V., Booth, T.D., Cavrini, V., Wainer, I.W. Enantioselective separation of chiral arylcarboxylic acids on an immobilized human serum albumin chiral stationary phase. *Chirality*, 9, 178-183, (1997).

FASE MÓVIL SELECCIONADA*Tampón Acetato amónico (30 mM), pH 7.0 y 0.3% THF*

A continuación se procede a la validación del método analítico, los resultados que se muestran serán los referentes a LINEARIDAD, PRECISIÓN, REPRODUCIBILIDAD Y RECUPERACIÓN. Por último se procedió a realizar un pequeño ensayo *in vivo* en conejos macho tipo New Zealand.

1.3.3. Validación del método analítico**1.3.3.1. Linearidad**

La linealidad fue determinada cromatografiando seis muestras patrón preparadas a partir de una solución madre que contenía 500 µg/ml de TH racémica. Los patrones se preparan entre 1 y 20 µg/ml .

Tabla 54. Linealidad de las muestras de R(+)-TH y S(-)-TH.

Concentración (µg/ml)	Área° (R(+)-TH)	Área° (S(-)-TH)
0.5	36762	40146
1.5	84082	82946
2.5	126890	127222
5.0	252198	256956
7.5	425850	426558
10.0	563097	569061

Área°= corresponde a la media de tres determinaciones, los C.V. siempre fueron menores de 5%.

El estudio de la regresión lineal (RL) del área de los picos correspondientes a los enantiómeros R(+)-TH y S(-)-TH respecto a la concentración conocida analizada, nos da las siguientes rectas de regresión:

$$R(+)-TH: y = -39908 + 706861 x$$

Ambas con un $r^2 = 0.996$

$$S(-)-TH: y = -37760 + 773986 x$$

SE CONFIRMA LA LINEARIDAD DEL MÉTODO

1.3.3.2. Precisión

La precisión fue calculada inyectando las muestras diez veces (10 µg/ml de TH racémico) y calculando el coeficiente de variación (C.V.) del área de los picos correspondientes a R(+)-TH y S(-)-TH. Los resultados obtenidos de las diez determinaciones se muestran en la tabla 55:

Tabla 55. Resultados de precisión de R(+)-TH y S(-)-TH.

<i>R(+)-TH</i>	<i>S(-)-TH</i>
251924	261078
253471	252833
255344	263815
263367	267212
277755	249667
257681	264181
258100	250854
275662	250482
261342	253943
265956	259768

Los C.V. para S(-)-TH y R(+)-TH fueron 3.83 y 2.67% respectivamente. Como se puede observar ambos coeficientes fueron menores de 5% y por tanto son considerados como adecuados para los estudios de selectividad.

1.3.3.3. Reproducibilidad

La reproducibilidad del método fue determinada en tres días consecutivos. Las muestras fueron analizadas y los C.V. entre días para R(+)-TH y S(-)-TH fueron 1.47 y 2.31% respectivamente.

1.3.3.4. Recuperación

Las recuperaciones tanto de R(+)-TH como de S(-)-TH fueron determinadas en tres distintas concentraciones (2.5, 5.0, 7.5 µg/ml). Los resultados se muestran en la tabla 56, a continuación:

Tabla 56. Cantidad recuperada de R(+)-TH y S(-)-TH.

<i>R(+)-TH</i>		<i>S(-)-TH</i>	
<i>Cantidad añadida</i> <i>(µg/ml)</i>	<i>Cantidad recuperada</i> <i>(µg/ml ± DS, n=3)</i>	<i>Cantidad añadida</i> <i>(µg/ml)</i>	<i>Cantidad recuperada</i> <i>(µg/ml ± DS, n=3)</i>
2.5	2.62 ± 0.071	2.5	2.66 ± 0.148
5.0	4.90 ± 0.100	5.0	4.86 ± 0.063
7.5	7.25 ± 0.025	7.5	7.41 ± 0.046

Como se puede observar en los resultados las recuperaciones son próximas a las cantidades adicionada, y en todos los casos las diferencias son menores al 5%.

1.3.3.5. Ensayo “*in vivo*”

Un ensayo farmacocinético simple fue realizado para confirmar la capacidad del método para el análisis de muestras biológicas conteniendo R(+) y S(-)-TH. Para ello se utilizaron conejos macho tipo New Zealand. Se les inyectó vía intravenosa una solución conteniendo 18.9 mg de TH racémica en dimetilsulfóxido (DMSO). Las muestras se recogieron en tubos heparinizados a distintos tiempos

(5, 15, 60, 90 y 120 minutos) tras la administración. El plasma fue obtenido por centrifugación, al cual se le añadió una solución de ácido tricloroacético al 10% en proporción 1:1 y la mezcla fue agitada en vortex durante 1 minuto, y centrifugada durante 20 minutos a 5000 r.p.m. Finalmente el sobrenadante fue filtrado a través de filtros Millipore Millex HV-1 de 0,45 μm , y analizadas directamente o bien conservadas en el frigorífico hasta su análisis.

La figura 36 muestra las distintas concentraciones de R(+)-TH y S(-)-TH a los diferentes tiempos después de la administración intravenosa de TH racémica. Bajo nuestras condiciones experimentales no se observan diferencias en cuanto a la concentración de R(+)-TH y S(-)-TH a los distintos tiempos. Estos resultados coinciden con aquellos encontrados en la bibliografía¹³⁹.

Por tanto podemos concluir la validación de este nuevo método analítico diciendo que se trata de un método sencillo y rápido para analizar los enantiómeros de TH de manera fiable por medio de HPLC en muestras cuyas concentraciones queden comprendidas entre 1 y 20 $\mu\text{g/ml}$.

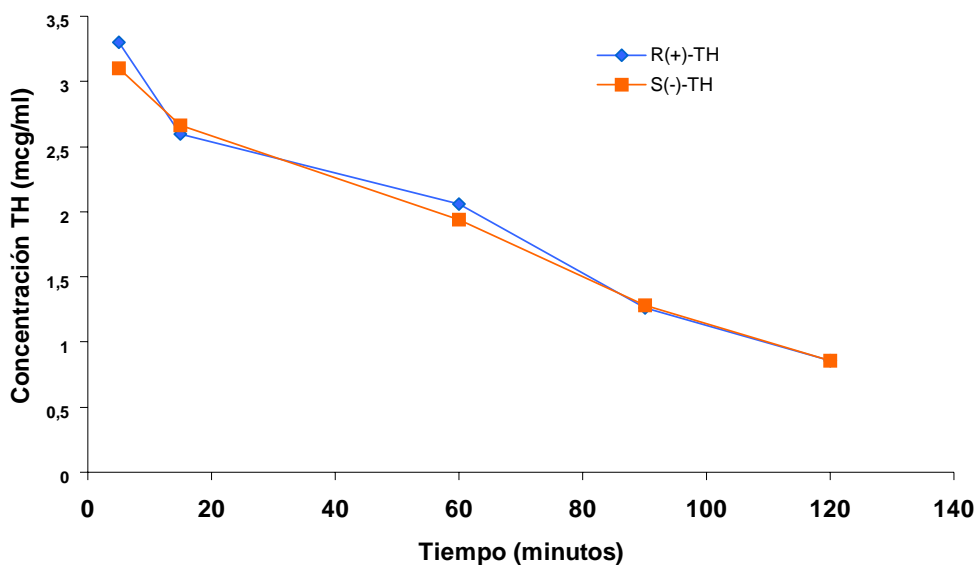


Figura 36. Concentración de R(+)-TH y S(-)-TH versus tiempo tras su administración intravenosa

¹³⁹ Eriksson, T., Bjorkman, S., Fyge, A. Determination of thalidomide in plasma and blood by high- performance liquid chromatography avoiding hydrolytic degradation. J. Chromatogr. 582, 211, (1992)

2. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA INTERNA DE LAS DISTINTAS FORMAS DE KETOPROFENO

2.1. PUNTO DE FUSIÓN.

Se determinó el punto de fusión del rac-KP, R(-)-KP, S(+)-KP y de la mezcla física (1:1) siguiendo los métodos descritos en el apartado *Material y Métodos* (Sistema capilar (B-450) y Análisis térmico diferencial).

En la tabla 57 se recogen los valores de punto de fusión obtenidos por el sistema de determinación tipo capilar (B-450), para las muestras ensayadas.

Tabla 57. Puntos de fusión de las distintas formas de KP determinados por el sistema capilar (B-450)

Muestra	Punto de fusión (°C)
Rac-KP	94.1
R(-)-KP	75.8
S(+)-KP	76.5

A continuación se muestra en la figura 37, los resultados obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (D.S.C.).

Como se puede observar por ambos métodos, los enantiómeros R(-)-KP y S(+)-KP, poseen menores puntos de fusión que su forma racémica. Los resultados se pueden observar en la tabla 57, mostrada anteriormente, y por medio del diagrama DSC, en el cual se observa que tanto para los enantiómeros como para la forma racémica apareció un único pico endotérmico. Por otro lado, para la mezcla física preparada y analizada sólo por DSC, se puede observar un comportamiento térmico que difiere de la forma racémica y de los enantiómeros, no observándose pico endotérmico único y definido, sino un desdoblamiento, posiblemente debido a transiciones vítreas metaestables. El desdoblamiento que se produce es a temperaturas inferiores a 70°C. Por tanto más cercano al punto de

fusión de los enantiómeros que de la forma racémica, aunque sea en origen las proporciones de ésta última (rac-KP) las buscadas para su análisis comparativo.

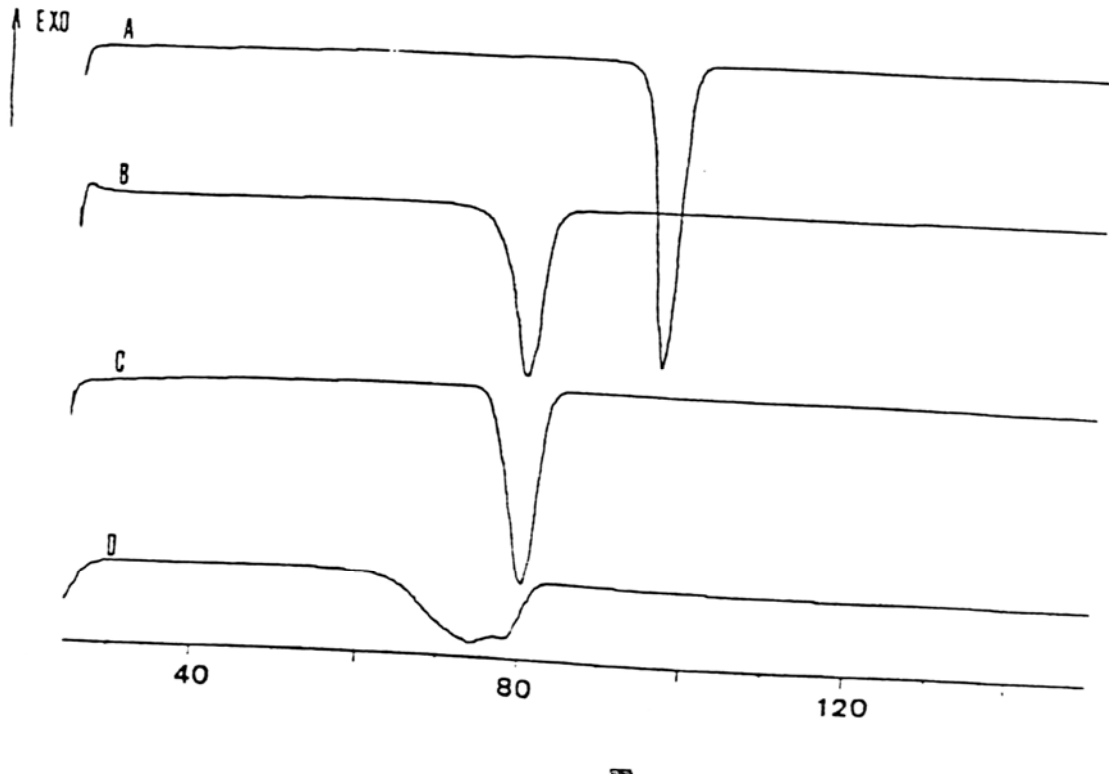


Figura 37. Curvas DSC obtenidas para rac-KP (A), S(-)-KP (B), R(+)-KP (C) y MF (1:1) (D).

Semejantes resultados fueron descritos por el-Arini et al.¹⁴⁰ para la forma racémica y los enantiómeros de praziquantel.

2.2. CRISTALINIDAD

Las muestras analizadas para observar la cristalinidad de los productos serán las mismas que en el apartado anterior (rac-KP, R(-)-KP, S(+)-KP).

En la figura 38 se muestra el difractograma obtenido para las distintas muestras analizadas con el sistema Philips X'Pert-MPD (CAI, Difracción Rayos X, UCM).

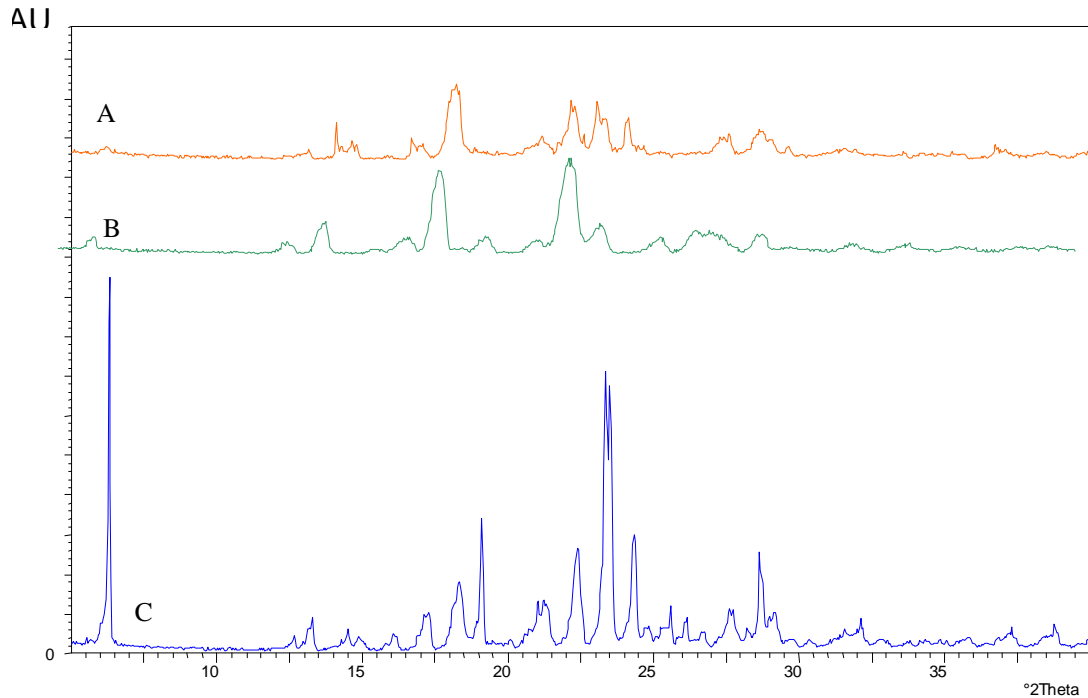


Figura 38. Difractograma de las diferentes muestras de KP: R(-)-KP (A), Rac-KP (B), S(+)-KP (C).

Como se puede observar el perfil cristalino obtenido para el enantiómero R(-)-KP (A) es diferente a aquel obtenido para S(+)-KP (C), y ambos a su vez diferentes al perfil obtenido para la muestra de rac-KP (B). Esta diferencia observada en los enantiómeros puede ser debida al tamaño de los cristales, debido a la forma de obtención de ellos (purificación) a partir de la forma racémica. Este hecho puede llevar a originar relativas diferencias cristalinas que por lo tanto explicarían, a su vez, las diferencias observadas en la figura 37.

¹⁴⁰ el-Arini, S.K., Giron, D., Leuenberger, H. Solubility properties of racemic praziquantel and its enantiomers. Pharm. Dev. Technol. 3(4), 557-564, (1998).

Kommuru et al.¹⁴¹ obtuvieron resultados similares para la forma racémica y los enantiómeros de KP. Dichos experimentos fueron realizados para observar la difusión de los mismos a través de la piel utilizando aditivos como por ejemplo el mentol y el linolol.

Este hecho puede relacionarse además con los resultados obtenidos al observar el punto de fusión de las muestras, donde se observaron resultados muy similares entre los enantiómeros (R(-) y S(+)-KP), con respecto a la mezcla racémica (rac-KP).

Resultados similares han sido hallados en la bibliografía para diferentes fármacos quirales y resumidos por Li y Grant¹⁴². Para la mayoría de las moléculas estudiadas, los cristales racémicos poseen mayor densidad y por tanto cristalinidad que sus correspondientes enantiómeros puros.

También se realizó un estudio morfológico de los cristales de R(-)-KP (figura 39), S(+)-KP (figura 40) y rac-KP (figura 41) a través de microscopía diferencial de barrido. Las fotografías realizadas se muestran a continuación.

¹⁴¹ Kommuru, TR, Khan, MA, Reddy, IK. Racemate and enantiomers of ketoprofen: phase diagram, thermodynamic studies, skin permeability, and use of chiral permeation enhancers. *J. Pharm. Sci.*, 87(7):833-40, (1998).

¹⁴² Li, Z.J., Grant, D.J.W. relationship between physical properties and crystal structure of chiral drugs. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86 (10), 1073-1078, (1997).

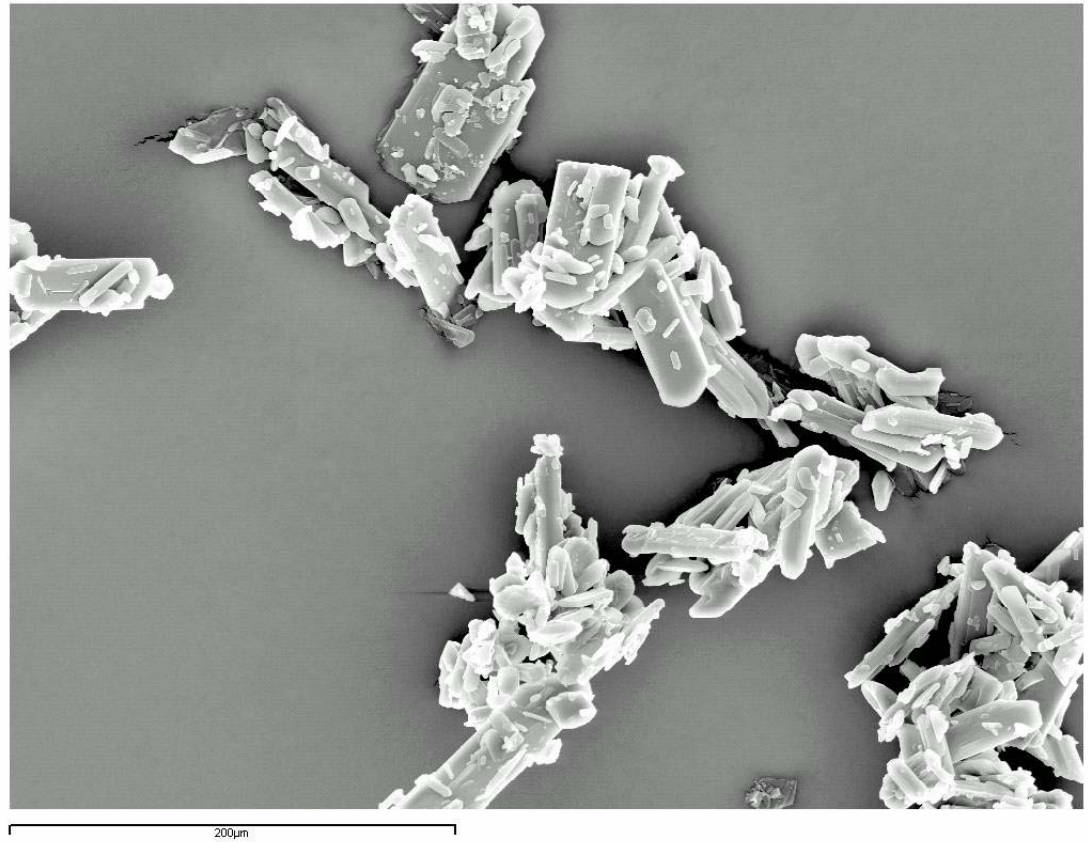


Figura 39. Cristales de R(-)-KP puro.

Como se puede observar en la foto correspondiente a los cristales del enantiómero R(-)-KP puro, se trata de cristales con una estructura prismática bien definida y con la superficie lisa. Respecto al tamaño de los mismos podemos decir que encontramos un amplio espectro de tamaños y siempre menores de 100 μm .

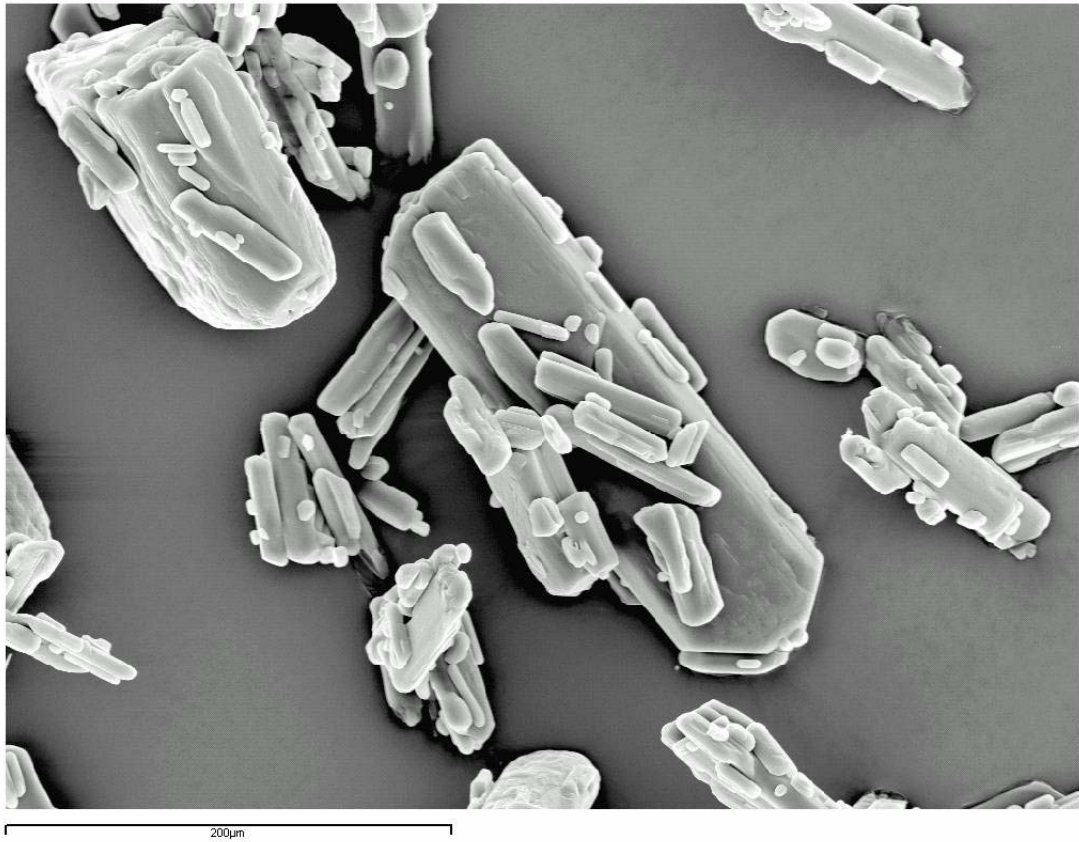


Figura 40. Cristales de S(+)-KP puro.

La morfología de los cristales de S(+)-KP puro (figura 40) se trata también de prismas con la superficie lisa de diversos tamaños, siendo algunos de ellos mucho más grandes ($> 200 \mu\text{m}$) que los encontrados en el caso de los cristales de R(-)-KP.

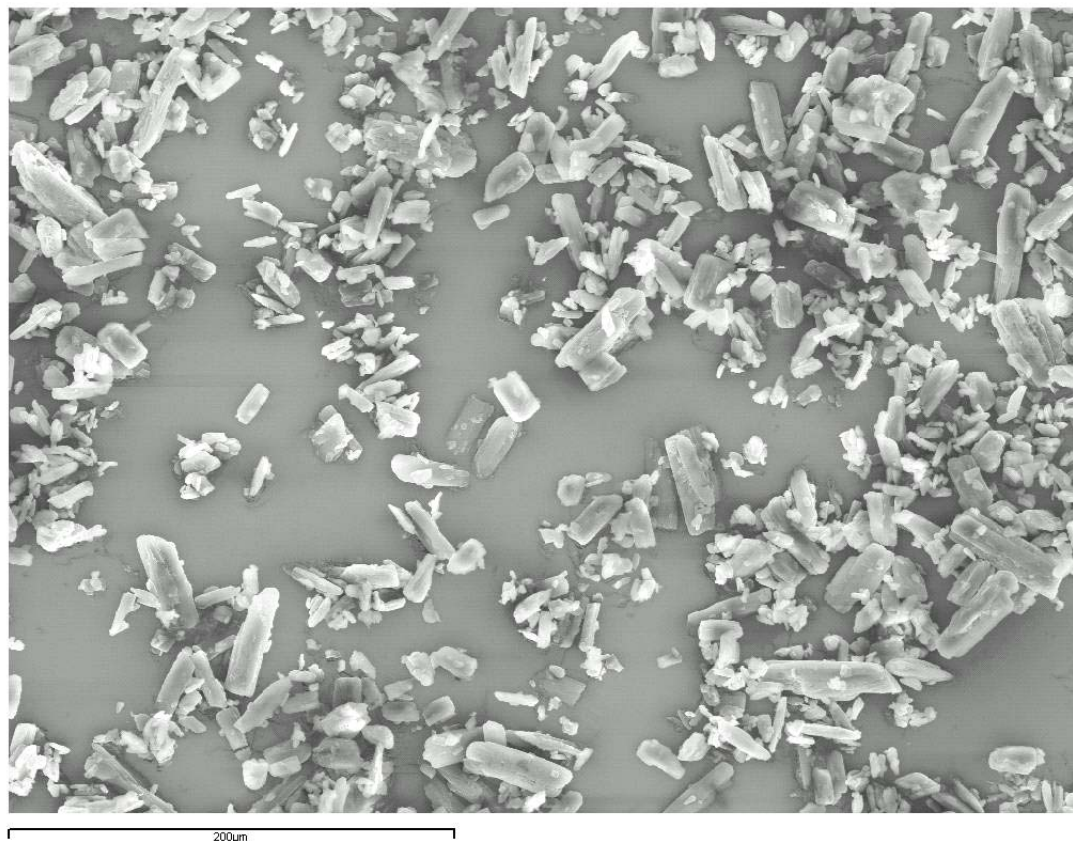


Figura 41. Cristales de rac-KP.

La morfología de los cristales de la muestra de rac-KP es también fundamentalmente prismática y lisa. En este caso los cristales son mucho más pequeños que los encontrados para los enantiómeros puros, R(-) y S(+)-KP. Esta diferencia de tamaño es debida a los distintos procesos de purificación que serán utilizados para obtener los enantiómeros puros, R(-) y S(+)-KP, a partir de la muestra racémica.

Estas diferencias observadas tanto en el punto de fusión como en la cristalinidad, serán posteriormente relacionadas con la solubilidad.

Romero et al.¹⁴³ encontraron diferencias entre el enantiómero S(+)-ibuprofeno y la forma racémica del ibuprofeno en cuanto al punto de fusión y cristalinidad, que originó a su vez diferencias en la solubilidad en distintos solventes, siendo, de ambos, el S(+)-ibuprofeno el que menor punto de fusión posee y por tanto menor carácter cristalino, proporcionando mayores valores de solubilidad que la forma racémica.

2.2.1. Recristalización.

Para este ensayo se procedió a realizar las mezclas correspondientes a diferentes proporciones de ambos enantiómeros (tabla 11 del apartado *Materiales y Métodos*) con el objetivo de observar las posibles transiciones vítreas originadas entre la forma rac-KP y los enantiómeros puros R(-)-KP y S(+)-KP. Además se pretendió también demostrar que el rac-KP se trata realmente de un compuesto racémico y no de un compuesto de tipo conglomerado. Para ello se realizó un estudio calorimétrico por medio de la técnica DSC de todos los productos obtenidos por la técnica de recristalización de diferentes proporciones de R(-) y S(+)-KP. Se ha publicado recientemente un estudio¹⁴⁴ que caracteriza por recristalización los enantiómeros y la forma racémica del propanolol en diferentes solventes consistentes en distintas mezclas de acetona y metanol.

Las curvas DSC correspondientes a los enantiómeros por separado en proporción 100%, de cada enantiómero puro, darán un perfil similar al obtenido en el apartado 4.1.1. observándose la aparición de un solo pico endotérmico de fusión del producto. Los puntos de fusión obtenidos para R(-)-KP y S(+)-KP fueron prácticamente los mismos que aquellos obtenidos tras su estudio calorimétrico directo (4.1.1.).

Los resultados obtenidos para el producto recristalizado que contiene en proporción 50S/50R de los enantiómeros de KP, muestra también la aparición de un único pico endotérmico

¹⁴³ Romero, A.J., Rhodes, C.T. Stereochemical aspects of the molecular pharmaceuticals of ibuprofen. *J. Pharm. Pharmacol.*, 45(4), 258-62, (1993).

correspondiente al punto de fusión del compuesto formado. Como se puede observar el punto de fusión obtenido coincide con el observado anteriormente para el rac-KP. Por lo tanto podemos hablar de una posible cinética de transición vítrea de la mezcla pura al 50% de los enantiómeros por medio de la cual éstos reacomodan su estado a la forma más estable: en decir, la forma racémica, y adquirieren tras el proceso de recristalización todas las propiedades que ésta posee (por ejemplo el punto de fusión observado).

También se estudiaron otras proporciones intermedias entre el 100% puro de cada enantiómero y el rac-KP. Se pretende observar la cinética de transición de un estado estable (enantiómero puro) a otro estado estable (racémico puro en proporción 50/50) pasando por las diferentes etapas metaestables. Los resultados de este estudio se muestran en los diagramas calorimétricos para cada proporción (figuras 42-50) y finalmente se construyó, un diagrama de fases (figura 51).

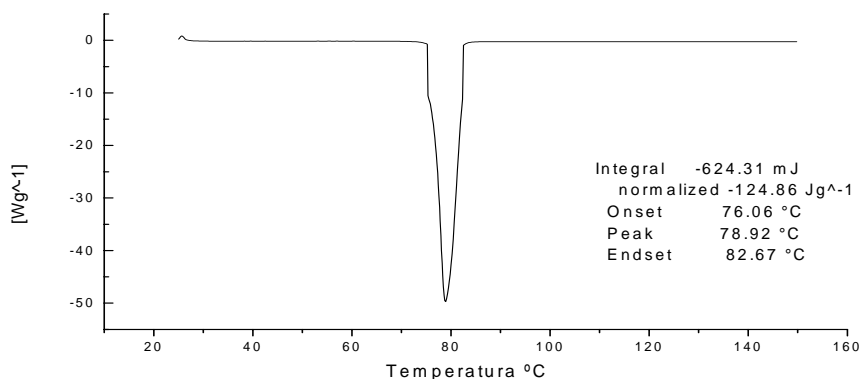


Figura 42. Espectro calorimétrico de la muestra recristalizada de 100% R(-)-KP

¹⁴⁴ Wang, X, Wang, X.J., Ching, C.B. Solubility, metastable zone width, and racemic characterization of propanolol hydrochloride. *Chirality*, 14(4), 318-324, (2002).

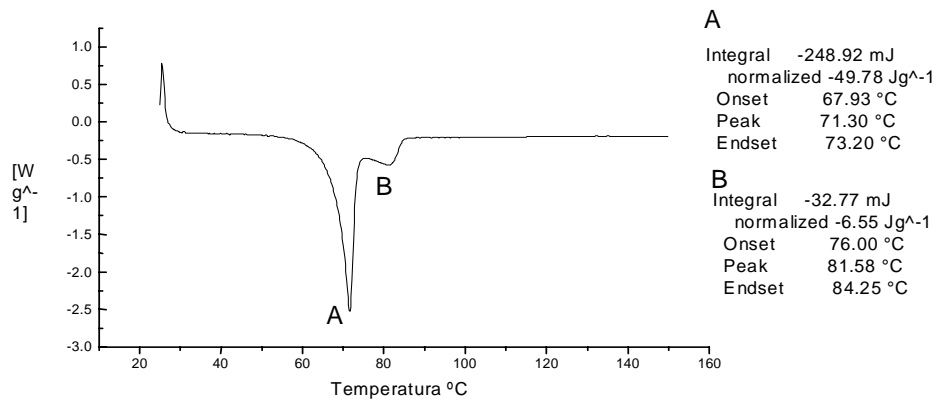


Figura 43. Espectro calorimétrico correspondiente a una muestra cristalizada que contiene 85% de R(-)-KP y 15% de S(+)-KP.

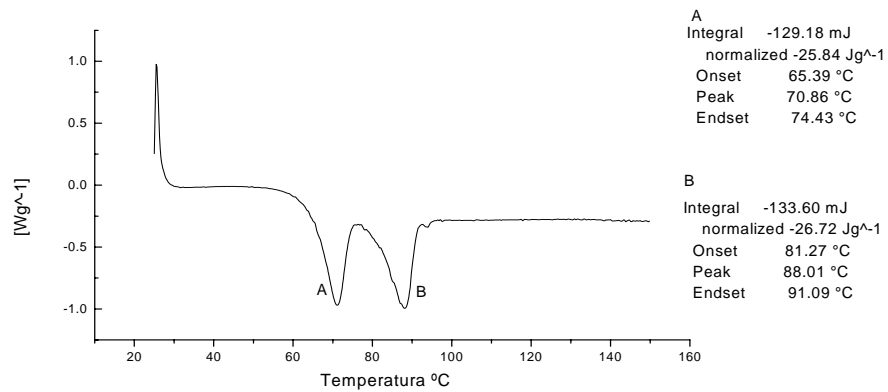


Figura 44. Espectro calorimétrico correspondiente a una muestra recristalizada que contiene 75% de R(-)-KP y 25% de S(+)-KP.

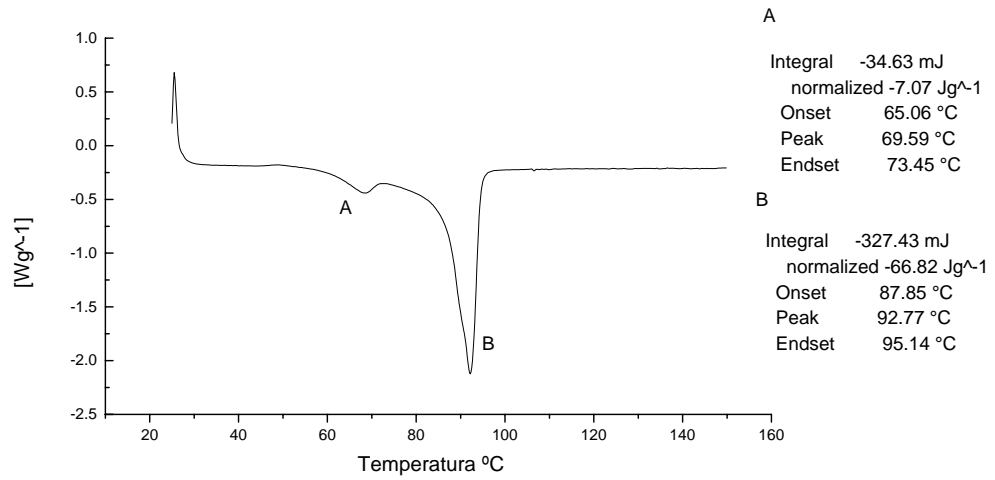


Figura 45. Espectro calorimétrico correspondiente a una muestra recristalizada que contiene 65% de R(-)-KP y 35% de S(+)-KP.

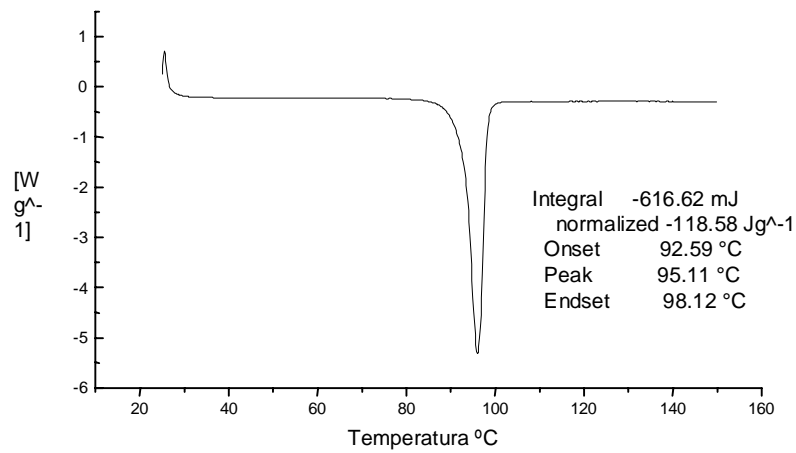


Figura 46. Espectro calorimétrico correspondiente a una muestra recristalizada que contiene 50% de R(-)-KP y 50% de S(+)-KP.

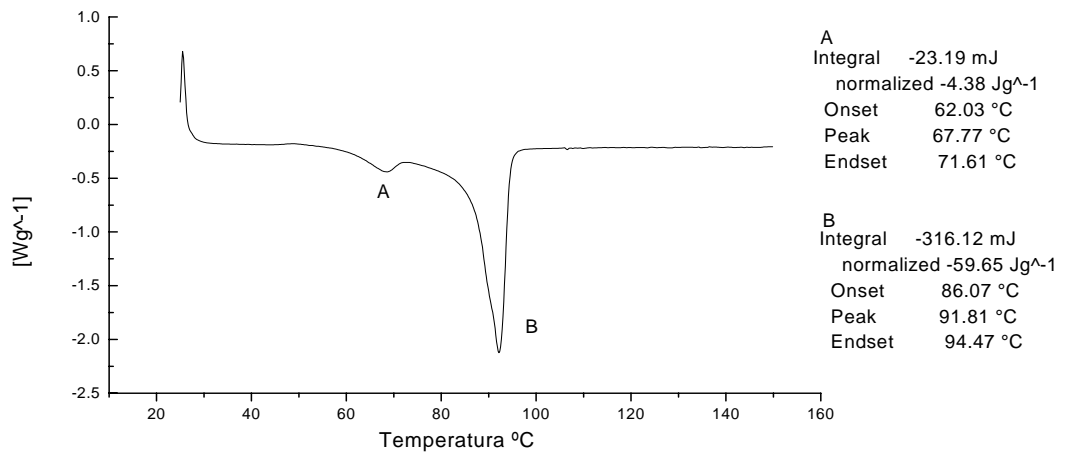


Figura 47. Espectro calorimétrico correspondiente a una muestra recristalizada que contiene 35% de R(-)-KP y 65% de S(+)-KP.

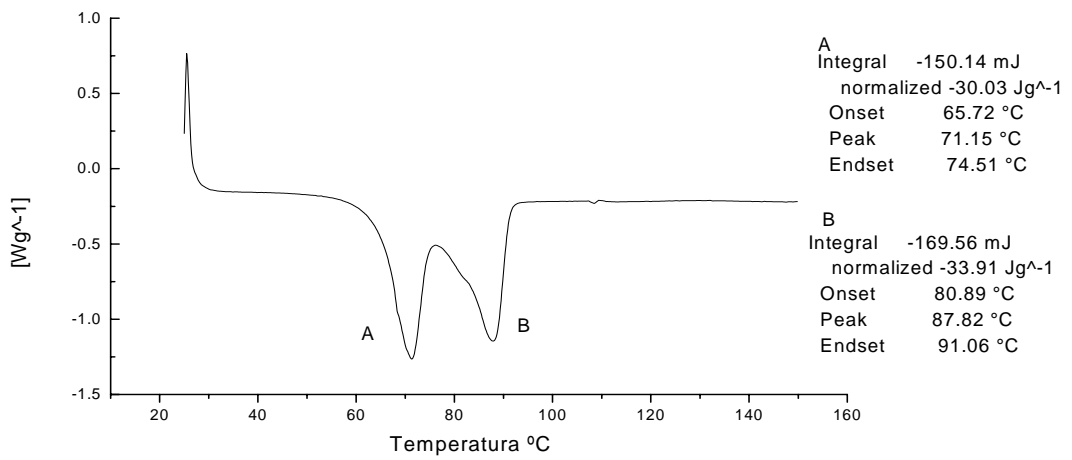


Figura 48. Espectro calorimétrico correspondiente a una muestra recristalizada que contiene 25% de R(-)-KP y 75% de S(+)-KP.

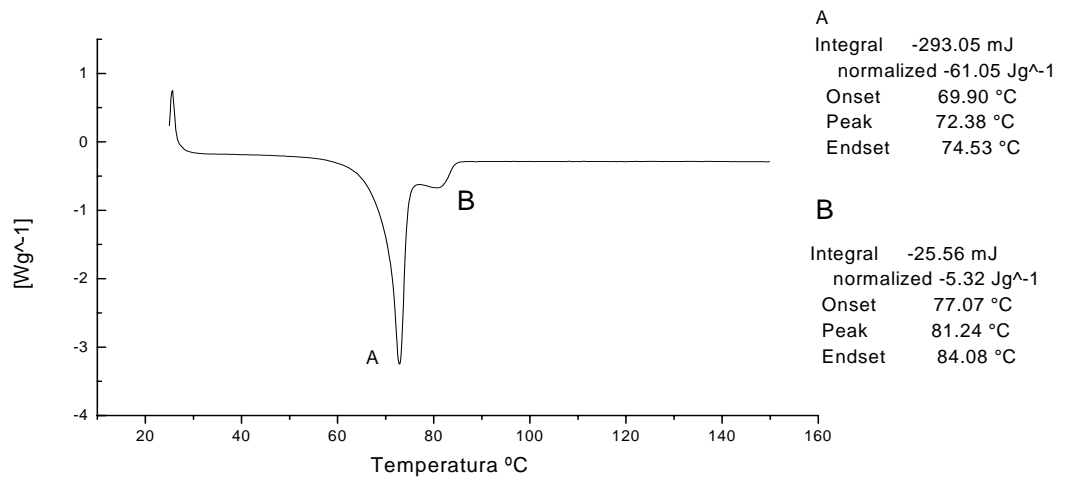


Figura 49. Espectro calorimétrico correspondiente a una muestra recristalizada que contiene 25% de R(-)-KP y 75% de S(+)-KP.

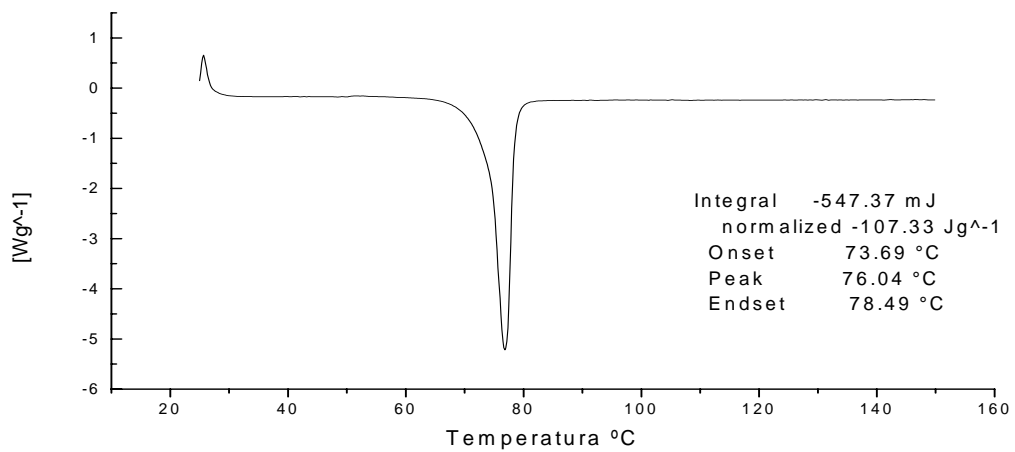


Figura 50. Espectro calorimétrico de la muestra recristalizada de 100% S(+)-KP

Con los resultados obtenidos anteriormente construiremos el siguiente diagrama de equilibrio para las distintas fases del proceso:

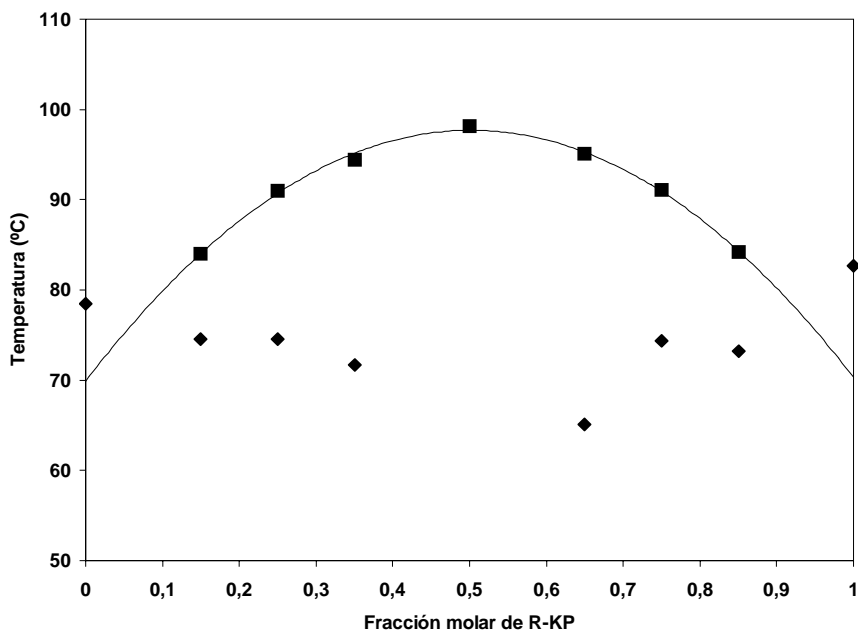


Figura 51. Diagrama de equilibrio de fases de los enantiómeros de KP (v-Puntos de fusión completo; v-Temperatura eutéctica)

Observando dicho diagrama, podemos decir que las transiciones (temperaturas eutécticas) observadas para cada uno de los puntos intermedios recrystalizados dan lugar a la evidencia de que efectivamente el rac-KP se trata de un verdadero racemato. Estos resultados coinciden con aquellos obtenidos por Duddu et al.¹⁴⁵ para otro fármaco que posee también enantiómeros, la pseudoefedrina.

También podemos estudiar este fenómeno desde un punto de vista cristalográfico, para ello sometimos a todas y cada una de las muestras al estudio de difracción de rayos X. Los resultados se muestran a continuación en la figura 52:

¹⁴⁵ Duddu, S.P., Khin-Khin, A., Grant, D.J.W., Suryarayanan, R. A novel X-ray powder diffractometric method studying the reaction between pseudophedrine enantiomers. J. Pharm. Sci. 86(3), 340-345, (1997).

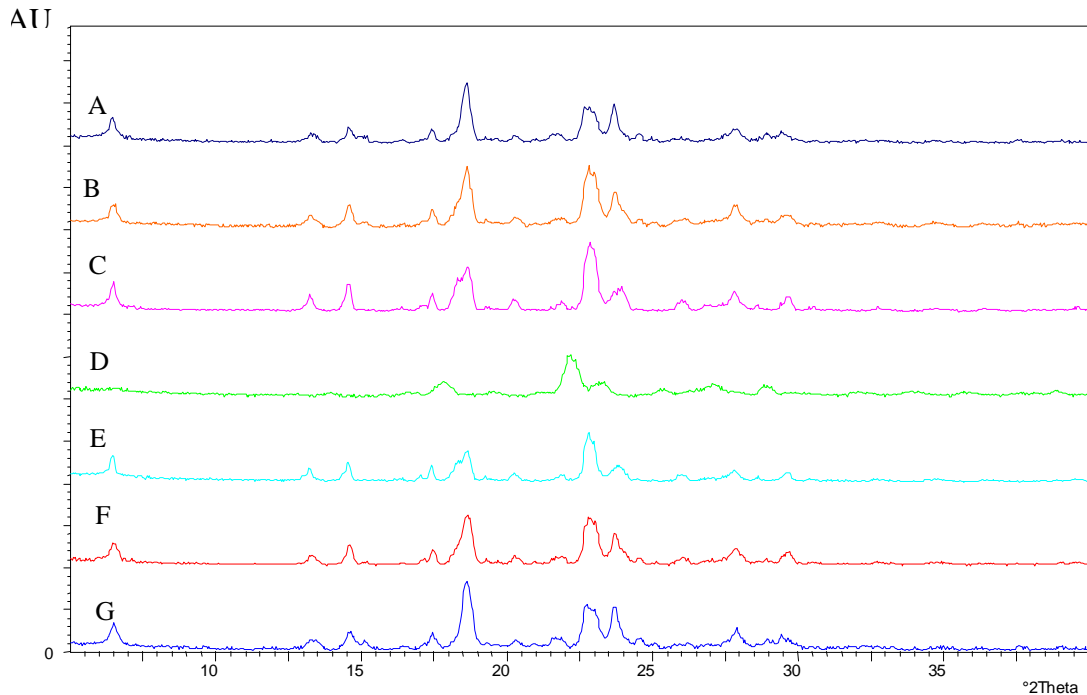


Figura 52. Difractograma correspondiente a las distintas mezclas recrystalizadas de los enantiómeros de KP: (A) 15% S(+)-KP/85% R(-)-KP, (B) 25% S(+)-KP/75% R(-)-KP, (C) 35% S(+)-KP/65% R(-)-KP, (D) 50% S(+)-KP/50% R(-)-KP, (E) 65% S(+)-KP/35% R(-)-KP, (F) 75% S(+)-KP/25% R(-)-KP y (G) 85% S(+)-KP/15% R(-)-KP.

Como se puede observar en la figura 52, las mezclas recrystalizadas de los enantiómeros de KP, a distintas proporciones presentaron diferentes perfiles cristalinos respecto a la muestra recrystalizada en proporción 50% S(+)-KP/50% R(-)-KP. Por otro lado también tenemos que observar la semejanza que existe entre las muestra recrystalizadas que presentan las mismas proporciones de los enantiómeros, es decir, se observó una semejanza entre la muestra A y la G, entre la muestra B y la F y entre la C y la E.

Además, en la figura 53 se muestra el perfil comparativo para la muestra de rac-KP y para aquella muestra recrystalizada de R(-)-KP y S(+)-KP en proporción 50%-50%.

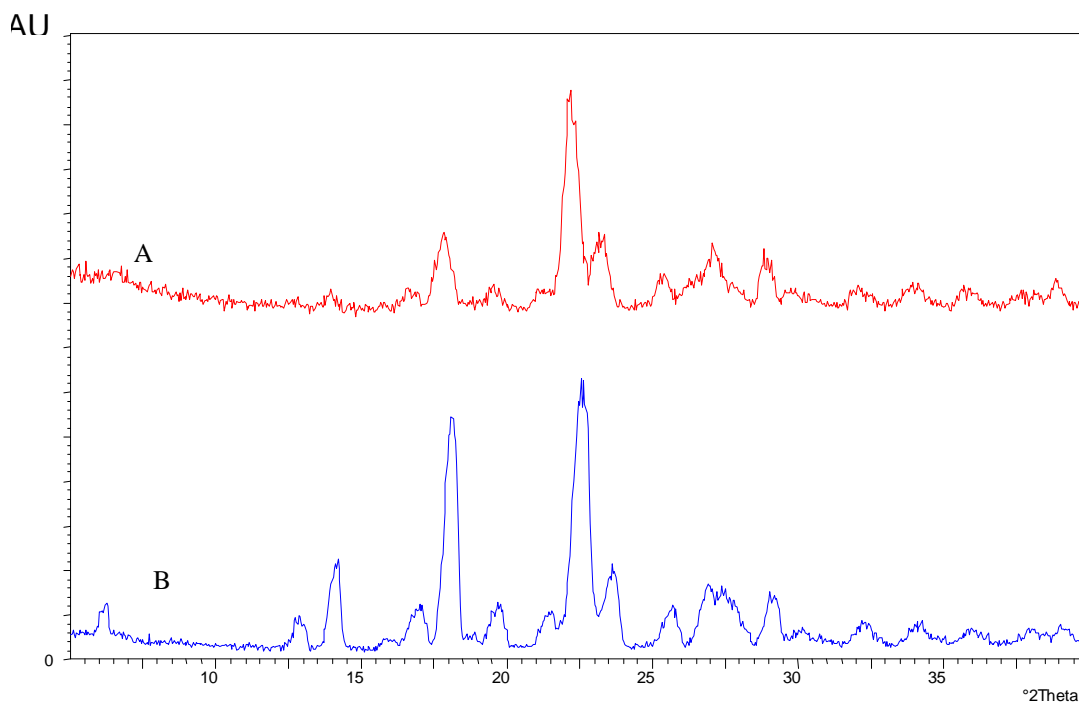


Figura 53. Diffractograma de una muestra rac-KP (A) y de la muestra recristalizada 50% R(-)-KP/50% S(+)-KP (B).

Como se puede observar en la figura 53, ambas muestras poseen el mismo perfil cristalino, por lo tanto la recristalización en proporción 1:1 de los enantiómeros provoca la reacomodación de la estructura a su forma más estable es decir la forma racémica. Resultados similares fueron obtenidos por Duddu et al.¹⁴⁶ para los enantiómeros de efedrina, los cuales recuperan la forma propia del racemato tras la mezcla física de ambos enantiómeros, teniendo en todos los casos las características propias de éste: punto de fusión, solubilidad y cristalinidad.

¹⁴⁶ Duddu, S.P., Grant, D.J. Formation of the racemic compound of ephedrine base from a physical mixture of its enantiomers in the solid, liquid, solution or vapor state. *Pharm. Res.* 9(8), 1083-1091, (1992).

3. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LAS DISTINTAS FORMAS DE KETOPROFENO

Para los distintos estudios de solubilidad se utilizaron las diferentes muestras preparadas y descritas en el apartado de *Materiales y Métodos*, tanto en el baño de agitación a 37°C así como tras un ciclo de autoclave a 120°C durante 20 minutos y presión de 1 atmósfera

Las diferentes formas de KP que se fueron objeto de estudio son las siguientes: rac-KP, R(-)-KP, S(+)-KP y mezcla física en proporción 1:1 de ambos enantiómeros denominada MF (1:1). De esta manera se observó la correlación entre la solubilidad obtenida y los resultados obtenidos anteriormente en las pruebas de determinación de punto de fusión y cristalinidad.

También se observó el aumento de la solubilidad de las distintas formas de KP, poco solubles en agua, cuando éstas se incluyen en soluciones que contengan diferentes pH's así como diferentes tipos de CD, con o sin polímeros hidrosolubles, excipientes que como ya se ha comentado anteriormente ayudan a facilitar la formación de los complejos, por tanto ayudan a aumentar la solubilidad. Para facilitar la solubilidad de KP, en determinados estudios, se añadió un alcalinizante del pH del medio, la trietanolamina (TEA).

3.1. BAÑO DE AGITACIÓN A 37°C

Se determinó la solubilidad de las distintas formas de KP (rac-KP, R(-) y S(+)-KP puros y MF (1:1)), a distintos pH's, así como en distintos tipos de CD (γ -CD, β -CD y HP β CD). Posteriormente, y en base a los resultados obtenidos, se seleccionó la HP β CD ya que posee una gran solubilidad en agua. Se repitieron los estudios a distintos pH's en presencia de la HP β CD, y además se tuvieron en cuenta la presencia de carbonos asimétricos en su estructura, que le otorga, a su vez, propiedades quirales. De esta manera se observó también la posible interacción entre fármaco-excipiente, y las posible enantioselectividad que se derive de ella.

3.1.1. Distintos pH's.

Los primeros ensayos realizados corresponden a la determinación de la solubilidad de las distintas formas de KP a diferentes pH's, los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 58. Cs (mM) del enantiómero R(-)-KP en las distintas formas de KP estudiadas a distintos pH (n=3).

<i>pH's</i>	<i>rac-KP</i> <i>R(-)-KP</i> \pm <i>SD</i>	<i>R(-)-KP</i> \pm <i>SD</i>	<i>MF R(-)-KP</i> \pm <i>SD</i>
9.0	8.47 \pm 1.030	13.16 \pm 0.600	1.92 \pm 0.350
7.0	4.40 \pm 0.300	10.10 \pm 0.100	0.78 \pm 0.002
6.5	3.16 \pm 0.350	7.21 \pm 0.400	0.46 \pm 0.500
<i>Agua des: 5.8</i>	1.13 \pm 0.150	2.69 \pm 0.200	0.64 \pm 0.030
5.5	0.85 \pm 0.030	2.44 \pm 0.100	0.31 \pm 0.123
4.5	0.53 \pm 0.020	1.52 \pm 0.000	0.26 \pm 0.634
3.5	0.42 \pm 0.040	1.18 \pm 0.000	0.24 \pm 0.356
2.0	1.19 \pm 0.000	1.21 \pm 0.400	0.23 \pm 0.260
1.2	0.40 \pm 0.050	1.01 \pm 0.005	0.24 \pm 0.120

Como se puede observar en la tabla 58 la solubilidad de las distintas formas estudiadas de R(-)-KP depende directamente del pH del medio en el que se encuentre, y aumenta según aumenta el pH del medio. Estos resultados serán lógicos debidos a las características de ácido débil que posee el KP, por tanto cuanto más alcalino se torna el pH del medio, mayor ionización se provocará en la molécula de KP, y este hecho repercutirá directamente en un aumento de su solubilidad. La menor o mayor solubilidad dependerá entonces, única y exclusivamente de la forma de KP de la que provenga el enantiómero (rac-KP, R(-)-KP puro o MF (1:1)).

Sin embargo, en cuanto a la solubilidad total de dicho enantiómero, R(-)-KP, existen grandes diferencias entre las diferentes formas estudiadas. Por ejemplo, el R(-)-KP que proviene del análisis de la mezcla física (MF) es el que menor coeficiente de solubilidad posee. Este hecho será tenido en cuenta a continuación al observar los resultados correspondientes al enantiómero S(+)-KP.

Por otro lado el enantiómero puro R(-)-KP, posee a todos los pH's estudiados una mayor solubilidad. Estos resultados son debidos a la diferente cristalinidad que posee con respecto a la forma racémica que ya se había observado previamente por difracción de rayos X, así como con la determinación de los puntos de fusión (R(-)-KP puro 75.8°C y para rac-KP 94.1°C).

A continuación se muestran los resultados correspondientes al enantiómero S(+)-KP, estudiado también en las mismas condiciones y a los mismos pH's.

Tabla 59. Cs (mM) del enantiómero S(+)-KP en las distintas formas de KP estudiadas a distintos pH (n=3).

<i>pH's</i>	<i>Rac-KP (S(+)) ± SD</i>	<i>S(+)-KP ± SD</i>	<i>MF (S(+)) ± SD</i>
9.0	8.59 ± 1.177	15.14 ± 0.230	9.23 ± 0.234
7.0	4.17 ± 0.370	7.73 ± 0.096	7.58 ± 0.322
6.5	3.05 ± 0.398	7.14 ± 0.237	5.86 ± 0.070
<i>Agua des: 5.8</i>	1.11 ± 0.132	2.42 ± 0.454	0.86 ± 0.010
5.5	0.83 ± 0.050	1.75 ± 0.124	1.24 ± 0.120
4.5	0.47 ± 0.060	1.52 ± 0.098	1.06 ± 0.121
3.5	0.31 ± 0.100	1.34 ± 0.650	0.74 ± 0.090
2.0	1.12 ± 0.130	0.97 ± 0.023	0.74 ± 0.056
1.2	1.03 ± 0.110	0.95 ± 0.390	0.74 ± 0.203

Como se puede observar en la tabla 59 correspondiente a las solubilidades del enantiómero S(+)-KP estudiado en las distintas formas, también se observa un comportamiento pH dependiente (según el pH se va tornando más alcalino, la solubilidad del KP irá aumentando, como ya hemos señalado con anterioridad debido a las características de ácido débil que posee la molécula de KP).

Debemos señalar que en este caso también el enantiómero S(+)-KP que proviene de la muestra de rac-KP, mostrará el menor valor de solubilidad, con respecto tanto al S(+)-KP puro como aquel que proviene de la MF. Este hecho confirma, a su vez, la mayor solubilidad del enantiómero S(+)-KP puro debido a la menor cristalinidad y por tanto punto de fusión que posee (76.5°C), con respecto al rac-KP (94.1°C).

En el estudio de la solubilidad de la MF observamos la existencia de una mayor solubilidad aparente para el enantiómero S(+)-KP que para el enantiómero R(-)-KP, que como habíamos señalado anteriormente su solubilidad a los distintos pH es siempre la menor de las tres formulaciones estudiadas rac-KP (R), R(-)-KP y MF (R). Observando detenidamente los resultados se demuestra que la solubilidad es igual entre ellos pero que la velocidad de disolución es diferente, de ahí las diferencias halladas en la MF (1:1).

Para observar más detenidamente los resultados correspondientes a la cantidad de uno y otro enantiómero solubilizado en cada una de las distintas formas de KP, y observar en cada caso posibles diferencias enantioselectivas, se muestran las gráficas comparativas de ambos enantiómeros en cada uno de los casos estudiados. Las figuras 54, 55 y 56 muestran los resultados.

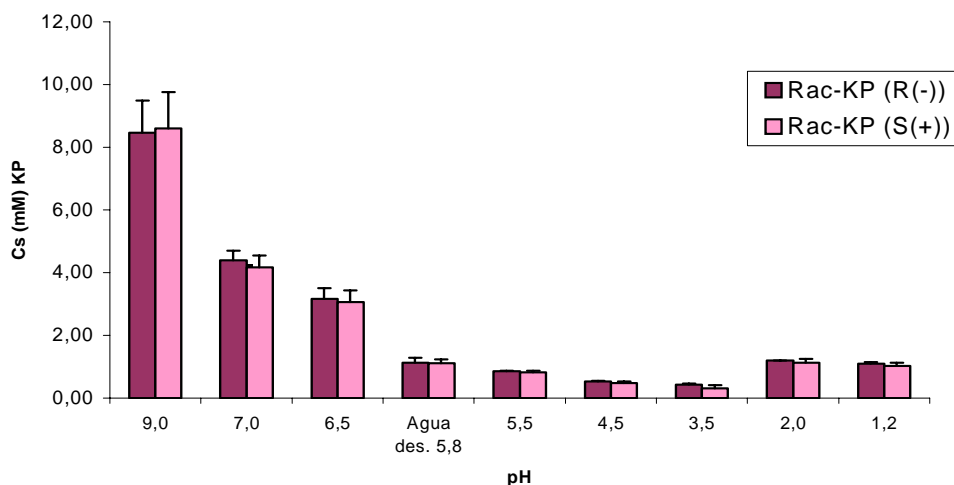


Figura 54. Enantiómeros de la muestra rac-KP.

Como se puede observar en la figura 54 para la muestra de rac-KP, no se observan diferencias entre ambos enantiómeros en ninguno de los pH estudiados

A continuación se muestran los resultados correspondientes al análisis de los enantiómeros puros de KP:

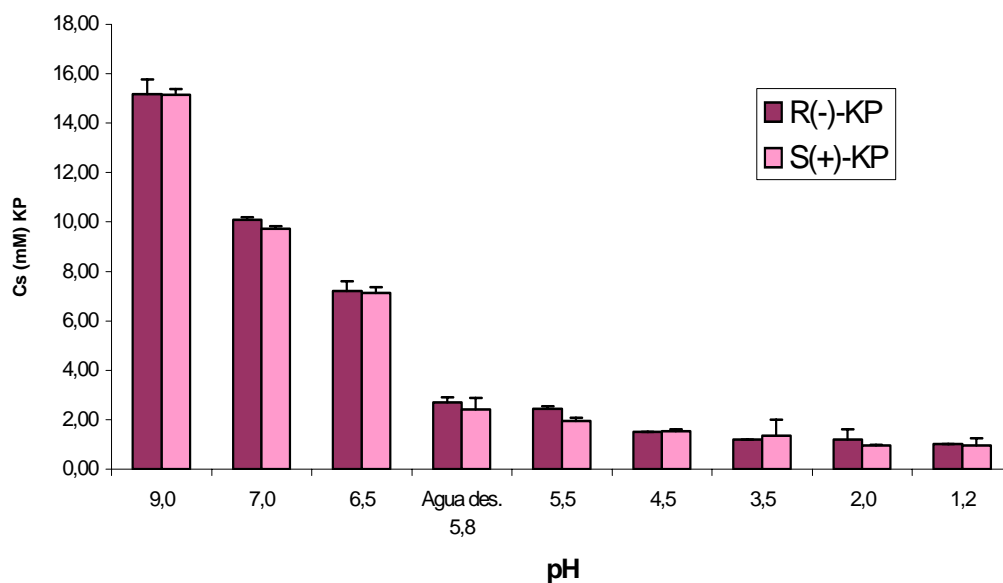


Figura 55. Enantiómeros puros R(-)-KP y S(+)-KP.

Ambos enantiómeros puros poseen una mayor solubilidad que los obtenidos para la muestra de rac-KP, debido entre otros factores al punto de fusión menor que poseen. Este hecho se observa, principalmente a los pH más favorables para que se produzca la ionización de la molécula, no observándose diferencias significativas ($p > 0.01$) en cuanto a la solubilidad de cada uno de los enantiómeros.

A continuación se muestra la figura perteneciente a los enantiómeros de KP, que provienen de la mezcla física (1:1) de los enantiómeros puros (MF).

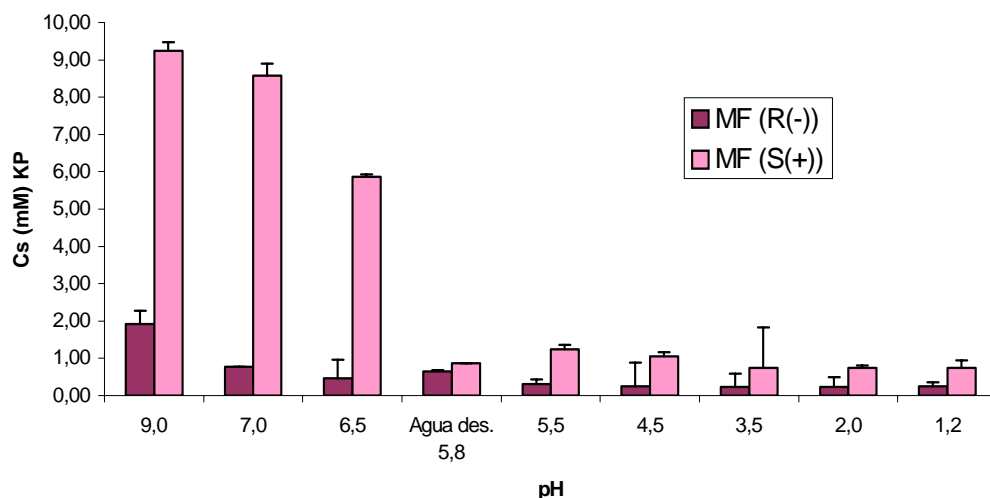


Figura 56. Enantiómeros de la MF (1:1).

Como ya habíamos observado en las tablas 57 y 58, correspondientes a los enantiómeros, observamos una mayor solubilización en todos los casos del enantiómero S(+)-KP, que se hace más acusado a medida que aumenta el pH de la solución, y por tanto se favorece la solubilidad del KP. Debemos observar también que la suma de las solubilidades de ambos enantiómeros de la mezcla (MF) es similar a la solubilidad, y por tanto saturación de cualquiera de los dos enantiómeros puros en las mismas condiciones.

A la vista de los resultados obtenidos, a todos los pH's estudiados, excepto para el agua desionizada, se observa un comportamiento de mayor solubilidad enantioselectiva para el enantiómero puro, S(+)-KP. En el caso del estudio de punto de fusión, ambos enantiómeros poseen prácticamente el mismo, sin embargo en el estudio de morfología de los cristales, por difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido se observan como ya se comentó anteriormente ciertas diferencias que pueden ser las responsables de estas diferencias de solubilidad.

3.1.2. Distintos tipos de ciclodextrinas (β -CD, HP β CD y γ -CD).

Se seleccionaron tres tipos de CD, β -CD, HP β CD y γ -CD, para realizar análisis de solubilidad en medio acuoso (agua desionizada) de los enantiómeros de la forma racémica de KP. A su vez se adicionó al medio los polímeros hidrosolubles (HPMC, PVP) como agentes solubilizantes, y el modificador de pH del medio (TEA), que serán utilizados más extensamente posteriormente en los estudios realizados con el autoclave para facilitar la formación de complejos. En los estudios realizados en el baño de agitación a 37 °C, se observará si existe alguna influencia en los resultados de solubilidad obtenidos bajo estas condiciones por la utilización de los mismos.

Según unos estudios previos realizados por nuestro equipo de investigación y que dieron origen a una tesis doctoral¹⁴⁷ cuyo fundamento consistía en el estudio de la solubilidad y estabilidad de KP, entre otros fármacos, en distintos tipos de CD (β -CD, HP β CD) preparadas a distintas proporciones e incluidas en distintos pH's (1.2, 3.7, 6.0 y agua desionizada). Para ambas CD se consiguió unos aumentos lineales de la solubilidad según se incrementaba la concentración de la CD a todos los pH's estudiados.

En los estudios que se muestran a continuación se utilizó una concentración fija de 10% de las CD, debido a que en base a los resultados realizados por nuestro grupo de investigación y mencionadas anteriormente, se considera dicho valor suficiente para aumentar la solubilidad de los enantiómeros de KP. Además se utilizarán otros agentes solubilizantes (los polímeros hidrosolubles y pH). La utilización de estos agentes solubilizantes adicionados tiene como propósito el de limitar el uso de la CD para disminuir posibles efectos toxicológicos y reducir costes económicos

Las muestras analizadas se describen en el apartado de *Materiales y Métodos*, en las tablas 12, 13 y 14.

3.1.2.1. β -CD

Los resultados obtenidos tras el análisis por HPLC se muestran en la figura 57 mostrada a continuación:

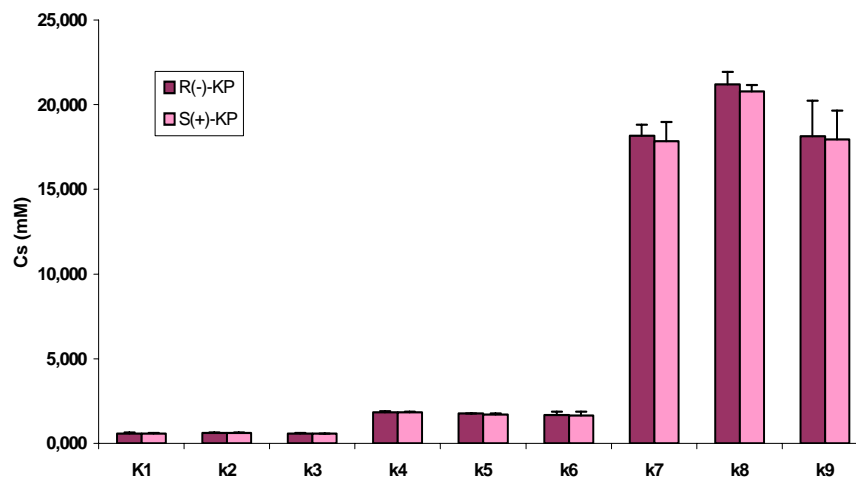


Figura 57. Solubilidad de los enantiómeros de la forma rac-KP, en presencia de β -CD

Como se puede observar la presencia de β -CD en el medio de disolución (k4) incrementa ligeramente la solubilidad ($p < 0.05$) de los enantiómeros de la forma de rac-KP (aproximadamente 3 veces). Por otro lado, las muestras que presentan la β -CD junto a los polímeros hidrosolubles HPMC (K5), y PVP (K6), no facilitan la formación de los complejos, debido a que como se puede observar en el gráfico, el comportamiento de éstas es igual al de la muestra que contiene tan solo la β -CD.

Este aumento de la solubilidad en presencia de CD en presencia de polímeros hidrosolubles en proporción 0.25%, sin utilizar condiciones forzadas de presión y temperatura ha sido descrito previamente en la bibliografía para otro fármaco de la familia de los ácidos aril propiónicos, el

¹⁴⁷ Calero Montoya, J. Efecto de la utilización de ciclodextrinas en la solubilidad y estabilidad del aciclovir, ketoprofeno, talidomida y ricobendazol. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid. Marzo 2001.

concreto, para el naproxeno. Faucci et al.¹⁴⁸ consiguieron aumentar la solubilidad de éste entre un 25% y un 80% tras la adición del polímero.

Sin embargo, volvemos a observar la influencia que ejerce el pH del medio en la solubilización de moléculas ionizables. Tras la adición de TEA a la solución que contiene la β -CD (K7), se observa un incremento considerable en la solubilidad de los enantiómeros del rac-KP, (aproximadamente 10 veces), debido a la alcalinización que se produce y que favorecerá la ionización de la molécula y por tanto la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP, molécula como ya hemos dicho anteriormente posee características de ácido débil.

También se ha observado la influencia de la adición de los polímeros hidrosolubles, HPMC (K8) y PVP (K9), al medio alcalinizado por la TEA. Una vez más observamos que bajo estas condiciones de trabajo (baño de agitación a 37°C) los polímeros hidrosolubles no ejercen un significativo ($p < 0.05$) aumento de la complejación del fármaco con la β -CD. De todas formas, el mejor resultado para ambos polímeros se observó con la HPMC (K8), cuya combinación con la β -CD y TEA, parece que ofrece el máximo valor de solubilidad para ambos enantiómeros.

En todos los casos estudiados, la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP, ofrecen el mismo comportamiento en cuanto a los resultados de solubilidad obtenidos. Por tanto, no existen significativas ($p < 0.01$) diferencias enantioselectivas para las condiciones estudiadas

¹⁴⁸ Faucci, M.T., Mura, P. Effect of water-soluble polymers on naproxen complexation with natural and chemically modified beta-cyclodextrins. Drug Dev. Ind. Pharm. 27(9), 909-917, (2001).

3.1.2.2. HP β CD

Por sus propiedades hidrófilas, utilizaremos el derivado hidroxipropilado de la β -CD. Se realizarán los estudios en las mismas condiciones que en el apartado anterior que son mostrados a continuación:

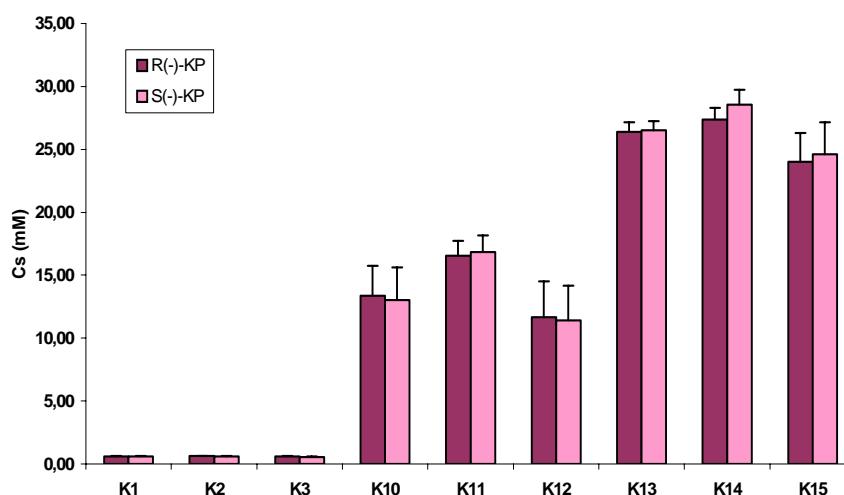


Figura 58. Solubilidad de los enantiómeros de la forma rac-KP, en presencia de HP β CD.

Como se puede observar en la figura 58 la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP aumenta cuando la HP β CD es adicionada al medio (K10), aproximadamente 23 veces mayor. Cuando se añaden al medio los polímeros hidrosolubles se observa que los valores ligeramente superiores de solubilidad son hallados cuando la HPMC (K11) es añadida al medio. Sin embargo la adición de PVP (K12) al medio no produce ninguna diferencia respecto a los resultados obtenidos para la HP β CD (K10). Estos resultados difieren ligeramente con aquellos obtenidos para los estudios de solubilidad realizados con la β -CD y mostrados en el apartado anterior. La adición de ésta (K4, K5, K6) al medio provocó un aumento de solubilidad respecto a las muestras que no contenían la β -CD (K1, K2, K3), pero éste será más discreto que el encontrado cuando la HP β CD (K10, K11, K12) es adicionada al

medio. Este hecho es lógico debido a la ya comentada mayor solubilidad que ésta CD posee en el agua. Respecto a la adición de polímeros para observar la posible interacción fármaco-excipient-excipient que provoque un efecto en la solubilidad final, muestra que los polímeros no ejercen efecto alguno sobre la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP en el caso de la β -CD, sin embargo en el caso de la HPMC adicionada al medio que contiene HP β CD provoca un ligero aumento en la solubilidad (K11), debido a la interacción positiva que se produce entre el rac-KP-HP β CD-HPMC.

La adición de la TEA (K13) en este caso también favorecerá la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP, debido a como habíamos mencionado anteriormente se provoca la alcalinización del medio que favorece plenamente la ionización y por tanto la solubilización de los enantiómeros de rac-KP. Sin embargo la adición de los polímeros hidrosolubles (K14 y K15), no ejerce una influencia significativa ($p > 0.05$) en el aumento de solubilidad hallada, pero se observa un comportamiento similar al hallado cuando la β -CD es utilizada. La HPMC, aunque discretamente, volverá a dar los valores mayores de solubilidad, en ambas CD, (K8 y K14).

En ninguno de los casos estudiados se encontraron diferencias significativas ($p > 0.01$) para la solubilidad enantioselectiva de los enantiómeros de rac-KP. El uso del excipiente quirál, HPMC, aunque provoca una interacción junto con las CD y al fármaco, dando origen a los mayores picos de solubilidad, dicha interacción no será interacción de carácter enantioselectiva.

3.1.2.3. γ -CD

Los resultados obtenidos para la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP en estas condiciones se muestran en la siguiente figura:

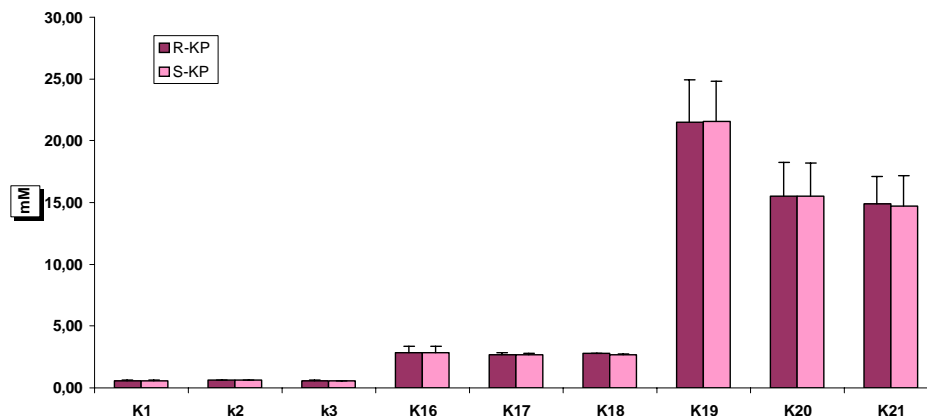


Figura 59. Solubilidad de los enantiómeros de la forma rac-KP, en presencia de HP β CD 10%.

Como se puede observar en la figura 59, la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP aumenta por la adición del agente favorecedor de la solubilidad (γ -CD) (K16), dicho aumento será de aproximadamente 3 veces, valor similar al obtenido cuando la β -CD es adicionada al medio (K4). La adición de polímeros hidrosolubles al medio (K17 y K18) no producirá modificación alguna en cuanto a los valores obtenidos de solubilidad de los enantiómeros de rac-KP.

Sin embargo, tras la adición de TEA (K19), observamos nuevamente unos valores de solubilidad de los enantiómeros de rac-KP superiores a aquellos encontrados tan sólo con la γ -CD. Este hecho, ya ha sido repetidamente descrito en los apartados anteriores. Debemos observar la interacción negativa que originará en la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP la adición de los polímeros hidrosolubles, HPMC (K20) y PVP (K21), al medio, que se refleja en un descenso en la solubilidad obtenida respecto a la muestra que no posee polímero alguno (K19).

De nuevo, en todos los casos estudiados no se observaron diferencias significativas ($p > 0.01$) en cuanto a la aparición de solubilidad enantioselectiva de los enantiómeros de rac-KP.

3.1.3. Diferentes pH's en combinación con 10% HPβCD.

Una vez observados los resultados obtenidos en el apartado anterior, se decidió utilizar la HPβCD en proporción de 10% como el excipiente de elección para los ensayos que fueron realizados. La HPβCD 10% produce el mayor incremento en la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP, comparado con los resultados obtenidos para las otras dos CD estudiadas, β-CD y γ-CD.

En el apartado 6.1.1 ya se estudió la solubilidad de las distintas formas de KP en presencia de diferentes pH. En el presente apartado repetimos todos los pH's estudiados y además adicionamos al medio HPβCD 10% para observar la influencia que posee ésta en la solubilidad de los enantiómeros de KP, en aquellos pH que favorezcan su solubilidad (pH alcalinos), como en aquellos que no sean propicios para ella (pH ácidos). Observamos también las posibles diferencias enantioselectivas.

Las muestras fueron preparadas según el esquema mostrado en el apartado de *Materiales y Métodos*.

Los primeros ensayos realizados corresponden a la determinación de la solubilidad de las distintas formas de KP a diferentes pH's en una solución que contiene 10% de HPβCD, los resultados obtenidos se muestran en las tablas a continuación:

Tabla 60. Cs (mM) del enantiómero R(-)-KP en las distintas formas de KP estudiadas a distintos pH (n=3) y 10% HPβCD.

<i>pH's</i>	<i>Rac-KP (R(-)-KP) ± SD</i>	<i>R(-)-KP ± SD</i>	<i>MF (R(-)-KP) ± SD</i>
9.0	17.18 ± 0.452	53.90 ± 0.195	23.44 ± 0.723
7.0	15.50 ± 0.345	35.09 ± 0.098	24.60 ± 0.527
6.5	13.77 ± 0.600	37.40 ± 0.758	16.88 ± 0.067
<i>Agua des: 5.8</i>	15.98 ± 0.310	55.47 ± 0.585	7.84 ± 0.045
5.5	12.76 ± 0.348	42.32 ± 0.575	1.,11 ± 0.174
4.5	12.10 ± 0.976	51.33 ± 0.463	6.03 ± 0.309
3.5	11.10 ± 0.121	48.75 ± 0.007	4.48 ± 0.540
2.0	11.52 ± 0.010	47.04 ± 0.535	6.79 ± 0.456
1.2	10.75 ± 0.000	43.76 ± 0.121	3.64 ± 0.040

Como se puede observar en los resultados mostrados en la tabla 60, nuevamente la solubilidad del R(-)-KP de las distintas formas estudiadas de KP, depende del pH del medio. Así tendremos una mayor solubilidad de la molécula cuanto mayor sea el pH del medio. Se observó también que la presencia de la HP β CD 10% provoca la formación de complejos solubles que aumentan aún más la solubilidad del R(-)-KP, en comparación con las muestras estudiadas anteriormente preparadas tan sólo a distintos pH's, sin la adición de la HP β CD.

A su vez, de nuevo se observará que los mayores valores de solubilidad se obtuvieron para el enantiómero R(-)-KP puro, y los menores serán los encontrados para el R(-)-KP que proviene de la mezcla física (MF) a pH inferiores de 5.8 (agua desionizada). Posteriormente haremos mención a ello cuando se estudien los resultados obtenidos para el enantiómero S(+)-KP.

Volvemos a señalar que el enantiómero puro R(-)-KP, posee a todos los pH's estudiados una mayor solubilidad. Como ya hemos señalado anteriormente, estos resultados son debidos a la diferente cristalinidad que posee éste con respecto a la forma racémica que ya se había observado anteriormente con la determinación de los puntos de fusión (R(-)-KP puro 75.8°C y para rac-KP 94.5°C). Además la incorporación de la HP β CD 10% permite la inclusión de dicho enantiómero en la cavidad hidrófoba y por tanto permitirá la solubilización de la molécula de manera significativa ($p < 0.05$). A continuación se muestran los resultados correspondientes al enantiómero S(+)-KP, estudiado también en las mismas condiciones y a los mismos pH's.

Tabla 61. Cs (mM) del enantiómero S(+)-KP en las distintas formas de KP estudiadas a distintos pH (n=3) y 10% HP β CD.

<i>pH's</i>	<i>Rac-KP (S(+)-KP) \pm SD</i>	<i>S(+)-KP \pm SD</i>	<i>MF (S(+)-KP) \pm SD</i>
9.0	17.82 \pm 0.150	50.17 \pm 0.097	24.49 \pm 0.564
7.0	14.43 \pm 0.090	40.57 \pm 0.748	23.77 \pm 0.256
6.5	14.24 \pm 0.436	47.10 \pm 0.567	16.32 \pm 0.242
<i>Agua des: 5.8</i>	16.25 \pm 0.627	59.70 \pm 0.654	27.91 \pm 0.563
5.5	13.26 \pm 0.111	50.39 \pm 0.847	18.71 \pm 0.684
4.5	12.89 \pm 0.736	49.86 \pm 0.242	22.90 \pm 0.114
3.5	11.55 \pm 0.727	47.50 \pm 0.111	25.63 \pm 0.737
2.0	11.98 \pm 0.216	46.77 \pm 0.074	29.57 \pm 0.271
1.2	11.08 \pm 0.008	43.44 \pm 0.869	20.95 \pm 0.214

Como se puede observar en la tabla 61 correspondiente a las solubilidades del enantiómero S(+)-KP estudiado en las distintas formas, al igual que para el enantiómero R(-)-KP se observó un comportamiento pH dependiente (según el pH se va tornando más alcalino, la solubilidad del KP irá aumentando, como ya hemos señalado con anterioridad debido a las características de ácido débil que posee la molécula de KP). Sin embargo nuevamente se observa una gran influencia de la HP β CD 10% añadida al medio, en cuanto al aumento significativo ($p < 0.01$) de la solubilidad.

Debemos señalar que en este caso el enantiómero S(+)-KP que proviene de la muestra de rac-KP, mostrará el menor valor de solubilidad, con respecto tanto al S(+)-KP puro como aquel que proviene de la MF. Este hecho confirma, a su vez, la mayor solubilidad del enantiómero S(+)-KP puro debido a la menor cristalinidad y por tanto punto de fusión que posee (76.5°C), con respecto al rac-KP (94.5°C).

En el estudio de la solubilidad de la MF observamos que a la mayoría de los pH's indicados existe una mayor solubilidad para el enantiómero S(+)-KP que para el enantiómero R(-)-KP, que como habíamos señalado anteriormente su solubilidad en los distintos medios estudiados es siempre la menor de las tres formulaciones estudiadas rac-KP (R), R(-)-KP y MF (R(-)).

Para observar más detenidamente los resultados correspondientes a la cantidad de uno y otro enantiómero solubilizado en cada una de las distintas formas de KP, y observar en cada caso posibles diferencias enantioselectivas, se muestran las gráficas comparativas de ambos enantiómeros en cada uno de los casos estudiados. Las figuras 60, 61 y 62 muestran los resultados.

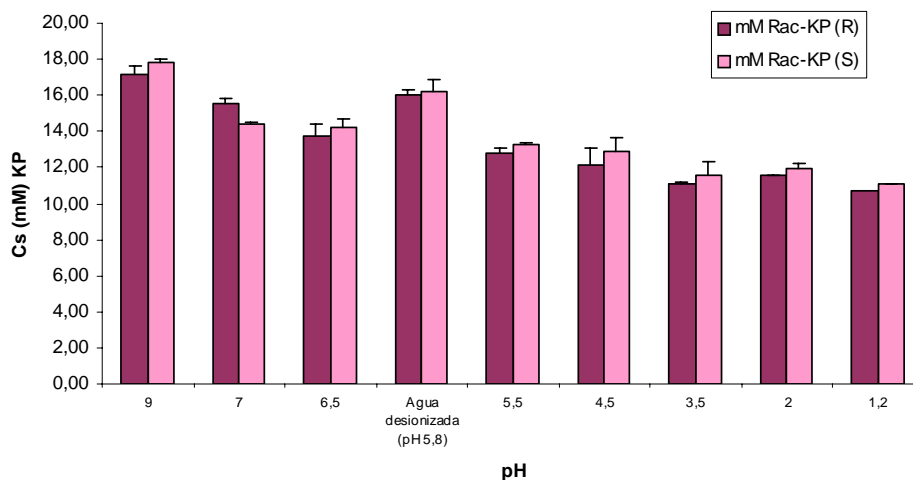


Figura 60. Enantiómeros de la muestra rac-KP.

Como se puede observar en la figura 60 para la muestra de rac-KP, no se observan diferencias enantioselectivas significativas ($p > 0.05$) entre ambos enantiómeros a ninguno de los pH estudiados. Hablando de la solubilidad total obtenida para los enantiómeros de la forma rac-KP, tras la incorporación a los distintos pH's de la HP β CD 10%, se observa un aumento significativo ($p < 0.01$) en cuanto a la solubilidad de ambos enantiómeros a todos los pH estudiados (incluso a los pH's ácidos que no favorecen la solubilidad de la molécula). (Observar figura 54, correspondiente a la muestra de los enantiómeros de rac-KP a distintos pH's sin la incorporación de HP β CD 10%. Este hecho demuestra la relevancia de la HP β CD en la solubilidad de los enantiómeros de KP, incluso independientemente del pH del medio.)

A continuación se muestran la gráfica comparativa de los enantiómeros puros de KP:

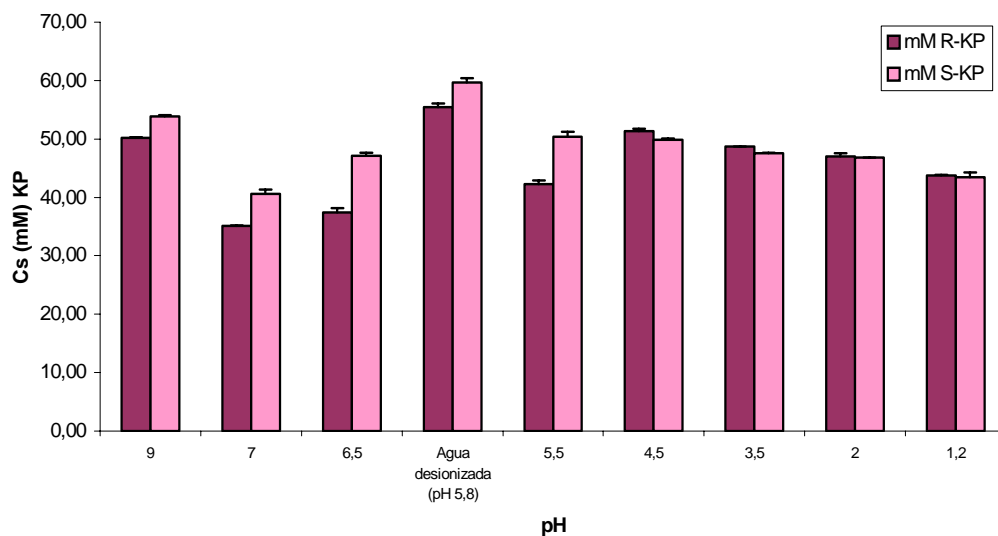


Figura 61. Enantiómeros puros R(-)-KP y S(+)-KP.

En este caso observamos una significativa mayor solubilidad ($p < 0.05$) para ambos enantiómeros que la encontrada para los enantiómeros pertenecientes a la muestra de rac-KP. La incorporación de la HP β CD 10% provoca un aumento de solubilidad considerable a todos los pH estudiados (ver figura 55, correspondiente al estudio realizado a distintos pH's sin la incorporación de la HP β CD 10% al medio). Se observan pequeñas diferencias significativas ($p < 0.05$) en los resultados de solubilidad enantioselectivas a los pH más cercanos a la alcalinidad (pH 9.0, 7.0, 6.5, agua desionizada y 5.5). El enantiómero que se solubilizará en mayor cantidad a esos pH's será el S(+)-KP. Este hecho parece curioso debido a que en la mezcla física estudiada a continuación siempre ha destacado el enantiómero S(+)-KP como el de mayor solubilidad en determinadas circunstancias del proceso.

A continuación se muestra la figura perteneciente a los enantiómeros de KP, que provienen de la mezcla física (1:1) de los enantiómeros puros (MF).

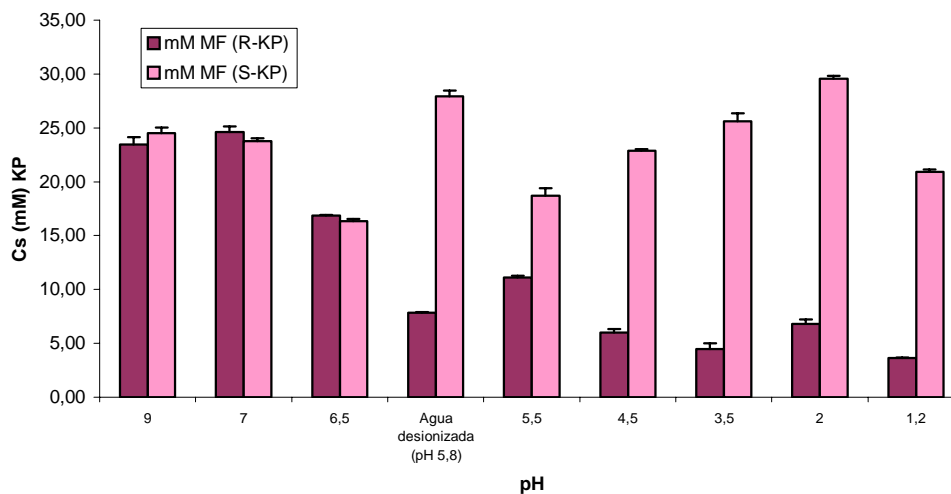


Figura 62. Enantiómeros de la MF (1:1).

Como ya habíamos observado en las tablas correspondientes a la solubilidad de los enantiómeros de las distintas formas de KP estudiadas, observamos que en la mayoría de los casos existe una mayor solubilización del enantiómero S(+)-KP, que se hace más acusado a medida que disminuye el pH de la solución, y por tanto se favorece la solubilidad del KP. Debemos observar también que la suma de las solubilidades de ambos enantiómeros de la mezcla (MF) es similar a la solubilidad de la mezcla racémica, y por tanto se alcanza una saturación de cualquiera de los dos enantiómeros puros en las mismas condiciones.

Lotter et al.¹⁴⁹ encontraron diferencias en cuanto a la solubilidad de los enantiómeros puros de chlortalidona en el medio que contiene la β -CD a pH 5, 7 y 9, en presencia de distintos tipos de solventes.

¹⁴⁹ Lotter, J., Krieg, H.M., Keizer, K., Breytenbach, J.C. The influence of beta-cyclodextrins on the solution of chlortalidone and its enantiomers. Drug Dev. Ind. Pharm. 25(8), 879-884, (1999).

A la vista de los resultados obtenidos anteriormente podemos decir que en soluciones acuosas, la complejación de moléculas de fármacos ionizados, como es el caso del KP, por parte de la CD puede resultar en una cantidad mayor de fármaco disuelto^{150, 151, 152}.

¹⁵⁰ Mullers, B., Albers, E. Complexation of dihydropyridine derivatives with cyclodextrins and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in solution. *Int. J. Pharm.* 79, 273-288, 1992.

¹⁵¹ Johnsons M., Hoestery, T., Anderson, B. Solubilization of a tripeptide HIV protease inhibitor using a combination of ionization and complexation with chemically modified cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.* 83, 1142-1146, (1994).

¹⁵² Timwalla, A., Hoestery, T., Xiam, T., Lim, K., Anderson, B. Solubilization of thiazobenzimidazole using a combination of pH adjustement and complexation with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin". *Pharm. Res.* 10, 1136-1143, (1993).

3.2. ENSAYOS DE SOLUBILIDAD EN EL AUTOCLAVE

3.2.1. Diferentes proporciones de HP β CD

Continuando con los ensayos de solubilidad de los enantiómeros de rac-KP, utilizaremos el método descrito por Loftsson et al.¹⁵³, para fármacos poco solubles en agua, por medio del cual trataremos de aumentar la complejación del KP y la HP β CD en diferentes proporciones (5, 10, 15, 20, 25%), tanto en agua desionizada (pH 5.8) como a pH 9.0 que se considera óptimo para aumentar la solubilidad del KP. Preparamos las soluciones de la manera descrita en el apartado de *Materiales y Métodos*. Posteriormente los viales se incluyen convenientemente sellados en el autoclave, procediéndose a realizar un ciclo durante 20 minutos, a una temperatura de 120 °C, y presión registrada en el barómetro de 1 atmósfera.

Una vez autoclavadas las muestras, las dejamos enfriar fuera del autoclave y se espera 1 hora y 30 minutos, para su conveniente estabilización. Posteriormente se procedió a filtrar y diluir las muestras para su análisis por HPLC.

Los resultados obtenidos para las muestras preparadas en agua desionizada (pH 5.8) se muestran a continuación:

¹⁵³ Loftsson, T., Másson, M., Sigurjónsdóttir, J.F. Methods to enhance the complexation efficiency of cyclodextrins. S.T.P.Pharm. Sci. 9(3), 237-242, (1999).

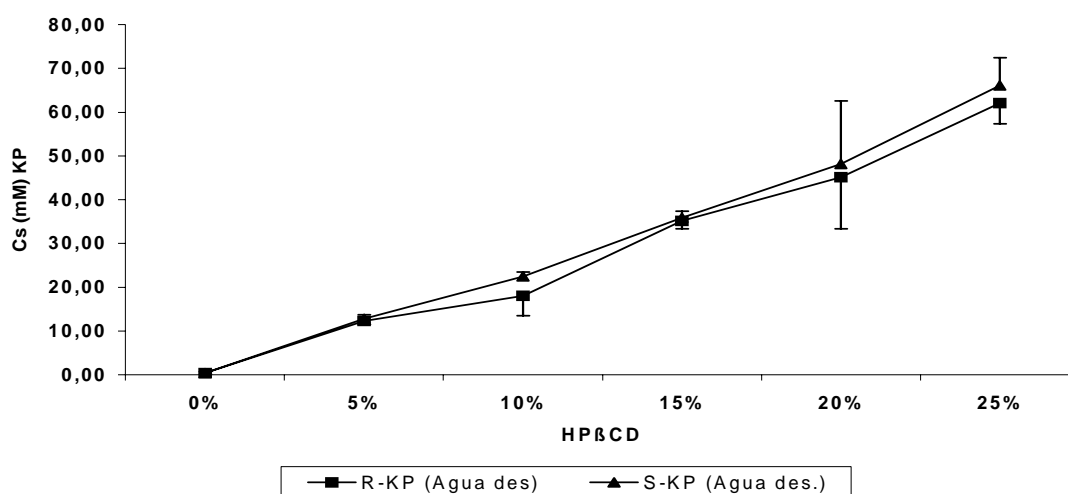


Figura 63. Diagrama de solubilidad de los enantiómeros de KP en presencia de la HPβCD en agua desionizada.

Como se puede observar en la figura 63 se produce un aumento lineal ($p < 0.01$) en la solubilidad de los enantiómeros de KP. Este aumento se produce cuando a su vez se aumenta la concentración de HPβCD. El tipo de gráfico obtenido para ambos enantiómeros es de tipo A_L según Higuchi et al.¹⁵⁴ asumiéndose una estequiometría tipo 1:1. A su vez se puede decir que no se encontraron diferencias enantioselectivas ($p > 0.05$) para los enantiómeros de KP, bajo las distintas condiciones estudiadas, por tanto en este caso no se produce una interacción enantioselectiva entre los enantiómeros de KP y el excipiente con propiedades quirales utilizado (HPβCD).

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la solubilidad del rac-KP a pH 9.0 con diferentes proporciones de HPβCD (5, 10, 15, 20, 25%).

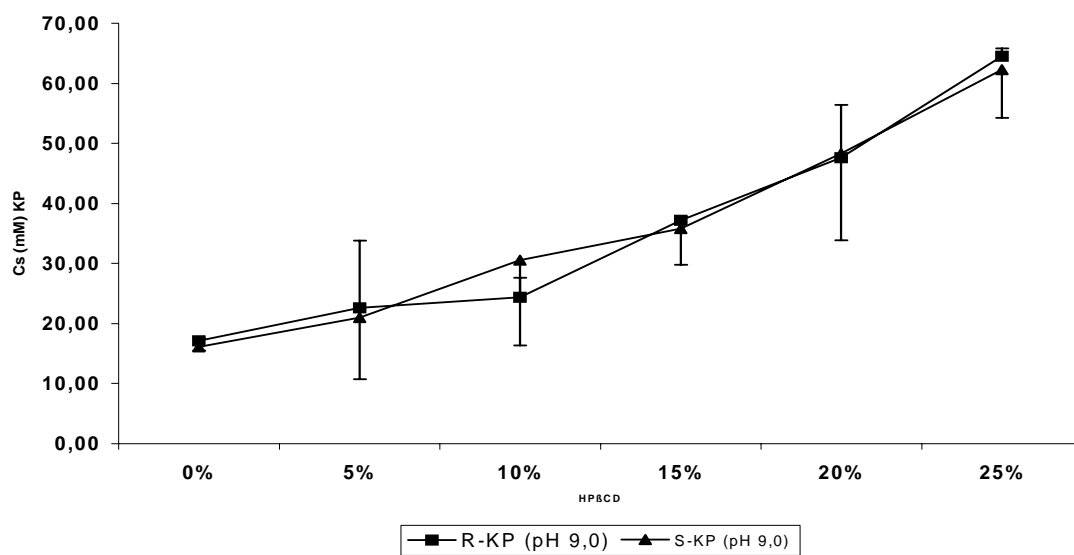


Figura 64. Diagrama de solubilidad de los enantiómeros de KP en presencia de la HP β CD a pH 9.0.

El KP al ser una molécula de carácter ácido débil (pK_a 5.94), se encontró en un medio que es favorable para provocar su ionización lo que explica el aumento de su solubilidad en el medio carente de CD, con respecto a la solubilidad que se obtenía para los enantiómeros de rac-KP en agua desionizada.

Al igual que en el medio estudiado anteriormente, la relación entre la cantidad de CD añadida al medio y el aumento de la solubilidad vuelve a ser lineal ($p < 0.05$) según Higuchi et al.¹⁸, ciñéndose nuevamente a una cinética tipo A_L , por lo tanto se asume una estequiometría de tipo 1:1 (una molécula de fármaco por cada molécula de CD).

¹⁵⁴ Higuchi, T., Connors, K.A. Phase solubility techniques. Adv. Anal. Chem. Instrum. 4, 117, 212, (1965).

En este caso tampoco se encuentran interacciones entre los enantiómeros del rac-KP y la CD que provoquen diferencias enantioselectivas que provoquen diferencias ($p > 0.05$) en la solubilidad obtenida en cada caso estudiado.

Si superponemos las gráficas obtenidas para ambas condiciones obtenemos el siguiente resultado:

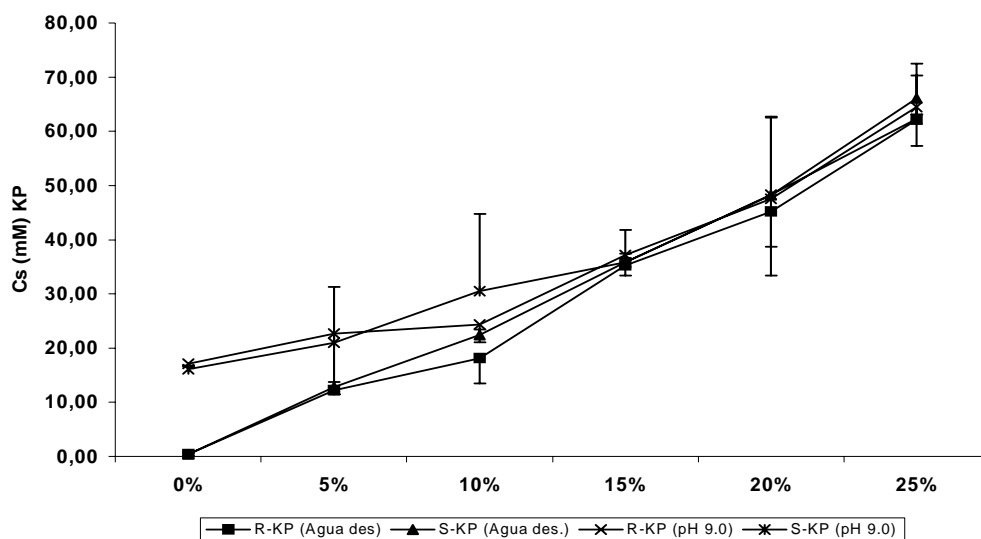


Figura 65. Diagrama de solubilidad de los enantiómeros de KP en presencia de HPβCD en agua desionizada y a pH 9.0.

Como ya habíamos señalado anteriormente la solubilidad de los enantiómeros del rac-KP a pH 9.0 se ve favorecida incluso en ausencia de CD, debido a las características de ácido débil que posee el KP, en comparación con el resultado obtenido para el rac-KP preparado en agua desionizada en ausencia de CD. Por otro lado observamos que debido al propio pH 9.0 los enantiómeros de rac-KP siguen aumentando su solubilidad linealmente a medida que se añaden CD al medio por encima de los valores obtenidos para el agua desionizada hasta 10% de CD. Momento a partir del cual la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP que se registra en ambos medios es prácticamente la misma.

Teniendo en cuenta recientes estudios realizados por nuestro equipo de investigación¹⁵⁵ los cuales estudiaban la solubilidad de los enantiómeros de KP a distintos pH's preparados en diferentes proporciones de HP β CD (estudios realizados en baño a 37°C con agitación constante), las correspondientes constantes de estabilidad que se obtuvieron en agua desionizada fueron: R(-)-KP: 702 M⁻¹, y para S(+)-KP: 804 M⁻¹. Las constantes de estabilidad a pH básico fueron para R(-)-KP: 16 M⁻¹, y para S(+)-KP: 18 M⁻¹. En base a estos resultados podemos decir que las constantes que se obtuvieron para las muestras analizadas a pH neutro son mayores que las obtenidas a pH básico. Las constantes de estabilidad que se mantienen dentro del rango 200-5000 M⁻¹, según Blanco et al.¹⁵⁶, se consideran que los complejos formados son suficientemente estables. Por lo tanto los resultados obtenidos para aquellos estudios reflejaron que las interacciones entre los enantiómeros de KP y la HP β CD son mayores y más estables en los complejos formados en el medio acuoso (pH neutro) que en el medio básico.

Para observar, los resultados de constantes de estabilidad obtenidos bajo las actuales condiciones de trabajo (autoclave a 120°C durante 20 minutos) se procedió a realizar los cálculos pertinentes en base a los siguientes preceptos:

Las constantes de disociación de los complejos formados se calcularon teniendo en cuenta el perfil obtenido, utilizando para ello la ecuación propuesta por Higuchi et al.¹⁵⁷ basándose en una estequiometría 1:1.

La ecuación que será utilizada es la siguiente $K_c = \text{pendiente} / (S_0(1 - \text{pendiente}))$. Los valores de solubilidad (S_0) se obtuvieron de dos formas. Por un lado, un valor experimental a partir de los datos de las muestras sin CD. Así se calculó un valor de solubilidad en saturación que corresponde al coeficiente de solubilidad (S_0). Al estar calculado directamente a partir de los datos experimentales los llamaremos (S_0) exp. Por otro lado, a partir del ajuste lineal de los datos obtenidos con distintas concentraciones de CD se obtuvo en el punto de corte con el eje de las Y, otro valor de S_0 al que

¹⁵⁵ Calero, J. Efecto de la utilización de ciclodextrinas en la solubilidad y estabilidad de aciclovir, ketoprofeno, talidomida y ricobendazol. Tesis doctoral. UCM, Marzo, 2001.

¹⁵⁶ Blanco, J.L., Vila-Jato, J., Otero, F., Anguiano, S. Drug Dev. Ind.Pharm. 17, 943, (1991).

¹⁵⁷ Higuchi, T., Connors, K.A. Phase solubility techniques. Adv.Anal.Chem.Instrum. 4, 117, 212, (1965).

llamaremos (S_0) graf. No siempre coincidirán los dos valores, y las diferencias entre ambos se deberán a errores analíticos de determinación, o más probablemente a falta de linealidad a bajas concentraciones de CD.

En base a lo comentado anteriormente, se obtuvieron los siguientes parámetros para los enantiómeros de KP en ambos medios:

Tabla 62. Parámetros determinados a partir de los diagramas de solubilidad de los enantiómeros de KP en presencia de HP β CD en agua desionizada y pH 9.0.

<i>pH</i>	<i>Enantiómero</i>	<i>(S₀) exp.</i> <i>(mM)</i>	<i>(S₀) graf.</i> <i>(mM)</i>	<i>K_c (M⁻¹)</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>Agua</i>	R(-)	0.40	0.78	1780	0.992	< 0.01
<i>Agua</i>	S(+)	0.41	0.50	1540	0.996	< 0.01
<i>9.0</i>	R(-)	17.12	-5.34	58	0.969	< 0.01
<i>9.0</i>	S(+)	16.13	-6.52	61	0.984	< 0.01

Las muestras preparadas en agua desionizada (pH=5.8) ofrecen unos resultados en sus constantes de estabilidad (M^{-1}) para ambos enantiómeros que se encuentran entre el rango de 200-5000 M^{-1} , por tanto forman unos sistemas bastante estables en los que se mantiene un adecuado equilibrio entre las moléculas del fármaco libre y las que están incluidas en la cavidad de la CD. De acuerdo a Fröming et al¹⁵⁸ al ser las pendientes menores que la unidad se establece que la relación molar es 1:1. Por otro lado para el pH 9.0 las constantes de estabilidad para ambos enantiómeros se pueden considerar bajas, y por tanto las interacciones existentes entre las moléculas del complejo son de una fuerza débil. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en los estudios previos que indicaban alta estabilidad para los complejos formados en agua desionizada, y baja estabilidad para aquellos formados a pH 9.0.

¹⁵⁸ Frömming, K.H., Szejtli, J. Cyclodextrin in Pharmacy. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, (1994).

3.2.2. Diferentes proporciones de polímeros hidrosolubles y/o trietanolamina.

En este capítulo se pretendió estudiar la influencia de los polímeros hidrosolubles (la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), y la polivimilpirrolidona (PVP), el pH del medio alcalinizado mediante la adición de trietanolamina (TEA), en la complejación de los enantiómeros de rac-KP con la HP β CD.

Se consideró como aceptable la proporción de 10% de HP β CD, debido a los estudios realizados en el apartado anterior. Se observa que en ambos medios dicha proporción de 10% ofrecerá un valor intermedio y aceptable de aumento de la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP, a partir del cual comenzaremos a estudiar la influencia de la adición de los polímeros, así como el agente alcalinizante

3.2.2.1. Hidroxipropilmetilcelulosa y/o trietanolamina

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras el ciclo de autoclave de las muestras preparadas con distintas proporciones de HPMC.

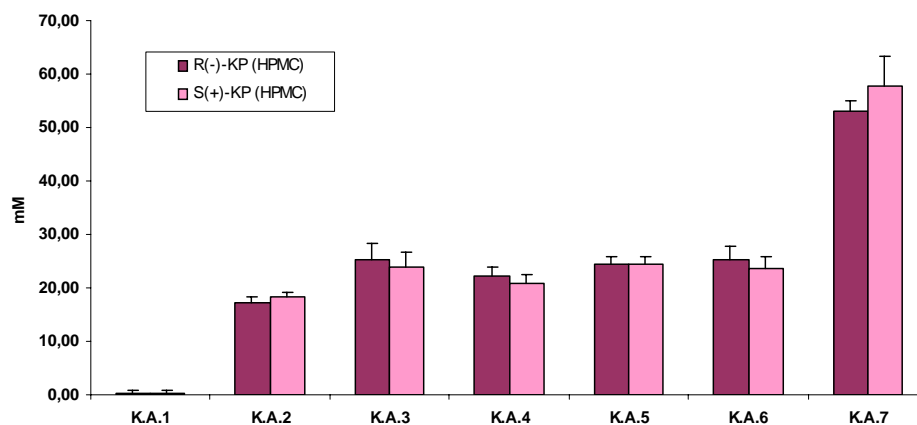


Figura 66. Solubilidad de los enantiómeros de rac-KP con un 10 % HP β CD y diferentes proporciones de HPMC.

Los resultados obtenidos muestran que no existe una influencia de la HPMC en la complejación de los enantiómeros de rac-KP con la HP β CD al 10% y por tanto no aparece un aumento de la solubilidad de éstos con respecto a la muestra que no posee HPMC entre las proporciones 0.05-0.20% (K.A.3-K.A.6). Sin embargo, para la proporción de HPMC de 0.25% (K.A.7), se observa un aumento de la complejación y por tanto de la solubilidad total con respecto al resto de las muestras estudiadas. Por tanto bajo estas condiciones se consigue aumentar la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP utilizando menos cantidad de HP β CD lo que repercutirá a disminuir costes económicos y a su vez disminuir efectos de toxicidad.

El aumento de la solubilidad de fármacos poco solubles en agua, en combinación con la adición de CD y polímeros solubles en agua, en condiciones forzadas de temperatura ha sido estudiado por diversos autores. Por ejemplo, Cappello et al.¹⁵⁹ redujeron la cantidad de HP β CD añadida al medio de 3.5% (w/v) a 0.9% tras la adición de 0.1% de HPMC para conseguir un aumento de la solubilidad de la tropicamida consiguiendo una solubilidad de 1% (w/v). Dicha solubilidad favorable para su administración ocular, resultó paliar los efectos irritantes que provocaba su administración a pH 5.0, por medio del cual se consigue la solubilidad de 1% (w/v).

Por otro lado, teniendo en cuenta que la HPMC es un excipiente quiral se estudió la posible influencia enantioselectiva de ésta durante el proceso de autoclavado, comprobándose la influencia no enantioselectiva de ésta en cuanto al resultado de solubilidad total obtenido para los enantiómeros de rac-KP.

La modificación del pH del medio se produjo tras adicionar 2 gotas la trietanolamina (TEA). El pH entonces se tornó más alcalino favoreciendo de ésta manera la ionización del rac-KP (ácido débil), y por tanto favoreciendo su solubilidad. Tras este proceso se adicionó al medio las mismas proporciones de HPMC (0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25%) a la solución de HP β CD 10%. Los resultados tras el proceso de autoclavado se muestran a continuación:

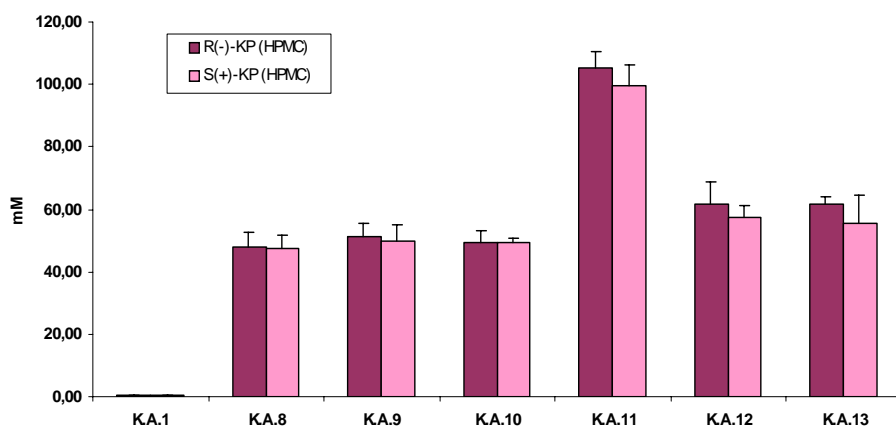


Figura 67. Solubilidad de los enantiómeros de rac-KP con un 10 % HP β CD y diferentes proporciones de HPMC en un medio alcalinizado por la TEA.

Como se puede observar la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP aumenta tras el proceso de autoclavado prácticamente el doble cuando se adiciona la TEA al medio incluso en las muestras que no contienen HPMC. El hecho del aumento de la solubilidad en este caso es como habíamos señalado debido al cambio de pH del medio que se torna como favorable para la solubilidad de moléculas con carácter de ácido débil.

La solubilidad aumenta considerablemente cuando se adiciona un 0.15% de HPMC (aproximadamente 100 mM para cada enantiómero), sin embargo en las muestras que contienen 0.20 y 0.25% se produce un descenso de la solubilidad con respecto a la de 0.15%. Estos resultados coinciden con algunos encontrados en la bibliografía¹⁶⁰ que señalan que a partir de determinadas proporciones de polímeros hidrosolubles adicionados desciende la solubilidad del fármaco.

¹⁵⁹ Cappello, B., Carmignani, C., Iervolino, M., Immacolata La Rotonda, M., Fabrizio Saettone, M. Int. J. Pharm. 1, 213, (1-2), 75.81, (2001).

¹⁶⁰ Loftsson, T., Friðriksdóttir, H., Sigurðardóttir, A.M., Ueda, H. The effect of water-soluble polymers on drug-cyclodextrin complexation. Int. J. Pharm. 110, 169.177, (1994).

De nuevo observamos la posibilidad de aumentar significativamente la solubilidad total de los enantiómeros de rac-KP manteniendo la proporción de 10% HP β CD, mediante el efecto sinérgico provocado por la modificación del pH del medio, así como la adición de la HPMC a una determinada concentración, en este caso de 0.15%. No se observó en ningún caso diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP.

3.2.2.2. Polivinilpirrolidona y/o trietanolamina

Se utilizó otro polímero hidrosoluble, la polivinilpirrolidona (PVP) en distintas proporciones (0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25%), para estudiar la influencia que ésta posee en la complejación de los enantiómeros de rac-KP con la HP β CD 10%. De la misma manera que en el apartado anterior se estudió también la influencia del pH del medio en la solubilidad total y en la facilitación de complejación, tras la adición de 2 gotas de TEA.

En la figura 68 que se muestra a continuación se puede observar los resultados referentes a la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP, en soluciones con una cantidad constante de HP β CD 10%, con distintas proporciones de PVP.

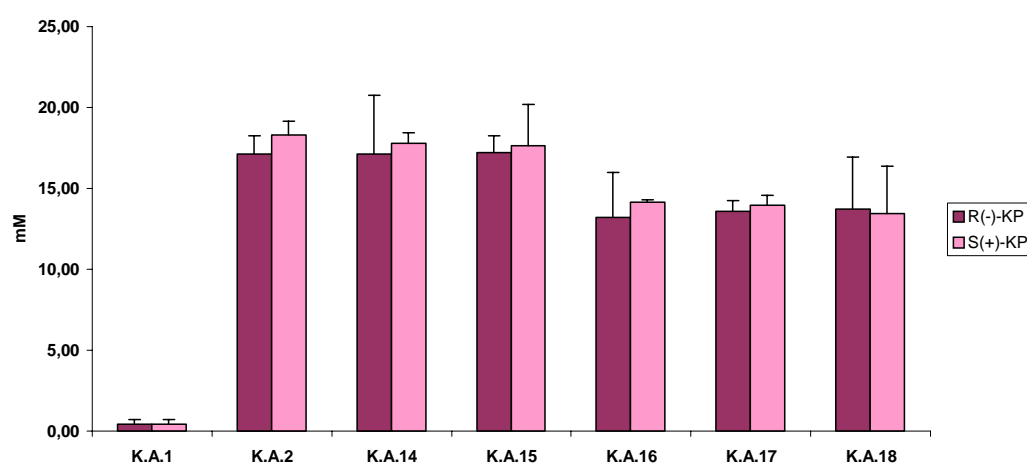


Figura 68. Solubilidad de los enantiómeros de rac-KP con un 10 % HP β CD y diferentes proporciones de PVP.

Como puede observarse la solubilidad del KP, no aumenta al adicionar las diferentes proporciones de PVP, hasta 0.10% (K.A.15). Sin embargo posteriormente, en las concentraciones de 0.15, 0.20 y 0.25% de PVP (K.A.16, K.A.17 y K.A.18), se produce un descenso significativo ($p < 0.01$) de la solubilidad, que como ya habíamos comentado anteriormente ha sido previamente observado por otros autores¹⁶¹. Similares resultados fueron obtenidos para el naproxeno¹⁶² el cual aumento su solubilidad (120 veces) y estabilidad (65%) los complejos formados por medio de la adición a la solución de naproxeno-HP β CD de un 0.1% PVP. Bajo estas circunstancias de trabajo, se observaron también la posible aparición de diferencias enantioselectivas en cuanto a la solubilidad de los enantiómeros. Como se puede observar en la figura 68, no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) en cuanto a la enantioselectividad en la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP.

Posteriormente, y al igual que los estudios realizados previamente con la HPMC, se procedió a alcalinizar el medio para favorecer la solubilidad del rac-KP, con dos gotas de TEA, en las muestras que contienen las diferentes proporciones de PVP (0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25) y la cantidad fija de HP β CD 10%. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

¹⁶¹ Loftsson, T., Friðriksdóttir, H., Sigurðardóttir, A.M., Ueda, H. The effect of water-soluble polymers on drug-cyclodextrin complexation. *Int. J. Pharm.* 110, 169-177, (1994).

¹⁶² Mura, P., Faucci, M.T., Bettinetti, G.P. The influence of polyvinylpyrrolidone on naproxen complexation with hydroxypropylbetacyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13 (2), 187-194, (2001).

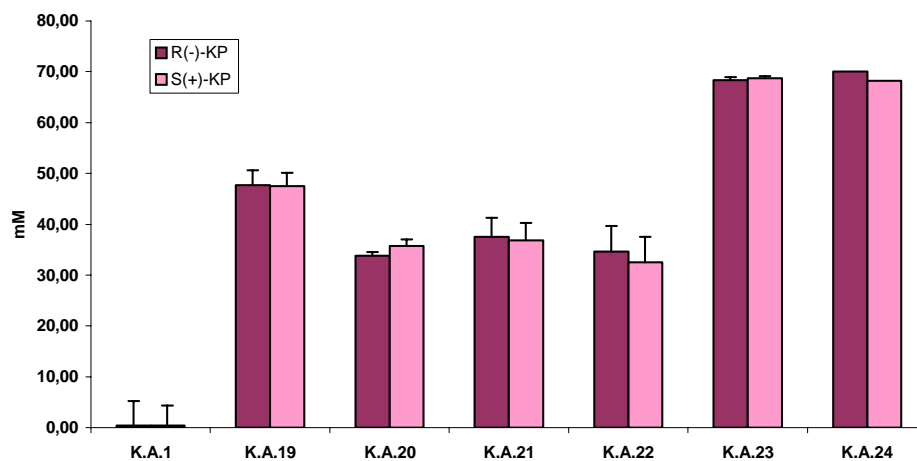


Figura 69. Solubilidad de los enantiómeros de rac-KP con un 10 % HP β CD y diferentes proporciones de PVP en un medio alcalinizado por la TEA.

Como se puede observar la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP, aumentó a partir de una concentración de PVP de 0.20% (K.A.23). A partir de la cual la concentración se mantiene (observar resultados para concentración PVP 0.25% (K.A.24)). En las concentraciones de PVP de 0.05 (K.A.20), 0.10 (K.A.21), 0.15% (K.A.22), éstas no aumentarán la solubilidad respecto a la muestra que no contiene PVP, sino que además el resultado en los tres casos será menor, debido posiblemente a una interferencia negativa entre las CD y la PVP al pH estudiado.

Tampoco se observará en este caso una solubilidad enantioselectiva de los enantiómeros de la forma rac-KP, comportándose ambos y en todos los casos estudiados de la misma manera ($p > 0.05$).

3.2.3. Estudios de solubilidad en autoclave de las distintas formas de KP

Con el fin de observar el comportamiento de las distintas formas de KP bajo estas condiciones de trabajo, se procedió a realizar un estudio con los enantiómeros puros (R(-)-KP y S(+)-KP) y la mezcla física (MF) en proporción 1:1 de ambos enantiómeros puros.

Las muestras del enantiómero R(-)-KP se prepararon de la manera que indica la tabla en el apartado de *Materiales y Métodos*. Las muestras fueron preparadas en proporción de 10% HP β CD y HPMC (0.15%) y/o PVP (0.2%), con la adición al medio de TEA.

3.2.3.1. R(-)-KP puro con HPMC y/o PVP y/o TEA

Las muestras preparadas para realizar este estudio están descritas en el apartado de *Materiales y Métodos*.

Como se puede observar en la figura 70, el R(-)-KP aumenta su solubilidad fundamentalmente cuando se alcaliniza el medio y por tanto se puede encontrar mayor proporción de la forma ionizada. Existen un aumento en la solubilidad de los enantiómeros cuando se adiciona la HP β CD al medio (K.R.2), así como en combinación de ésta con los polímeros hidrosolubles (K.R.3 y K.R.5). Sin embargo el aumento más considerable se produce en el medio en el que se encuentra la TEA (K.R.4 y K.R.6) sobre todo en la muestra que contienen HPMC (K.R.4).

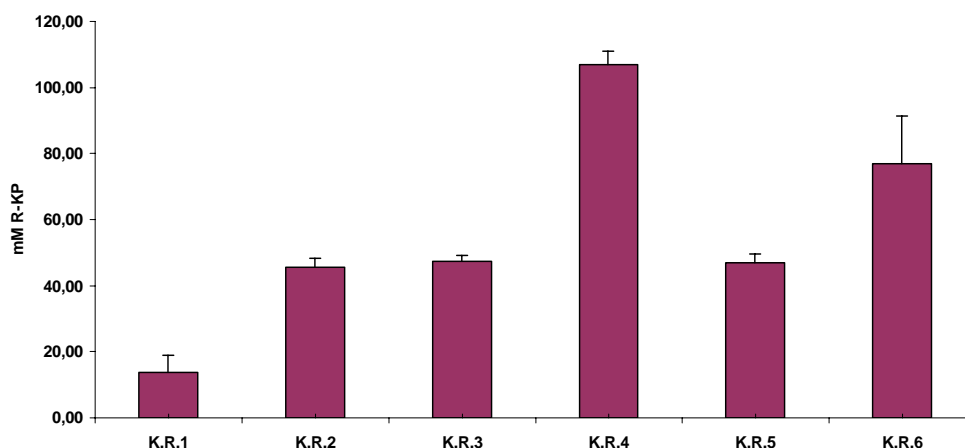


Figura 70. Solubilidad del enantiómero R(-)-KP puro con un 10 % HP β CD y 0.15% HPMC o 0.20% PVP en un medio alcalinizado por la TEA.

3.2.3.2. S(+)-KP puro con HPMC y/o PVP y/o TEA

Las muestras descritas en el presente apartado se encuentran convenientemente descritas en el apartado de *Materiales y Métodos*.

Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos en el apartado anterior correspondiente al enantiómero R(-)-KP puro. Como se puede observar en la figura 71, la solubilidad aumenta cuando la HP- β -CD es adicionada al medio (K.S.2) (aproximadamente 3 veces más). También podemos señalar que la complejación del fármaco S(+)-KP puro por parte de la HP β CD se ve aumentada tras la adición de los polímeros hidrosolubles, la PVP (K.S.5), y la HPMC (K.S.3).

Un mayor aumento de la solubilidad se observó cuando el medio fue alcalinizado con la TEA, en presencia de los polímeros hidrosolubles, la PVP (K.S.4), y la HPMC (K.S.6). El aumento de la solubilidad para este enantiómero puro es aproximadamente igual para los dos casos.

Una vez más encontraremos una mayor solubilidad para el enantiómero S(+)-KP, respecto al R(-)-KP. A pesar de tener las mismas características cristalográficas, de punto de fusión y morfología parece ser que el enantiómero S(+)-KP posee una mayor capacidad de solubilización.

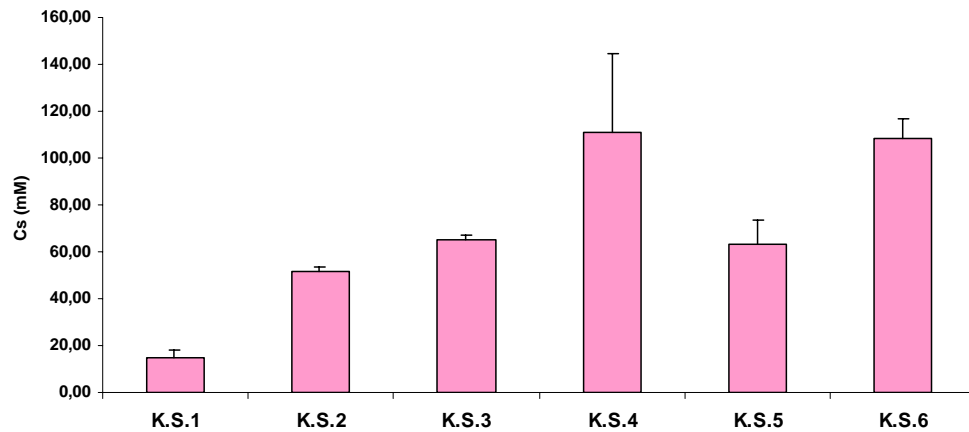


Figura 71. Solubilidad del enantiómero *S(+)*-KP puro con un 10 % HP β CD y 0.15% HPMC o 0.20% PVP en un medio alcalinizado por la TEA.

3.2.3.3. MF (1:1) con HPMC y/o PVP y/o TEA

Las muestras que fueron objeto de estudio en este apartado, y cuyos resultados se comentan a continuación, son detalladamente descritos en el apartado de *Materiales y Métodos*

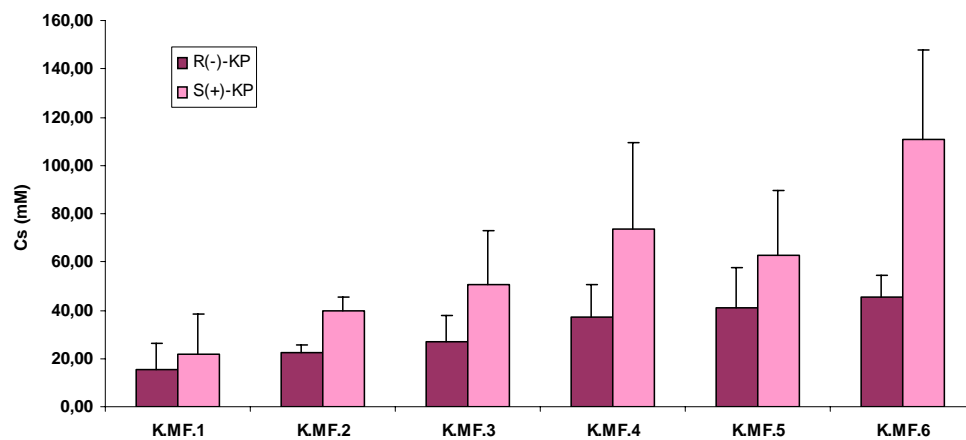


Figura 72. Solubilidad de los enantiómeros *R(-)*-KP y *S(+)*-KP de la MF (1:1) con un 10 % HP β CD y 0.15% HPMC o 0.20% PVP en un medio alcalinizado por la TEA.

A la vista de los resultados obtenidos y mostrados en la figura 72, la solubilidad de los enantiómeros R(-) y S(+)-KP que forman la mezcla física (1:1), se ve aumentada, en todos los casos, incluso en el medio tan sólo con agua destilada (pH 5.8) (K.MF.1). este hecho puede ser debido a la condiciones forzadas de presión y temperatura utilizadas, que facilitan la solubilidad de los enantiómeros (observar resultados obtenidos en baño a 37°C de la MF (1:1) en agua destilada (figura 56)).

La solubilidad aumenta cuando se añaden a la solución la HP β CD 10% (K.MF.2). Por otro lado la adición a la solución que posee HP β CD 10% de los polímeros hidrosolubles provoca un ligero aunque estadísticamente significativo ($p < 0.05$) aumento de la complejación con la HP β CD que se refleja en un aumento de la solubilidad, tanto cuando la HPMC (K.MF.3) como cuando la PVP (K.MF.5) es adicionada al medio, siendo de las dos mayor el aumento registrado cuando la PVP es adicionada al medio.

Nuevamente, observamos la importancia que ejerce el pH en la solubilización de los enantiómeros de MF-KP. Por tanto, se registra un aumento en la solubilidad de los enantiómeros de la MF (1:1) cuando la TEA es adicionada al medio que contiene la HP β CD 10% y la HPMC (K.MF.4) o la PVP (K.MF.6), siendo de nuevo la solubilidad registrada significativamente ($p < 0.01$) mayor cuando el polímero PVP está presente en el medio.

4. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA INTERNA DE RICOBENDAZOL RACÉMICO.

Los resultados mostrados en la determinación del punto de fusión y la cristalinidad, tanto por la técnica de difracción de rayos X como por la microscopía electrónica de barrido, para el Ricobendazol (RBZ) fueron los resultantes del análisis que se realizó sobre la muestra racémica (rac-RBZ). Esto se debe a que no existe, hasta el momento, la posibilidad de conseguir en cantidad suficiente los enantiómeros puros (-)-RBZ y (+)-RBZ.

4.1.PUNTO DE FUSIÓN.

Se determinó el punto de fusión de rac-RBZ siguiendo el método descrito en el apartado de *Materiales y Métodos* (Sistema de determinación tipo capilar B-450 y análisis térmico diferencial).

El punto de fusión obtenido para la muestra de rac-RBZ analizada con el aparato de determinación de punto de fusión (Sistema B-450) fue 75°C. El punto de fusión de la muestra de rac-RBZ, analizado por análisis térmico diferencial (DSC) fue 75°C (figura 73). Como se puede observar por ambos métodos obtenemos, aproximadamente, el mismo punto de fusión para la muestra de rac-RBZ.

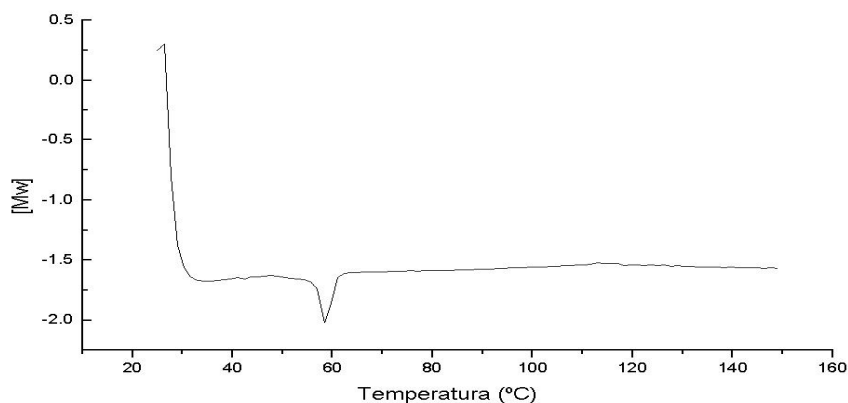


Figura 73. Curva DSC obtenidas para la muestra de rac-RBZ.

El-Arini et al.¹⁶³ estudiaron el punto de fusión para la forma racémica y los enantiómeros de otro fármaco perteneciente a la familia de los bencimidazol carbamatos con propiedades antihelmínticas, el praziquantel, encontrándose puntos de fusión menores en los enantiómeros respecto a la forma racémica que se refleja en una mayor solubilidad de éstos. Como ya hemos aclarado anteriormente no existió la posibilidad de trabajar con los enantiómeros de RBZ.

4.2. CRISTALINIDAD.

La muestra analizada para observar la cristalinidad del principio activo fue, de nuevo tan solo, la correspondiente a la forma racémica puro del mismo (rac-RBZ). La figura 74 muestra el

¹⁶³ El-Arini, S.K., Giron, D., Leuenberger, H. Solubility properties of praziquantel and its enantiomers. *Pharm Dev. Technol.* 3(4), 557-564, (1998).

difractograma obtenido para la muestra de rac-RBZ con el sistema Philips X'Pert-MPD (CAI, Difracción Rayos X, UCM).

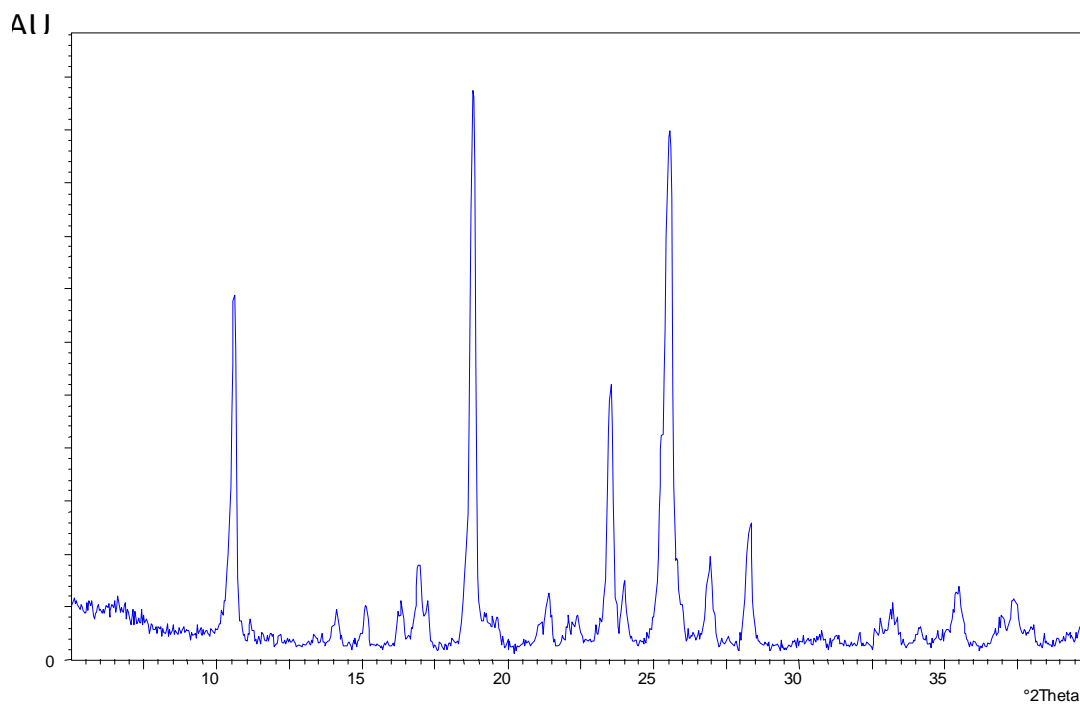


Figura 74. Difractograma de la muestra de rac-RBZ.

A la vista de los resultados obtenidos para observar la cristalografía de la forma rac-RBZ, se comprueba que corresponde a un perfil característicamente cristalino con la aparición en el difractograma de picos agudos.

También se realizó un estudio morfológico de la muestra de rac-RBZ a través de la técnica de microscopía diferencial de barrido (CAI, Microscopía Electrónica, UCM). La fotografía realizada se muestra a continuación:

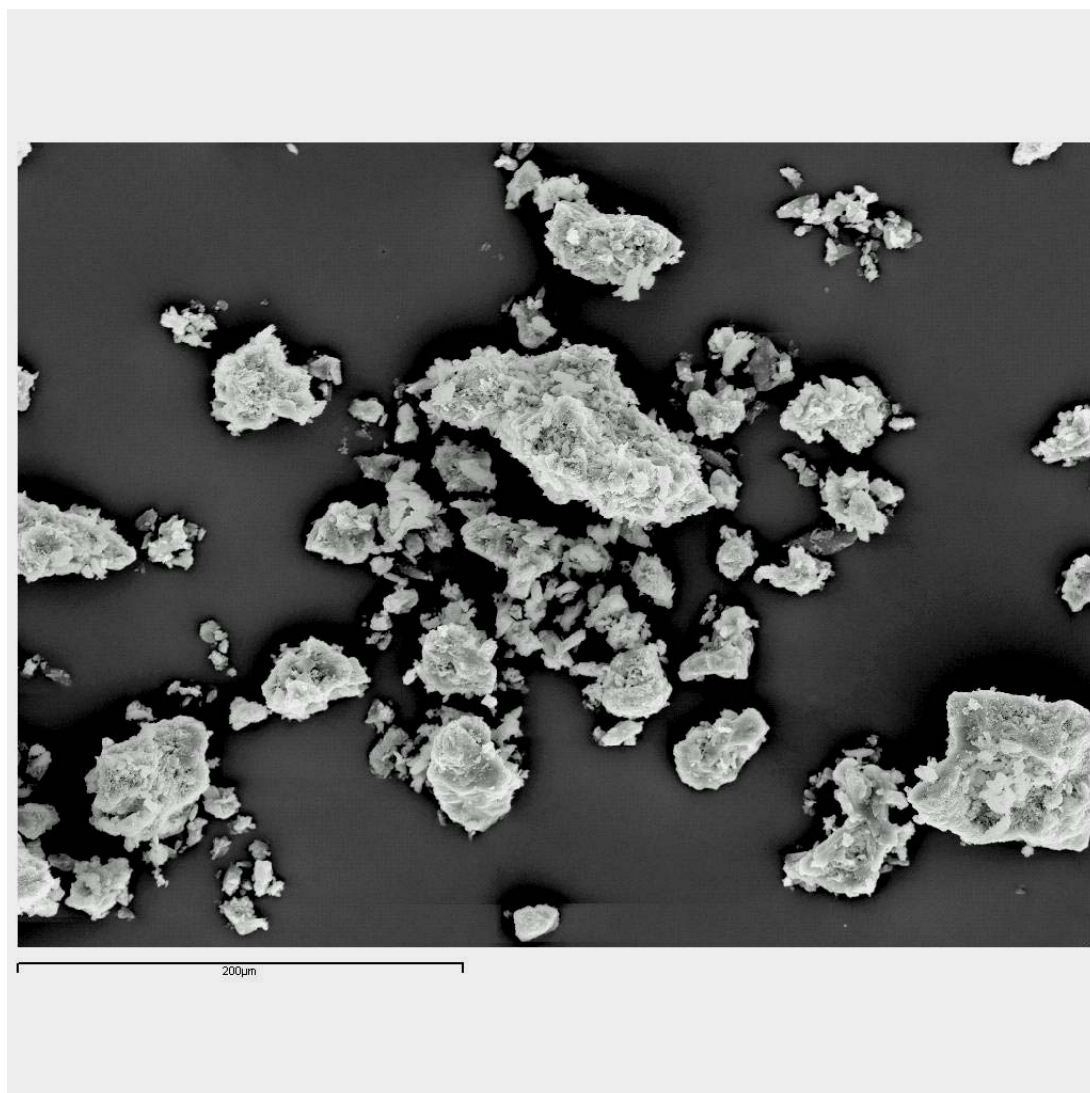


Figura 75. Rac-RBZ

Los cristales de la muestra de rac-RBZ son irregulares, y de múltiples tamaños, como se puede observar en la figura 75.

5. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE RICOBENDAZOL RACÉMICO.

Para los distintos estudios de solubilidad se utilizarán las diferentes muestras preparadas y descritas en el apartado de *Materiales y Métodos*, tanto en el baño de agitación a 37°C así como tras un ciclo en el autoclave a 120°C durante 20 minutos y presión de 1 atmósfera.

Como ya se comentó previamente, todos los ensayos con el RBZ fueron realizados con la forma racémica. Por tanto los resultados que se presentan a continuación se refieren siempre a los enantiómeros, (-)-RBZ y (+)-RBZ que pertenecen a dicha muestra racémica pura (rac-RBZ).

El rac-RBZ se trata de una molécula de carácter base débil, poco soluble en agua. Por tanto estudiaremos la solubilidad que poseen sus enantiómeros en distintas condiciones. Tanto en soluciones que contengan diferentes pH's así como diferentes tipos de CD, con o sin polímeros hidrosolubles (HPMC o PVP), excipientes que como ya se ha comentado repetidamente ayudan a facilitar la formación de complejos, ayudando, por lo tanto a aumentar la solubilidad. Para facilitar la solubilidad de rac-RBZ, en determinadas fases del estudio, se añadirán acidificantes del pH del medio. Dichos acidificantes serán, el ácido cítrico (50 mM) y el ácido tartárico (50 mM).

5.1. BAÑO DE AGITACIÓN A 37°C

Se determinó la solubilidad de los enantiómeros (-)-RBZ y (+)-RBZ de la forma rac-RBZ, a distintos pH's (9.0, 7.0, 6.5, 5.5, 4.5, 3.5, 2.0 y agua desionizada (5.8)) así como con diferentes tipos de CD (β -CD, HP β CD y γ -CD). Posteriormente se seleccionó la HP β CD al 10%, ya que como se ha explicado anteriormente esta CD posee una elevada solubilidad en agua, y además también se tuvo en cuenta la presencia de carbonos asimétricos en su estructura, que le otorgan, por tanto, propiedades quirales. De esta manera, se observaron las posibles interacciones entre fármaco-excipiente, y la posible enantioselectividad que se derive de ellas.

5.1.1. Distintos pH's.

Los primeros ensayos realizados corresponden a la determinación de la solubilidad de los enantiómeros de RBZ, (-) y (+)-RBZ, a diferentes pH's. Los resultados obtenidos en cada caso se muestran en la tabla 63 descrita a continuación:

Tabla 63. Cs (mM) de (-)-RBZ y (+)-RBZ de la muestra de rac-RBZ estudiados a distintos pH's.

<i>pH</i>	<i>(-)-RBZ</i> ± <i>SD</i>	<i>(+)-RBZ</i> ± <i>SD</i>
9.0	0.400 ± 0.023	0.409 ± 0.019
7.0	0.120± 0.003	0.122 ± 0.006
6.5	0.124 ± 0.010	0.123 ± 0.008
5.8	0.124 ± 0.011	0.126 ± 0.020
5.5	0.137 ± 0.012	0.133 ± 0.017
4.5	0.169 ± 0.016	0.170 ± 0.023
3.0	0.470 ± 0.036	0.468 ± 0.026
2.0	4.640 ± 0.058	4.610 ± 0.084

Como se puede observar en la tabla 63 la solubilidad de los enantiómeros, (-)-RBZ y (+)-RBZ, depende directamente del pH de la solución en la que se encuentre, y según los pK_a que posee la molécula (0.20 y 9.79). Debido a este hecho, el RBZ al ser una base débil que posee estos dos pK_a, a

pH básico (en nuestro estudio véase pH 9.0) se encontró parte de ella en su forma ionizada, de ahí mayor solubilidad que a pH menores (obsérvese en la tabla pH 7.0, 6.5, 5.5 y 4.5). Se observó también un aumento de su solubilidad a partir de pH 3.0, siendo mucho más importante el aumento de su solubilidad a pH 2.0, debido a como ya hemos comentado anteriormente la ionización que se produce en la molécula.

No se encontraron diferencias significativas en la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ, a ninguno de los pH's estudiados.

5.1.2. Distintos tipos de ciclodextrinas (β -CD, HP- β -CD y γ -CD)

Se utilizaron las mismas CD y en la misma proporción (10%), que para el KP, para realizar el análisis de solubilidad en medio acuoso (agua desionizada) de los enantiómeros, (-)-RBZ y (+)-RBZ, de rac-RBZ. De nuevo, para este fármaco, adicionamos al medio los polímeros hidrosolubles (HPMC y PVP) y se observó su implicación en la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ como agentes solubilizantes. También se observó la influencia que ejercían en la formación de los complejos cuando se adicionaron al medio que poseía las CD, en las condiciones utilizadas, baño de agitación a 37°C. Este hecho se estudiará más en profundidad posteriormente, cuando utilicemos el método descrito en la bibliografía por Loftsson et al.¹⁶⁴, el cual implica a los polímeros hidrosolubles como agentes importantes en la formación de complejos de fármacos poco solubles en agua con las CD a presiones y temperaturas forzadas, mediante ciclos en un autoclave. Teniendo en cuenta que la HPMC posee a su vez carbonos quirales en su estructura se estudió la posible influencia de éste hecho en la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ.

También se utilizará la influencia del pH del medio en la solubilidad de los enantiómeros. Para ello, y teniendo en cuenta las características de ácido débil de rac-RBZ, se eligieron dos ácidos orgánicos, ácido cítrico y ácido tartárico, que también han sido descritos y utilizados en la bibliografía¹⁶⁵ para provocar aumentos en la solubilidad de fármacos poco solubles en agua. El ácido tartárico a su vez posee, un centro de asimetría lo que le conferirá propiedades quirales, que permitieron observar la posible aparición de diferencias enantioselectivas en la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ.

¹⁶⁴ Loftsson, T. Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug bioavailability though addition of water-soluble polymers. Pharmazie, 53 (11), 733-740, (1998)

En las gráficas que muestran los resultados correspondientes a las CD estudiadas (figura 78, 79 y 80) se han incluido también los resultados correspondientes a los resultados obtenidos para los enantiómeros de rac-RBZ en las distintas condiciones (con los polímeros hidrosolubles, los ácidos orgánicos) en un medio acuoso (agua desionizada) sin la adición de la CD correspondiente en cada caso.

5.1.2.1. HP β CD

En la figura 76 se presentan los resultados de solubilidad obtenidos para los enantiómeros de RBZ, (-)-RBZ y (+)-RBZ, en las distintas condiciones utilizadas. Las muestras utilizadas se encuentran perfectamente descritas en el apartado destinado a los *Materiales y Métodos* utilizados.

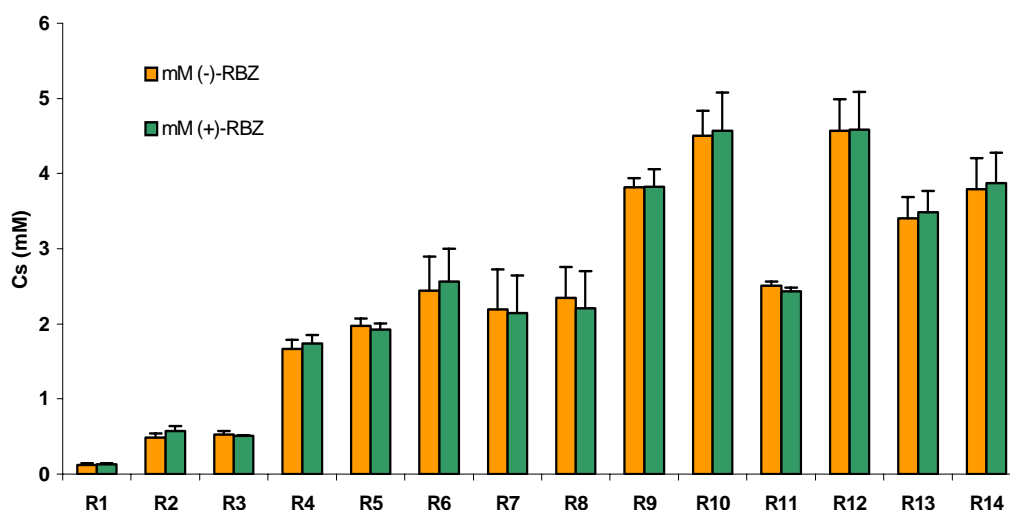


Figura 76. Cs (mM) de (-)-RBZ y (+)-RBZ en presencia de HPMC o PVP, ácido cítrico (50mM) o ácido tartárico (50 mM) en presencia o ausencia de HP β CD 10%.

Como se puede observar en la figura 76, los enantiómeros de RBZ, aumentaron su solubilidad, ligeramente tras la adición de polímeros hidrosolubles, HPMC (R2) y PVP (R3) (aproximadamente 4 veces) y como es lógico con mayor trascendencia cuando el pH del medio fue acidificado (pH 2.3 en ambos fármacos) mediante la adición de los ácidos orgánicos, ácido cítrico (R4) (aproximadamente 13 veces) y ácido tartárico (R5) (aproximadamente 15 veces).

¹⁶⁵ Piel, G., Evrard, B., Van Hees, T., Llabres, G., Delattre, L. Development of a parenteral and of an oral formulation of albendazole with cyclodextrins. S.T.P.Pharma Sci. 9 (8), 257-260, (1999).

La adición de la HP β CD 10%, (R6) provocó un aumento en la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ, aproximadamente del mismo orden que el provocado por la acidificación del medio (R4 y R5).

Para observar la influencia que ejercen los polímeros hidrosolubles en la complejación de los enantiómeros de rac-RBZ por la HP β CD 10% se prepararon las muestras R7 y R8, adicionando al medio HPMC 0.25% y PVP 0.25% respectivamente. A la vista de los resultados mostrados, los enantiómeros de rac-RBZ mostraron una solubilidad ligeramente inferior a aquella mostrada para la muestra que no los contiene (R6). Este hecho muestra la aparición de una interacción negativa de los polímeros hidrosolubles que explica dicha disminución en la solubilidad, con respecto a los resultados obtenidos cuando la solución tan sólo contenía la solución de HP β CD 10%.

La adición de los ácidos orgánicos, cítrico (R9) o tartárico (R10) (50 mM) al medio provocó un cambio en el pH del medio tornándolo ácido (aproximadamente 2.5). Este cambio se refleja en el aumento de solubilidad registrado para los enantiómeros de rac-RBZ en dicho medio. Como se puede observar la mejor solubilidad se registró cuando el ácido tartárico fue adicionado.

Las combinaciones de los polímeros con los ácidos orgánicos también se ve reflejada en la figura 78. Como se puede apreciar, la combinación de la PVP (0.25%) con el ácido tartárico en presencia de la HP β CD 10% (R12), presentó la mejor solubilidad. La adición de la PVP no parece ser limitante para el aumento en la solubilidad que se produce, debido a que la solubilidad se presenta prácticamente igual que la obtenida cuando la combinación se produce tan solo entre el ácido tartárico (50mM) y la HP β CD 10%.

Para el resto de las combinaciones, HPMC 0.25% y ácido tartárico (50 mM) (R11), PVP (0.25%) y ácido tartárico (50mM) (R12), HPMC (0.25%) y ácido cítrico (50 mM) (R13), PVP (0.25%) y ácido cítrico (50 mM) (R14) encontramos de nuevo una interacción negativa, mencionada con anterioridad, en cuanto a la solubilidad total de los enantiómeros de los polímeros en un medio con HP β CD. Dicha disminución es de carácter estadísticamente significativo ($p < 0.05$), siendo la combinación HPMC (0.25%) y el ácido tartárico (50 mM), la que ofreció los resultados menores, de lo que se deduce que la interacción fue la más fuerte.

Por otro lado, teniendo en cuenta la presencia de carbonos asimétricos en la HPMC, el ácido tartárico y en la HP β CD, se observó la posible aparición de diastereoisómeros en el medio que pudiesen ofrecer diferencias enantioselectivas en cuanto a la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ. Como se puede observar, en ninguno de los casos estudiados aparecieron dichas diferencias ($p > 0.05$).

5.1.2.2. β -CD

Las muestras utilizadas en este apartado son detalladamente descritas en el apartado de *Materiales y Métodos*. La figura 79 muestra los resultados obtenidos:

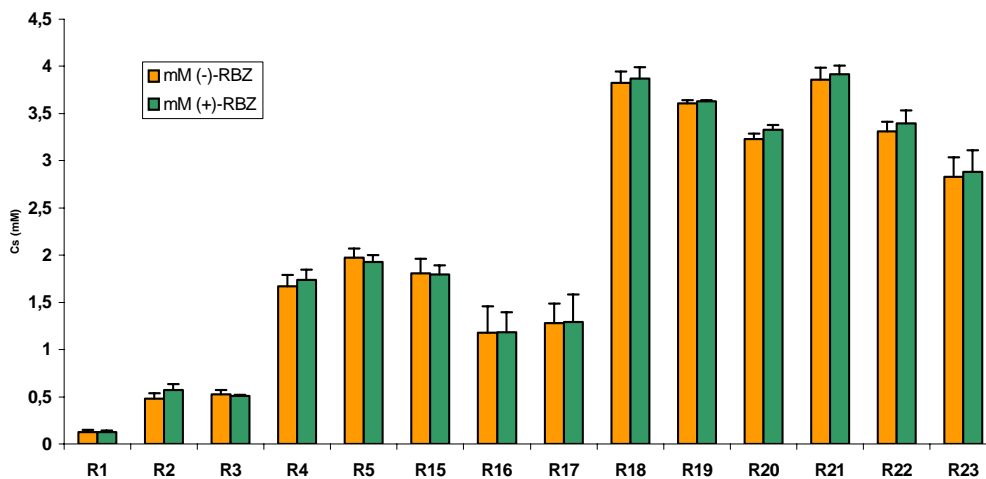


Figura 77. mM de (-)-RBZ y (+)-RBZ solubilizados en presencia de HPMC o PVP, ácido cítrico (50mM) o ácido tartárico (50 mM) en presencia o ausencia de β -CD 10%.

Como se puede observar en la figura 77, la solubilidad en agua de los enantiómeros de RBZ (R1), (-)-RBZ y (+)-RBZ se vió aumentada cuando la β -CD 10% fue adicionada al medio (R15). Sin embargo, el resultado de solubilidad de los enantiómeros en este medio que contiene β -CD 10% es aproximadamente igual al obtenido cuando se modifica el pH del medio, tras la adición del ácido cítrico (R4) y ligeramente inferior tras la adición de ácido tartárico (R5).

Se adicionaron los polímeros hidrosolubles al medio que contiene β -CD 10%, para observar la influencia que ejercen estos agentes solubilizantes β -CD en la mejor a de la complejación de los enantiómeros de RBZ en la cavidad hidrófoba de la β -CD. De nuevo en este caso se observó un descenso en la solubilidad de los enantiómeros de RBZ, en ambos polímeros, HPMC (R16) y PVP (R17), debido a la interferencia que se produce entre la β -CD-polímero que no favorece la complejación en estas condiciones y que por tanto disminuye la solubilidad.

Tras añadir los ácidos orgánicos al medio que contiene el exceso de rac-RBZ en una solución β -CD 10%, se modificó el pH del medio tornándose ácido (pH 2.5 aprox.), y por tanto se favoreció la aparición mayoritaria del los enantiómeros de RBZ en su forma ionizada, y por tanto más soluble. De esta manera se ve una interacción positiva, debido al aumento significativo ($p < 0.01$) en la solubilidad de los enantiómeros de RBZ en el medio que contiene el ácido cítrico (R18) y ácido tartárico (R19) en la solución β -CD 10%.

Por otro lado las distintas combinaciones realizadas entre los polímeros y los ácidos orgánicos, para estudiar las posibles interacciones producidas y su reflejo en la solubilidad, se muestran también en la figura 80, HPMC (0.25%) y ácido tartárico (50 mM) (R20), PVP (0.25%) y ácido tartárico (50 mM) (R21), HPMC (0.25%) y ácido cítrico (50 mM) (R22) y PVP (0.25%) y ácido cítrico (50 mM) (R23).

Como se puede observar en la figura 79, no existe un aumento de la solubilidad de los enantiómeros de RBZ, en ninguna de las combinaciones propuestas. Sin embargo, en las combinaciones R20, R22 y R23, se observa una disminución de la solubilidad, por tanto podemos hablar de una interacción negativa provocada por la presencia de los polímeros hidrosolubles (PVP o HPMC). Sin embargo en la muestra denominada R21, PVP 0.25% y ácido tartárico (50mM), no se observa dicha interacción de la PVP, y tampoco un aumento de la solubilidad con respecto a la muestra que tan sólo posee el ácido tartárico (50 mM) en presencia de β -CD 10%.

Además, la β -CD no posee carbonos quirales en su estructura, pero si otros de los excipientes utilizados, por ejemplo la HPMC y el ácido tartárico. Las diferentes combinaciones serían susceptibles de formar compuestos diastereoisómeros que diesen lugar a diferencias enantioselectivas de algún tipo en los resultados. Sin embargo, y en base a los resultados obtenidos, no se observó en ningún caso diferencias enantioselectivas para la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ ($p > 0.05$).

5.1.2.3. γ -CD

Las muestras preparadas, para hacer los estudios en este apartado son descritas en el apartado destinado a los *Materiales y Métodos*. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 78.

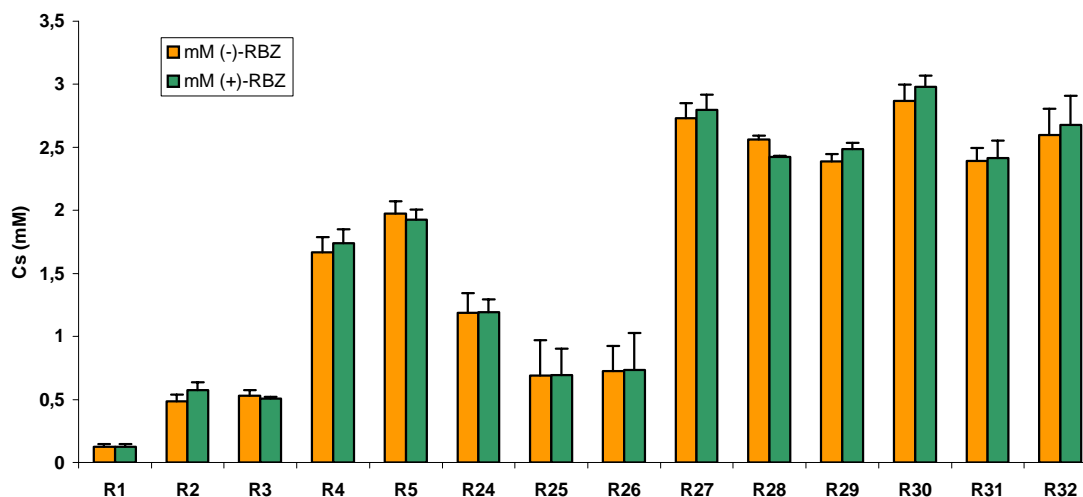


Figura 78. mM de (-)-RBZ y (+)-RBZ solubilizados en presencia de HPMC o PVP, ácido cítrico (50mM) o ácido tartárico (50 mM) en presencia o ausencia de γ -CD 10%.

A la vista de los resultados obtenidos, observamos que la γ -CD ofrece los menores resultados de solubilidad para los enantiómeros de RBZ de las tres CD utilizadas. Observamos también que los resultados obtenidos para la solubilidad de éstos es menor en presencia de la solución de γ -CD 10% (R24) que aquella que nos encontramos en el medio acidificado por los ácidos orgánicos (R4 y R5).

La combinación de dicha CD, γ -CD, con los polímeros hidrosolubles, originó una disminución en la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ, debida a una interacción negativa de los polímeros hidrosolubles, HPMC (R25) o PVP (R26) con la γ -CD. Este hecho ya ha sido observado en todos los casos anteriormente descritos cuando otras CD fueron utilizadas.

Una interacción positiva para el aumento de solubilidad, fue encontrada de nuevo, cuando los ácidos orgánicos, ácido cítrico (R27) y ácido tartárico (R28), son adicionados a la solución que contiene γ -CD 10%, registrándose un aumento en la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ, debido al cambio de pH que se produce en el medio (aprox. pH 2.5).

La combinación de los polímeros hidrosolubles con los ácidos orgánicos, HPMC (0.25%) y ácido tartárico (50 mM) (R29), PVP (0.25%) y ácido tartárico (50 mM) (R30), HPMC (0.25%) y ácido cítrico (50 mM) (R31) y PVP (0.25%) y ácido cítrico (50 mM) (R32), ofreció el mismo resultado que el observado anteriormente con las otras dos CD estudiadas. De esta manera, se ve una interferencia ejercida por los polímeros sobre todo en las muestras R29 y R31.

La γ -CD no posee carbonos asimétricos en su estructura, sin embargo otros de los excipientes estudiados si poseen dichas características. Por ejemplo, la HPMC y el ácido tartárico, lo que podría dar origen a la formación de compuestos diastereoisómeros con los enantiómeros de rac-RBZ, y por tanto a la aparición de una cierta enantioselectividad en la solubilidad. Tras un estudio detallado de los resultados, concluimos que no existían diferencias enantioselectivas en cuanto a la solubilidad de los enantiómeros ($p>0.05$).

Como se puede observar en los resultados obtenidos con todos los tipos de CD estudiados se aprecia una influencia de los polímeros hidrosolubles (HPMC y PVP) en la acomplejación de RBZ por la CD, traducándose este hecho en un aumento de la solubilidad, respecto a aquellas muestras que no contienen el polímeros. Este hecho coincide con los resultados obtenidos por Aggarwal et al.¹⁶⁶

¹⁶⁶ Aggarwal S, Singh PN, Mishra B. Studies on solubility and hypoglycemic activity of gliclazide beta-cyclodextrin-hydroxypropylmethylcellulose complexes. *Pharmazie* 57(3), 191-193, (2002).

5.2. ENSAYOS DE SOLUBILIDAD EN EL AUTOCLAVE

5.2.1. Diferentes proporciones de HP β CD

Continuando con los ensayos de solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ utilizaremos el método propuesto por Loftsson¹⁶⁷, para fármacos poco solubles en agua, por medio del cual estudiamos la complejación de los enantiómeros de rac-RBZ y la HP- β -CD en diferentes proporciones (5, 10, 15, 20, 25%), tanto en agua desionizada (pH 5.8), como pH 1.2 que se considera óptimo para favorecer la solubilización de RBZ, y a pH 9.0, que coincide con uno de sus pK_a. Se prepararon las soluciones de la manera convenientemente descrita en el apartado dedicado a los *Materiales y Métodos*. Posteriormente los viales fueron incluidos, convenientemente sellados en el autoclave, y se procedió a realizar un ciclo durante 20 minutos a una temperatura de 120°C, y la presión registrada en el barómetro fue de 1 atmósfera. Una vez terminado el ciclo, las muestras se dejaron enfriar fuera del autoclave, esperándose 1 hora y 30 minutos, para su conveniente estabilización. Posteriormente, se procedió a filtrar y diluir las muestras para su análisis por HPLC.

5.2.1.1. Agua desionizada (pH 5.8)

Los resultados obtenidos para las muestras preparadas en agua desionizada (pH 5.8) se muestran a continuación:

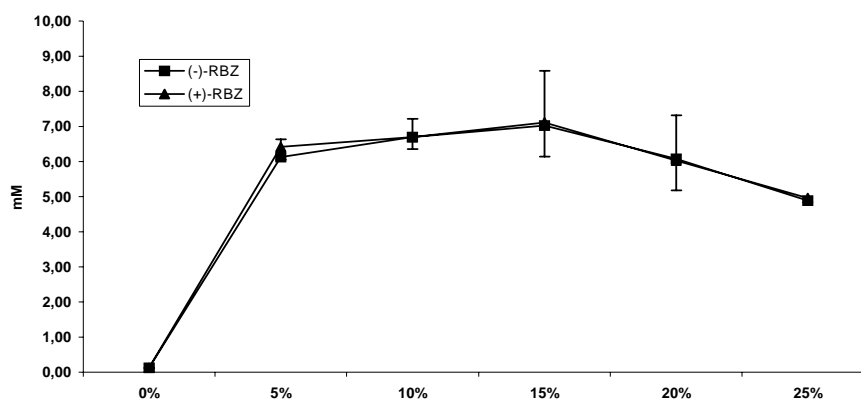


Figura 79. Diagrama de solubilidad de los enantiómeros de RBZ en presencia de HP- β -CD en agua desionizada (pH 5.8) a 120 °C y 1 atmósfera durante 20 minutos.

¹⁶⁷ Loftsson, T., Másson, M., Sigurjónsdóttir, J.F. Methods to enhance the complexation efficiency of cyclodextrins. S.T.P.Pharm. Sci. 9(3), 237-242, (1999).

Como se puede observar en la figura no se produce aumento lineal ($p > 0.05$) en la solubilidad de los enantiómeros de RBZ en este medio. Se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) en la solubilidad de los enantiómeros cuando se adiciona al medio HP β CD 5%, sin embargo si se incrementa la proporción de HP β CD en el medio no aumenta significativa y linealmente la solubilidad, hasta que a una concentración de 20% ésta comienza a disminuir. El perfil que adopta será tipo B, según Higuchi et al.¹⁶⁸. A la vista de los resultados encontrados podremos decir que no se encontraron diferencias enantioselectivas ($p > 0.05$) para los enantiómeros de RBZ y el excipiente con propiedades quirales utilizado, la HP β CD.

5.2.1.2. pH 1.2

Los resultados obtenidos para la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ, tras un ciclo en autoclave en medio ácido (pH 1.2) y en diferentes proporciones de HP β CD se muestran en la figura 80.

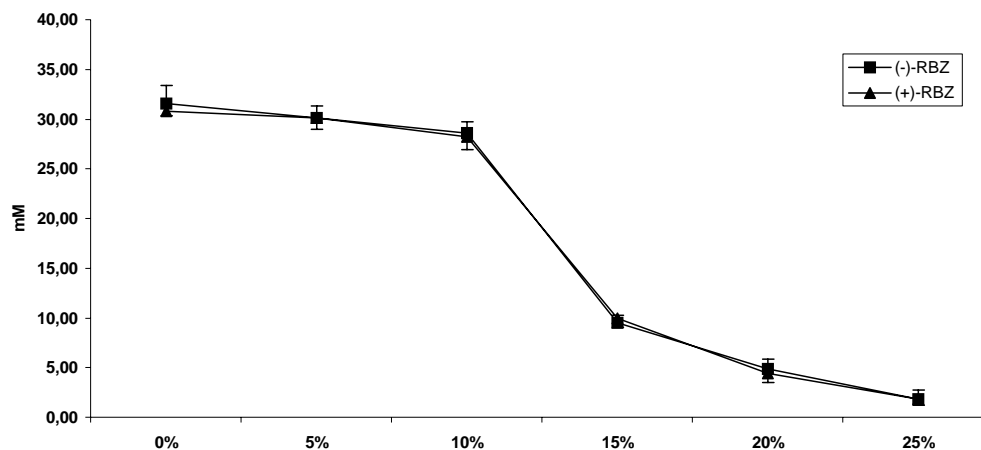


Figura 80. Diagrama de solubilidad de los enantiómeros de RBZ en presencia de HP β CD en agua desionizada (pH 1.2) a 120 °C y 1 atmósfera durante 20 minutos.

A la vista de los resultados obtenidos la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ se ve influida por diversos factores. Entre ellos, temperatura y tiempo de duración del ciclo, pH del medio y por la presencia de HP β CD. Este último factor se puede observar claramente en la figura 82. La solubilidad obtenida en ausencia de HP β CD, ofrece el mayor valor, produciéndose un ligero descenso

¹⁶⁸ Higuchi, T., Connors, K.A. Phase solubility techniques. Adv. Anal. Chem. Instrum. 4, 117, 212, (1965).

de la misma en las muestras que contienen 5 y 10%. Dicho descenso se hace evidente a partir de la proporción de 15% HP β CD. Se observa una influencia importante del pH del medio con la temperatura de 120 °C, en la estabilidad de los enantiómeros de RBZ. La estabilidad de la molécula en dichas condiciones ha sido previamente descrita en la bibliografía¹⁶⁹ para otro fármaco de la familia de los benzimidazol carbamatos, el mebendazol. Sin embargo, en dicho estudio la HP β CD sólo fue estudiada en proporción de 10%, observándose que en dicha proporción, ésta incluso ejercía un efecto protector con respecto a otras condiciones estudiadas que no poseían la HP β CD (polímeros hidrosolubles y ácidos orgánicos). Dichas condiciones serán descritas para los enantiómeros de rac-RBZ posteriormente.

Tabla 64. Parámetros de los enantiómeros de RBZ determinados a partir de los diagramas de solubilidad a pH 1.2, en presencia de distintas proporciones de HP β CD, tras un ciclo en el autoclave a 120°C y 1 atmósfera.

RBZ	S _o exp. (mM)	S _o graf. (mM)	Kc (M ⁻¹)	r	P
(-)-RBZ	31.57	26.77	----	-0.950	>0.1
(+)-RBZ	30.81	26.86	----	-0.950	>0.1

A la vista de los resultados obtenidos podemos hablar de una no linealidad evidente en cuanto a la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ en cantidades crecientes de HP β CD. El perfil obtenido no coincide con ninguno de los descritos por Higuchi et al.¹⁷⁰

La solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ se ve aumentada en presencia del medio ácido y en ausencia de la HP β CD, debido a que se produce la ionización del fármaco a este pH, y por tanto se favorece la solubilidad de la molécula ionizada.

¹⁶⁹ Álvarez, C., Van Hees, T., Piel, G., Liégeois, J.-F., Delattre, L., Evrard, B. Preparation of mebendazole HP- β cyclodextrin complexes using water-soluble polymers and organic acids. STP Pharm Sci. 11 (6), 439-442, (2001).

¹⁷⁰ Higuchi, T., Connors, K.A. Phase solubility techniques. Adv. Anal. Chem. Instrum. 4, 117, 212, (1965)

Se comparan de nuevo los resultados, con aquellos obtenidos por Calero¹⁷¹ el cual estudia la solubilidad de los enantiómeros de RBZ a pH 1.2, en presencia de distintas concentraciones de HPβCD. Los resultados obtenidos ofrecían un ligero aumento lineal en la solubilidad de los enantiómeros, clasificándose el diagrama obtenido de tipo A_L según Higuchi et al.¹⁷². Sin embargo, a una concentración de 125 mM de la CD se observó un descenso en la solubilidad de ambos enantiómeros. Se consideró como probable la formación de un complejo que comenzaría a precipitar reduciéndose entonces la solubilidad. En nuestro caso, dicho descenso en la solubilidad de los enantiómeros lo explicamos debido al efecto sinérgico negativo que produce en la estabilidad del fármaco, la temperatura y tiempo de duración del ciclo, el pH agresivo del medio y la presencia de la HPβCD.

Asimismo, las constantes de formación de los complejos de RBZ-HPβCD obtenidas a 37°C fueron extremadamente pequeñas, y por tanto, se consideró la interacción entre el RBZ y la cavidad hidrófoba de la HPβCD relativamente débil. En nuestro caso, ni siquiera pudieron calcularse, lo que nos indica también unos complejos, si los hubiese, de carácter muy débil, debiéndose de aprovechar la solubilidad que provoca el medio ácido tan sólo en las moléculas de carácter base débil. Siendo incluso en este caso perjudicial el uso de la HPβCD por no ofrecer ventaja alguna, incluso, la gran desventaja de actuar como catalizador en la degradación de RBZ.

No se encuentran diferencias enantioselectivas en la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ a lo largo del estudio ($p > 0.05$).

5.2.1.3. pH 9.0

Los resultados obtenidos para la solubilidad de los enantiómeros de RBZ en dicho medio se muestran a continuación en la figura 81:

¹⁷¹ Calero Montoya, J. Efecto de la utilización de ciclodextrinas en la solubilidad y estabilidad de aciclovir, ketoprofeno, talidomida y ricobendazol. Tesis Doctoral. UCM, Marzo 2001.

¹⁷² Higuchi, T., Connors, K.A. Phase solubility techniques. Adv. Anal. Chem. Instrum. 4, 117, 212, (1965).

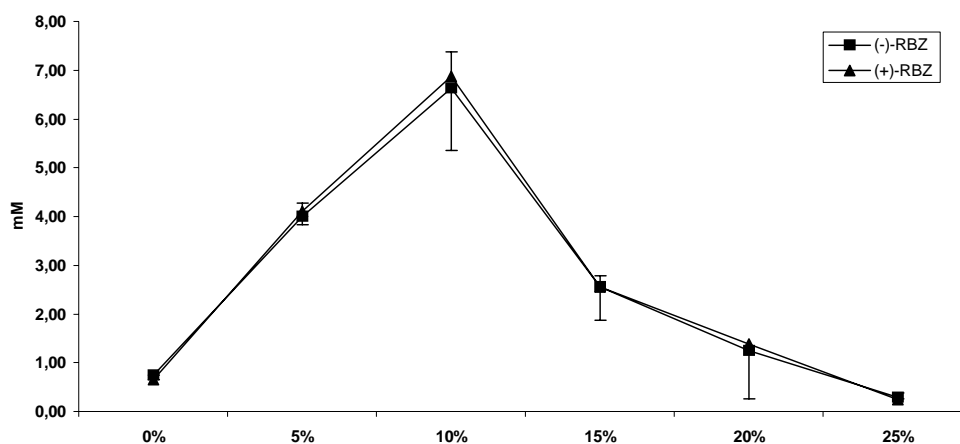


Figura 81. Diagrama de solubilidad de los enantiómeros de RBZ en presencia de HPβCD en agua desionizada (pH 9.0) a 120 °C y 1 atmósfera durante 20 minutos.

Como se puede observar a pH básico, 9.0, la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ aumenta de manera lineal cuando se adiciona HPβCD al medio, hasta una concentración de 10%, a partir de la cual, y al igual que en el pH anteriormente estudiado (pH 1.2) disminuye bruscamente la solubilidad. Se calcularon los parámetros de los enantiómeros de RBZ, que se muestran en la tabla 65.

Tabla 65. Parámetros de los enantiómeros de RBZ determinados a partir de los diagramas de solubilidad a pH 9.0, en presencia de distintas proporciones de HPβCD, tras un ciclo en el autoclave a 120°C y 1 atmósfera.

RBZ	S _o exp. (mM)	S _o graf. (mM)	K _c (M ⁻¹)	r	p
(-)-RBZ	0.75	3.62	----	-0.325	>0.1
(+)-RBZ	0.65	3,67	----	-0.309	>0.1

A la vista de los resultados obtenidos, podemos decir que el RBZ forma en general, complejos poco estables con la HPβCD a pH 9.0. Sin embargo si calculamos la constante para tan solo las concentraciones de 5% y 10% de HPβCD, los resultados son diferentes:

Tabla 66. Parámetros de los enantiómeros de RBZ determinados a partir de los diagramas de solubilidad a pH 9.0, en presencia de distintas proporciones de HP β CD (5 y 10%), tras un ciclo en el autoclave a 120°C y 1 atmósfera.

RBZ	S _o exp. (mM)	S _o graf. (mM)	Kc (M ⁻¹)	r	p
(-)-RBZ	0.75	0.85	1902.91	0.998	<0.05
(+)-RBZ	0.65	0.76	2531.54	0.998	<0.05

Como se puede observar en la tabla 66, las constantes de formación de los complejos pudieron ser calculadas para ambos enantiómeros dando unos resultados aceptables y dentro del rango 200-5000 M⁻¹.

Por tanto podemos decir que el aumento de solubilidad de los enantiómeros de RBZ es lineal y significativo (p<0.05) hasta una concentración de 10% HP β CD en el que encontramos un descenso que será debido a la formación de complejos poco estables que precipitaran, también debido a la sinergia entre la temperatura y la presión utilizadas junto con el pH del medio que provocarán la hidrólisis de la molécula¹⁷³. Es decir, que en este caso y al igual que lo ocurrido a pH 1.2, la HP β CD será catalizador en la degradación de RBZ.

Los resultados obtenidos pueden ser comparados, de nuevo, con aquellos obtenidos por Calero¹⁷⁴, el cual estudió, las solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ a pH 9.0, en presencia de distintas concentraciones de HP β CD. De sus resultados se deducía un incremento estadísticamente significativo (p<0.05) de la solubilidad de los enantiómeros de RBZ cuando se aumenta la concentración de HP β CD, lo que demuestra que ambos enantiómeros son capaces de formar complejos de inclusión con la citada CD, pero de estabilidad relativamente baja. Además, en base a los resultados que obtuvo se pudo clasificar como tipo A_L.

¹⁷³ Álvarez, C., Van Hees, T., Piel, G., Liégeois, J.-F., Delattre, L., Evrard, B. Preparation of mebendazole HP- β cyclodextrin complexes using water-soluble polymers and organic acids. STP Pharm. Sci.. 11 (6), 439-442, (2001).

¹⁷⁴ Calero, J. Efecto de la utilización de ciclodextrinas en la solubilidad y estabilidad de aciclovir, ketoprofeno, talidomida y ricobendazol. Tesis Doctoral. UCM, Marzo 2001.

En nuestras condiciones de trabajo, la inclusión de la HP β CD es positiva hasta un porcentaje de 10%, a partir de cual ésta ejercerá un efecto negativo sobre la estabilidad de los enantiómeros de rac-RBZ, este efecto negativo se verá a su vez incrementado por la acción conjunta del pH del medio, y la temperatura y la presión.

5.2.2. Diferentes proporciones de polímeros hidrosolubles y ácidos orgánicos (50 mM)

Se realizaron diferentes combinaciones utilizando los polímeros hidrosolubles (HPMC y PVP) a distintas proporciones, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25%, en presencia de la HP β CD 10%. Los porcentajes que fueron previamente descritos y utilizados en nuestro estudio están dentro del rango descrito por Loftsson et al.¹⁷⁵ como adecuado para realizar la complejación de los fármacos por las CD. Se seleccionó la HP β CD y la proporción de 10 % a añadir al medio, teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente en el baño de agitación a 37°C.

5.2.2.1. HPMC y Ácido Cítrico (50mM)

Las muestras que se utilizaron en este estudio están descritas adecuadamente en el espacio correspondiente a los *Materiales* y *Métodos* utilizados. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 84 descrita a continuación:

¹⁷⁵ Loftsson, T. Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug bioavailability through addition of water-soluble polymers. *Pharmazie*, 53 (11), 733-740, (1998)

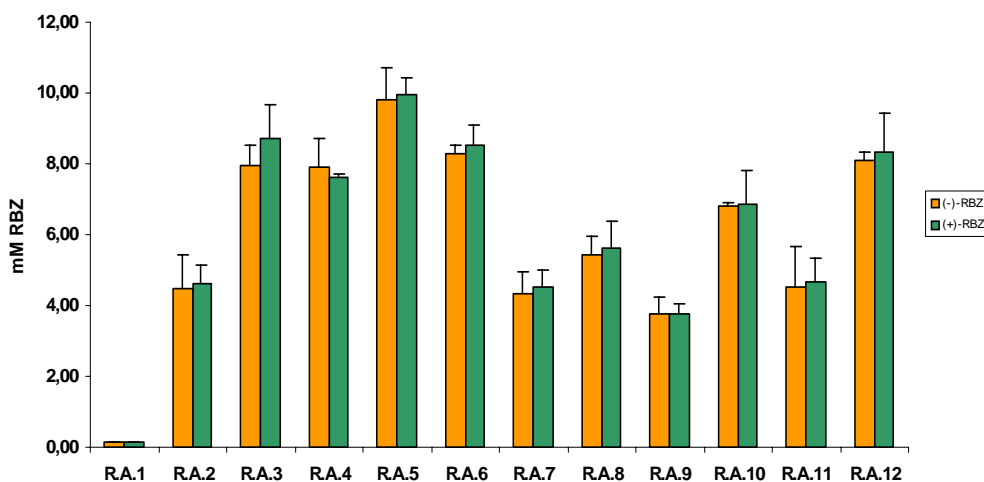


Figura 82. Solubilidad de los enantiómeros de RBZ en presencia de HP β CD 10%, distintas proporciones de HPMC y ácido cítrico (50 mM)

Como se puede observar en la figura 82, la solubilidad de los enantiómeros de RBZ se ve aumentada ($p < 0.05$) en las muestras que poseen la HP β CD 10% (R.A.2), respecto a aquella en que ésta no se encuentra presente (R.A.1).

Respecto a la influencia en la complejación de RBZ por la HP β CD ejercida por la HPMC, podemos decir que dicho polímero hidrosoluble ejerce una influencia positiva en todos los casos pero mayor en aquella muestra que contiene el porcentaje de 0.15%. (R.A.5). La solubilidad de los enantiómeros de RBZ se ve aumentada de una forma significativa ($p < 0.05$) con respecto a aquellos análisis realizados en el baño de agitación a 37°C.

Podemos decir también que la adición del ácido cítrico (50mM) no provoca un efecto sinérgico con la HPMC y la HP β CD 10% en cuanto al aumento de la solubilidad de los enantiómeros de RBZ. Se observó, a su vez, que la acidificación del medio en este caso, y que anteriormente ha sido de carácter positivo para la ionización de la molécula con características de base débil, no provocó dicho efecto ionizante en los enantiómeros de RBZ, y por tanto no se observa un aumento en la solubilidad con respecto a las muestras que poseen la HP β CD 10% y las distintas proporciones de

HPMC. Tan solo se observa dicho efecto en la muestra que posee 0.25% de HPMC (R.A.7), cuya solubilidad aumenta cuando se adiciona 50 mM de ácido cítrico (R.A.12). Este hecho será debido a una protección de la HPβCD 10% en presencia de un alto porcentaje de HPMC (0.25%) que actúa como agente potenciador de la formación y consolidación de los complejos formados.

Pero dicha solubilidad total no supera a la obtenida tras la adición al medio de 0.15% HPMC en presencia de la HPβCD 10% y en ausencia del ácido cítrico (50 mM) (R.A.5).

En todas las muestras que poseen el ácido cítrico (50 mM) se observó una degradación de los enantiómeros de RBZ (R.A.8, R.A.9, R.A.10, R.A.12 y R.A.12). Dicha degradación fue del orden de 25% en todos los casos estudiados que contienen dicho ácido cítrico (50 mM). Dicha degradación es debida al efecto hidrolítico que posee sobre los enantiómeros de RBZ, el medio ácido a una temperatura y presión forzada por el ciclo en el autoclave.

Resultados similares, en cuanto a la aparición de degradación de la molécula tras el ciclo en el autoclave, fueron obtenidos por Alvarez et al.¹⁷⁶ para otro fármaco poco soluble perteneciente a la familia de los carbamatos bencimidazólicos, el mebendazol. En dicho estudio se estudió la influencia de los polímeros orgánicos (HPMC y PVP) y los ácidos orgánicos (ácido cítrico y ácido tartárico) a concentración de 50 mM en la complejación del fármaco con la HPβCD 10% tras realizar un ciclo en el autoclave a 120°C durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión. Los resultados obtenidos ofrecen una degradación por hidrólisis del grupo carbamato de la molécula de mebendazol cuando se trabaja a presiones y temperaturas forzadas. Debido a que nuestra molécula pertenece a la misma familia que el mebendazol, concluimos que el producto de degradación corresponderá a la hidrólisis en medio ácido (provocado por el ácido orgánico) del grupo carbamato en presencia de condiciones de presión y temperatura forzadas.

¹⁷⁶ Álvarez, C., Van Hees, T., Piel, G., Liégeois, J.-F., Delattre, L., Evrard, B. Preparation of mebendazole HP-βcyclodextrin complexes using water-soluble polymers and organic acids. STP Pharm. Sci., 11 (6), 439-442, (2001).

A pesar de la degradación encontrada, podemos decir que los mejores resultados se obtuvieron cuando se adiciona al medio el ácido cítrico (50 mM) junto a las proporciones 0.25% de HPMC (R.A.12) y 0.15% de HPMC (R.A.10) en presencia de la HP β CD 10%.

No se observaron diferencias enantioselectivas ($p > 0.05$) en cuanto a la solubilidad y a la estabilidad de los enantiómeros de RBZ en ninguno de los casos estudiados.

6.2.2.2. HPMC y Ácido Tartárico (50mM)

Se estudió la influencia de la solubilidad de los enantiómeros de RBZ en presencia de diferentes proporciones de HPMC, y a su vez en presencia de otro ácido orgánico, el ácido tartárico (50 mM). Las muestras que se prepararon son adecuadamente presentadas en el apartado de *Materiales y Métodos*. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 83, a continuación:

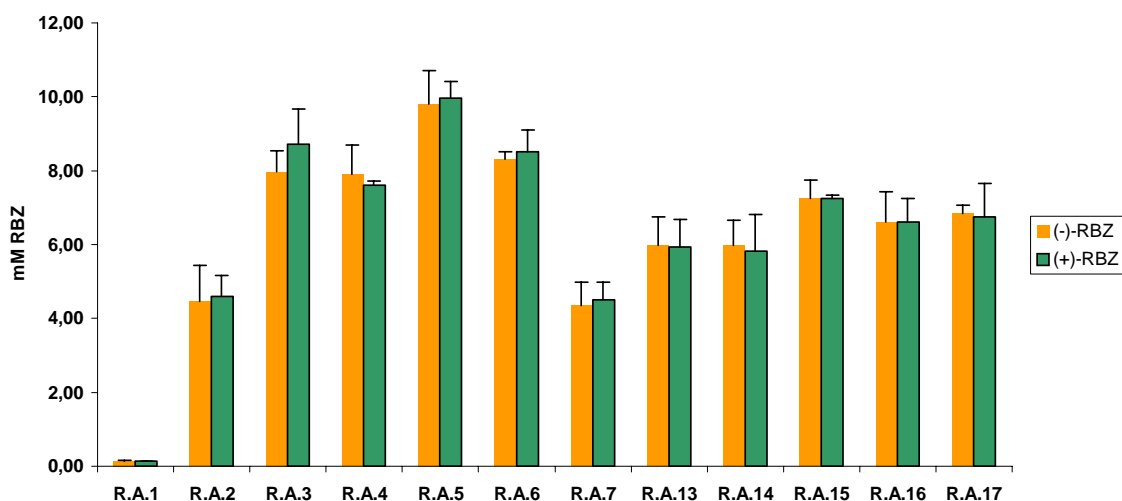


Figura 83. Solubilidad de los enantiómeros de RBZ en presencia de HP β CD 10%, distintas proporciones de HPMC y ácido tartárico (50 mM).

En este caso la presencia del ácido tartárico (50 mM) en combinación con las distintas proporciones de HPMC provocará una disminución en la solubilidad de los enantiómeros de RBZ con respecto a aquellas muestras que contienen sólo la HPMC. Pero en este caso se observará que la degradación provocada por la sinergia entre la temperatura y la presencia del medio ácido provocado por el ácido tartárico es menor (aproximadamente un 20%) en todos los casos y en todas las proporciones de HPMC

adicionada al medio que aquella obtenido anteriormente con la presencia de ácido cítrico (50 mM). (Ver descripción de la degradación en el apartado 6.2.2.1.)

Nuevamente en este caso observaremos la influencia positiva en la solubilidad de los enantiómeros de RBZ en la muestra de HPMC 0.25% que contiene el ácido tartárico (50 mM) (R.A.17) con respecto a la muestra que contenía tan sólo la HPMC 0.25% (R.A.7) en presencia de la HP β CD 10%. Pero en ninguno de los casos la solubilidad obtenida para los enantiómeros de RBZ será superior a aquella obtenida en ausencia de ácidos orgánicos y en presencia de la HPMC 0.15% (R.A.5).

Tampoco en este caso se observaron diferencias enantioselectivas ($p > 0.05$) entre la solubilidad de los enantiómeros de RBZ.

5.2.2.3. PVP y Ácido Cítrico (50mM)

Las muestras utilizadas en este apartado son descritas en el apartado de *Materiales y Métodos*. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

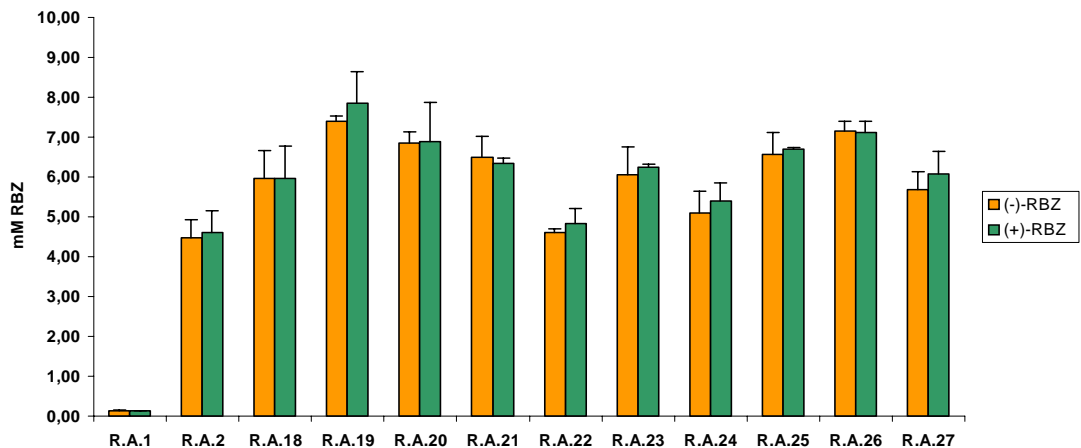


Figura 84. Solubilidad de los enantiómeros de RBZ en presencia de HP β CD 10%, distintas proporciones de PVP y ácido cítrico (50 mM).

Como se puede observar en la figura 84 la solubilidad de los enantiómeros de RBZ en presencia de la HP β CD 10% (R.A.2) aumenta significativamente ($p < 0.05$) respecto a las muestras que no la contienen (R.A.1).

Por otro lado, la adición al medio de las diferentes de proporciones de PVP, provocará a su vez un mayor aumento en la solubilidad de los enantiómeros de RBZ, sobre todo en la proporción de 0.10% PVP (R.A.19), y en menor proporción en aquella a la que se le adicionó un 0.25% PVP (R.A.22). Los resultados obtenidos con el uso de la PVP darán resultados de solubilidad menores que los obtenidos anteriormente con la HPMC.

La adición de ácido cítrico (50mM) no provocará un aumento de solubilidad significativo ($p>0.05$) en ninguno de los casos estudiados. Tan solo en la proporción de PVP 0.25% se observa un ligero aumento en la solubilidad de los enantiómeros de RBZ tras la adición del ácido cítrico (50 mM).

En todos los casos estudiados en presencia de ácido cítrico (50 mM) se observa la aparición de picos de degradación correspondientes a la degradación de ambos enantiómeros. (Ver apartado 6.2.2.1.) Dichas degradaciones ocurridas en el medio ácido, sugieren la hidrólisis de la molécula en el medio ácido formado debido a la temperatura del autoclave. Dicha degradación fue en todos los casos del orden del 45% excepto en la muestra que contiene 0.25% donde la degradación se ve limitada a un 30%. Este hecho será debido a una protección de la HP β CD 10% en presencia de un alto porcentaje de PVP (0.25%) que actúa como agente potenciador de la formación y manutención de los complejos formados.

No se encontraron diferencias enantioselectivas ($p>0.05$) en la solubilidad y estabilidad de los enantiómeros de RBZ.

5.2.2.4. PVP y Ácido Tartárico (50mM)

Las muestras preparadas se encuentran descritas en el apartado de *Materiales y Métodos*. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

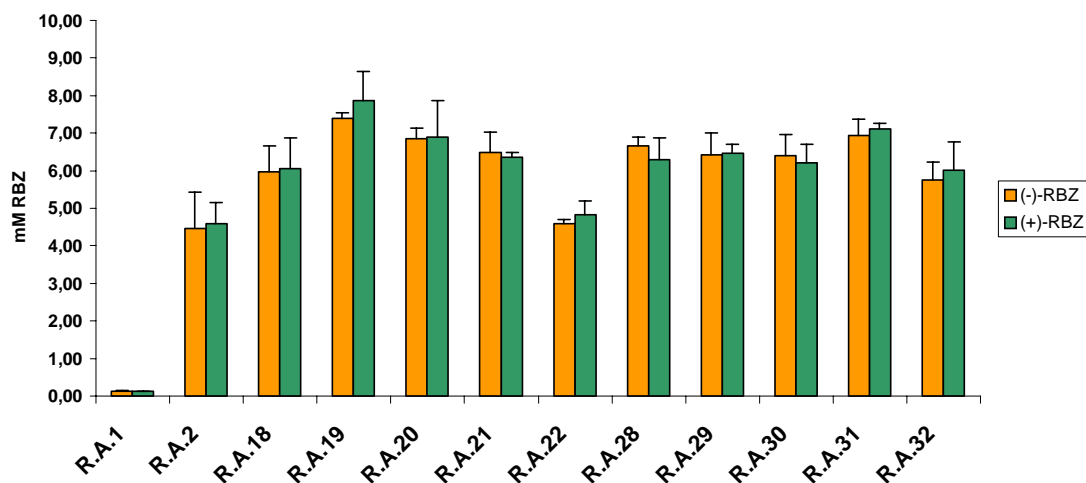


Figura 85. Solubilidad de los enantiómeros de RBZ en presencia de HPβCD 10%, y distintas proporciones de PVP y ácido tartárico (50 mM).

Como se puede observar en la figura 85 la solubilidad de los enantiómeros de RBZ en este caso posee un comportamiento similar a aquel obtenido utilizando como ácido orgánico adicionado al medio el ácido cítrico. A su vez los resultados de solubilidad total serán menores en este caso que cuando se utilizó la HPMC como polímero hidrosoluble.

No se observa un aumento significativo ($p > 0.05$) en el aumento de solubilidad en ningún caso tras la adición a los medios con las diferentes proporciones de PVP y la HPβCD 10%. Tan sólo en la muestra que posee 0.25% PVP en presencia de ácido tartárico (50 mM) y HPβCD 10% se observó una mayor solubilidad que en su análogo que no contiene el ácido tartárico.

Al igual que en el estudio descrito en el apartado anterior aparecen picos de degradación correspondientes a los productos de degradación de ambos enantiómeros (Ver apartado 6.2.2.1). Las proporciones degradadas en las diferentes muestras serán al igual que en las muestras con ácido cítrico (50 mM) de aproximadamente 45%

para todas las muestras excepto para aquella que contiene 0.25% PVP. De nuevo podremos explicar este hecho, debido a una protección de la HP β CD 10% en presencia de un alto porcentaje de PVP (0.25%) que actúa como agente potenciador de la formación y estabilizador de los complejos formados.

En ninguno de los casos anteriormente observados encontramos diferencias enantioselectivas ($p>0.05$) en cuanto a la solubilidad y estabilidad de los enantiómeros de RBZ.

6. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA INTERNA DE LAS DISTINTAS FORMAS DE TALIDOMIDA

6.1. PUNTO DE FUSIÓN.

Se determinó el punto de fusión de rac-TH, R(+)-TH y S(-)-TH siguiendo los métodos descritos en el apartado *Material y Métodos* (Sistema de tipo B-450 y análisis térmico diferencial).

En la tabla 67 se recogen los valores de punto de fusión obtenidos por el sistema de determinación del punto de fusión tipo capilar (B-450) para las muestras ensayadas.

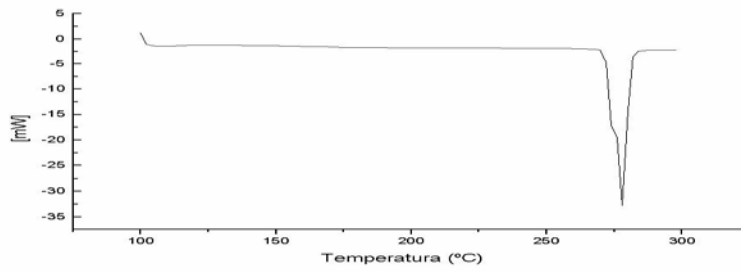
Tabla 67. Puntos de fusión de las distintas formas de TH.

Muestra	°C
Rac-TH	270
R(+)-TH	255
S(-)-TH	258

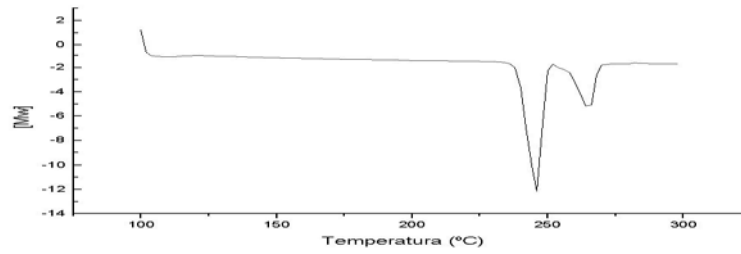
El comportamiento térmico de las distintas formas de TH fue también observado, por la técnica de análisis térmico diferencial. A continuación en la figura 86 se muestran los resultados obtenidos por medio de ésta técnica para las distintas formas de de TH.

Como se puede observar por ambos métodos, los enantiómeros R(+)-TH y S(-)-TH, poseen menores puntos de fusión que su forma racémica. Los resultados se pueden observar en la tabla 67, mostrada anteriormente, y por medio del diagrama DSC, el cual muestra que tanto para los enantiómeros como para la forma racémica aparece un único pico endotérmico, siendo el correspondiente a la muestra de rac-TH el que aparece más desplazado a la derecha, debido al mayor punto de fusión que posee.

(A)



(B)



(C)

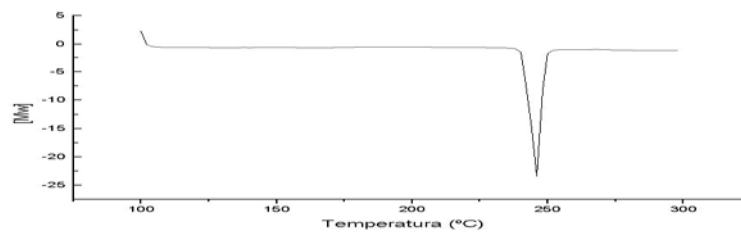


Figura 86. Diagramas DSC obtenidas para rac-TH (A), R(+)-TH (B), S(-)-TH (C)

6.2. CRISTALINIDAD

Las muestras analizadas para observar la cristalinidad de los productos serán las mismas que en el apartado anterior (rac-TH, R(+)-TH, S(-)-TH).

En la figura 87 se muestra el difractograma obtenido para las distintas muestras analizadas con el sistema Philips X'Pert-MPD (CAI, Difracción Rayos X, UCM).

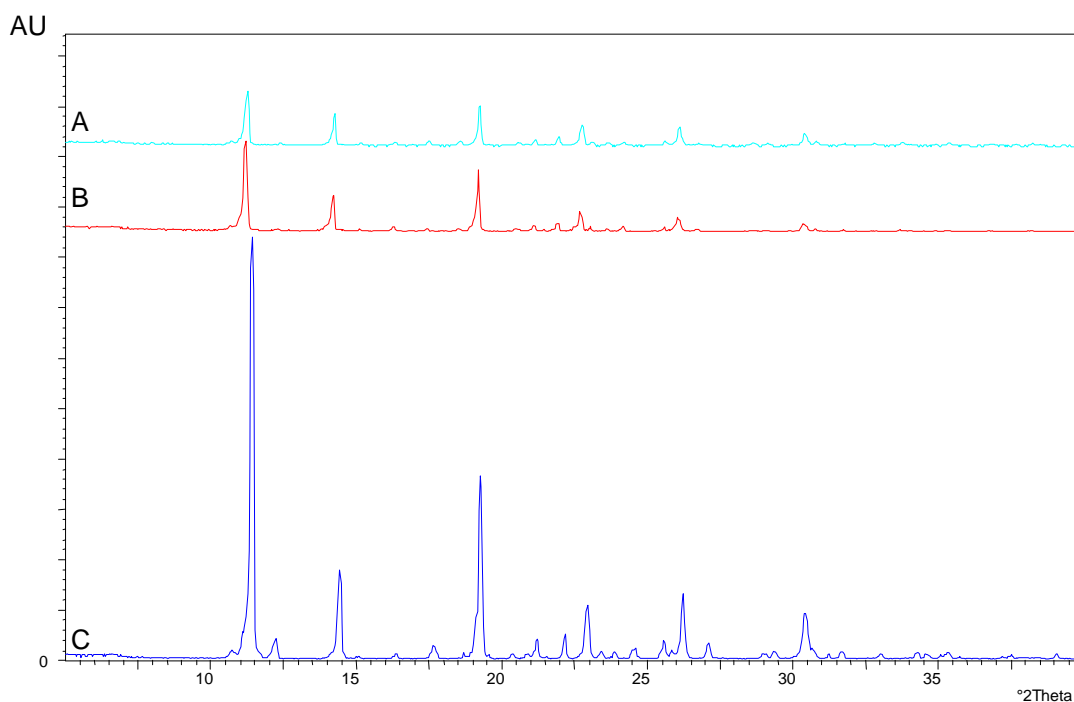


Figura 87. Difractograma de las diferentes muestras de TH: R(+)-TH (A), S(-)-TH (B), rac-TH (C).

Como se puede observar el perfil cristalino obtenido para el enantiómero R(+)-TH (A) es similar al obtenido para S(-)-TH (C), y ambos, a su vez, diferentes al perfil obtenido para la muestra de rac-TH (B). Este hecho parece lógico, con respecto a los puntos de fusión que se obtuvieron, siendo muy similares para los enantiómeros, lo que nos lleva a pensar en que éstos poseen una similitud en su estructura cristalina, que se ve evidenciado por los datos de la figura 87. Sin embargo, la muestra de

rac-TH cuyo punto de fusión es mayor que para los enantiómeros, es indicativo de una mayor cristalinidad en su estructura.

Como ya se dijo tras el estudio morfológico realizado para el rac-KP y sus enantiómeros, resultados similares han sido hallados en la bibliografía para diferentes fármacos quirales y resumidos por Li y Grant¹⁷⁷. Para la mayoría de las moléculas estudiadas, los cristales racémicos poseen mayor densidad y por tanto cristalinidad que sus correspondientes enantiómeros puros.

También se realizó un estudio morfológico de los cristales de R(+)-TH (figura 88), S(-)-TH (figura 89) y rac-TH (figura 90) a través de microscopía diferencial de barrido. Las fotografías realizadas se muestran a continuación.

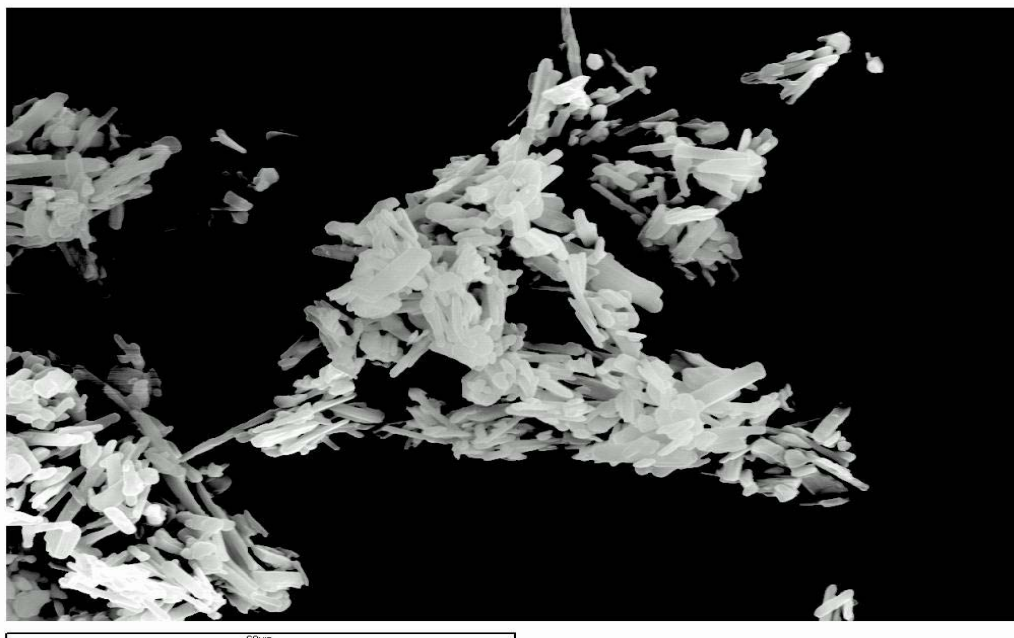


Figura 88. Cristales de R(+).TH puro, ($\times 1000$).

¹⁷⁷ Li, Z.J., Grant, D.J.W. relationship between physical properties and crystal structure of chiral drugs. J. Pharm. Sci., 86 (10), 1073-1078, (1997).

Como se puede observar en la figura 88, los cristales de R(+)-TH poseen una estructura cristalina uniforme y de similar tamaño entre unos y otros. La forma de los cristales es de tipo acicular.

A continuación se muestra la foto obtenida, tras el análisis de la muestra, S(-)-TH.

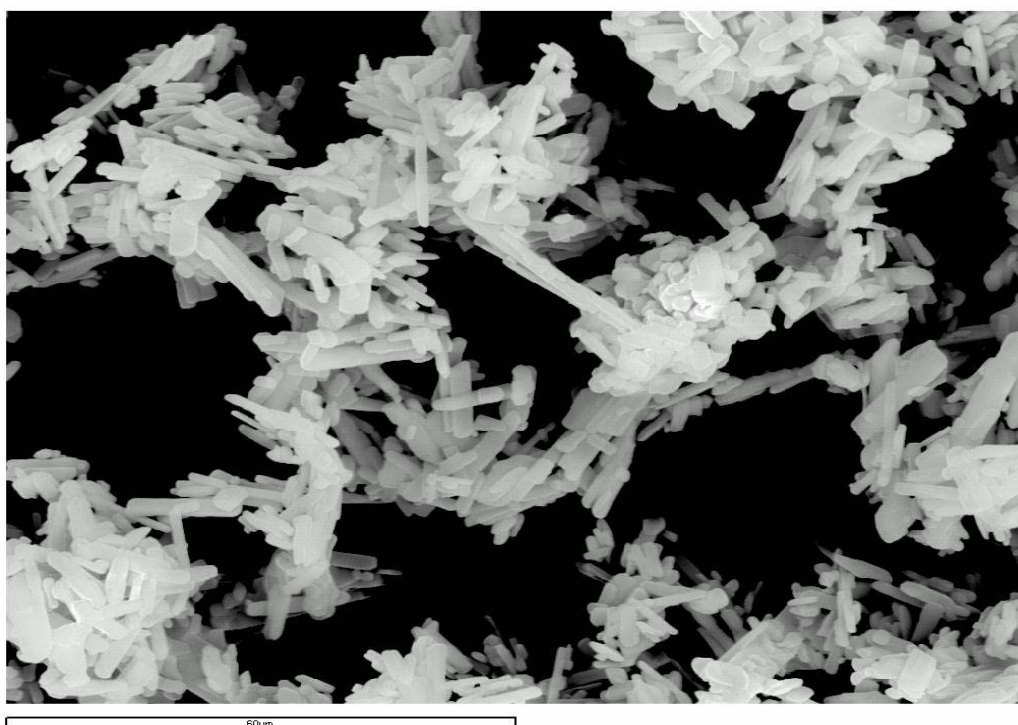


Figura 89. Cristales de S(-)-TH puro, ($\times 1000$).

Como se puede observar en la figura 89, los cristales del enantiómero puro S(-)-TH son muy similares, tanto en tamaño, como en forma a los del enantiómero R(+)-TH (figura 90). Este hecho es lógico, ya que los resultados obtenidos y mostrados previamente, tanto para el punto de fusión como para el estudio cristalográfico mostraban una similitud que se hace evidente al observar directamente los cristales correspondientes a ambos enantiómeros.

A continuación en la figura 93, se pueden observar los cristales de la muestra rac-TH.

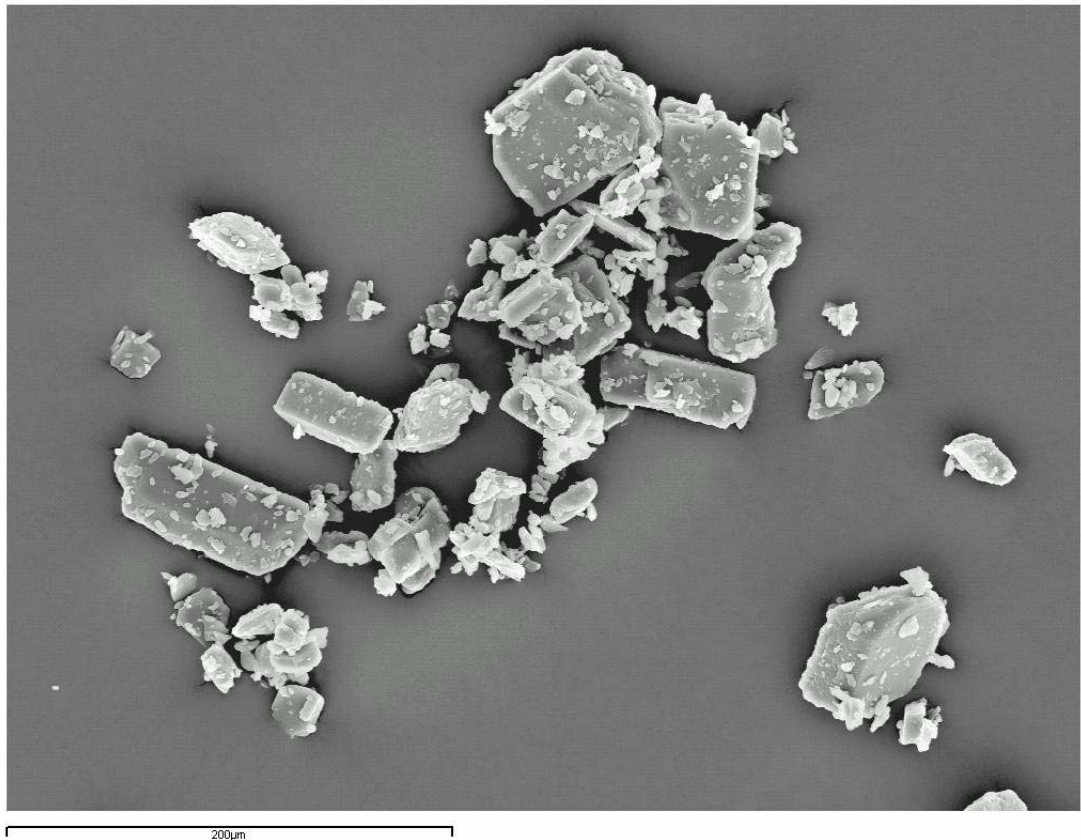


Figura 90. Cristales de rac-TH, ($\times 250$).

Como se puede observar en la figura 90, los cristales de rac-TH son muy distintos a los enantiómeros de la TH. Tanto en tamaño, como en forma. El tamaño es irregular, encontrando un amplio espectro de tipos de cristales, que van desde un tamaño muy pequeño a aquellos otros de tamaño grande. En la forma también encontraremos una irregularidad siendo éstos de diferentes

formas, predominando la forma prismática en muchos de ellos. Estos resultados son consecuentes con los obtenidos en los estudios del punto de fusión y de su cristalografía, ya que los cristales de la forma rac-TH poseen una estructura diferente a la de los enantiómeros puros.

7. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LAS DISTINTAS FORMAS DE TALIDOMIDA

Para los distintos estudios de solubilidad se utilizaron las diferentes muestras preparadas y descritas en el apartado de *Materiales y Métodos*, tanto en el baño de agitación a 37°C así como tras un ciclo de autoclave a 120°C durante 20 minutos y presión de 1 atmósfera

Las diferentes formas de TH que se fueron objeto de estudio son las siguientes: rac-TH, R(+)-TH y S(-)-TH. (No tuvimos disponible suficiente cantidad de enantiómeros puros de la TH suficiente, para preparar las mezclas físicas (MF) en proporción 1:1)

Con las muestras preparadas se observó la correlación entre la solubilidad obtenida y los resultados obtenidos anteriormente en las pruebas de determinación de punto de fusión y cristalinidad.

También se observó el aumento de la solubilidad de las distintas formas de TH, poco solubles en agua, cuando éstas se incluyen en soluciones que contengan diferentes pH's así como la HP β CD, con o sin polímeros hidrosolubles (HPMC o PVP), excipientes que como ya se ha comentado anteriormente ayudan a facilitar la formación de los complejos, por tanto ayuda a aumentar la solubilidad. Para facilitar la solubilidad de TH, en determinados estudios, se añadió un acidificante del pH del medio, el ácido cítrico o el ácido tartárico.

7.1. BAÑO DE AGITACIÓN A 37°C

Se determinó la solubilidad de las distintas formas de TH (rac-TH, R(+) y S(-)-TH puros), a distintos pH's, así como a distintas concentraciones de HP β CD, CD que como ya hemos indicado posee una alta solubilidad en agua, y además se tuvo en cuenta la presencia de carbonos asimétricos en su estructura, que le otorga propiedades quirales. De esta manera se observó también la posible interacción entre fármaco-excipiente, y las posible enantioselectividad que se derive de ella.

7.1.1. Distintos pH's.

Los primeros ensayos realizados corresponden a la determinación de la solubilidad de las distintas formas de TH a diferentes pH's, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 68:

Tabla 68. Cs (mM) del enantiómero R(+)-TH en las distintas formas de TH estudiadas a distintos pH (n=3).

<i>pH</i>	<i>R(+)-TH Rac</i> $\pm SD$	<i>S(-)-TH Rac</i> $\pm SD$	<i>R(+)-TH</i> $\pm SD$	<i>S(-)-TH</i> $\pm SD$
11.0	0.08 \pm 0.00200	0.08 \pm 0.00060	0.13 \pm 0.016	0.15 \pm 0.012
9.0	0.09 \pm 0.00900	0.09 \pm 0.00200	----	----
7.0	0.10 \pm 0.00700	0.09 \pm 0.00040	0.45 \pm 0.010	0.52 \pm 0.023
6.5	0.11 \pm 0.00500	0.10 \pm 0.00060	----	----
<i>Agua des (5.8)</i>	0.28 \pm 0.00012	0.27 \pm 0.00500	0.48 \pm 0.020	0.47 \pm 0.054
5.5	0.27 \pm 0.00020	0.27 \pm 0.00010	----	----
4.5	0.28 \pm 0.00070	0.28 \pm 0.00100	0.59 \pm 0.012	0.54 \pm 0.012
3.5	0.31 \pm 0.00200	0.33 \pm 0.00030	----	----
2.0	0.35 \pm 0.00100	0.36 \pm 0.00600	----	---
1.2	0.42 \pm 0.00400	0.39 \pm 0.00100	0.63 \pm 0.021	0.61 \pm 0.010

A la vista de los resultados, observamos un comportamiento en el aumento de solubilidad relacionado directamente con el pH del medio. Este hecho es lógico, dado que la TH es una molécula que posee características básicas, por tanto, el pH ácido favorece su solubilización, debido a que provoca que la molécula se ionice, y por tanto aumente su solubilidad.

Se observó, además, que el aumento de solubilidad está relacionado directamente también con la forma de TH. Como se puede observar, los enantiómeros que proceden de la forma rac-TH poseen una menor solubilidad, que la obtenida cuando son los enantiómeros puros, tanto R(+) como S(-)-TH los estudiados. Este hecho concuerda a su vez con los estudios realizados anteriormente, tanto de punto de fusión, como de morfología. El punto de fusión obtenido para los enantiómeros puros de TH, y las características cristalográficas similares que existen entre ambos, concuerdan con los resultados de solubilidad mayores mencionados y observados en la tabla 59.

Por otro lado, los resultados correspondientes a los enantiómeros que provienen de la forma rac-TH, concuerdan a su vez con el mayor punto de fusión obtenido, y las propiedades cristalográficas más acusadas, y de ahí la menor solubilidad obtenida en todos los casos.

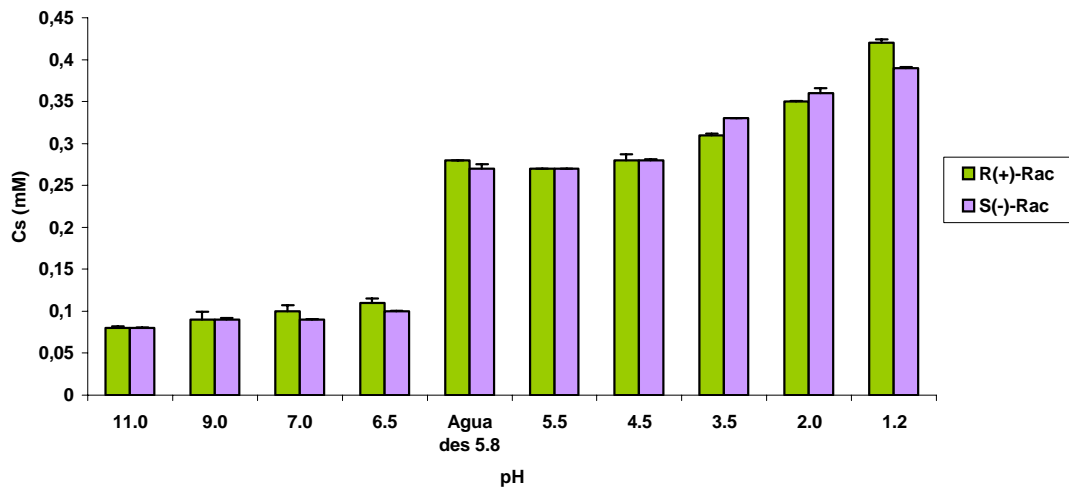


Figura 91. Enantiómeros de la muestra rac-TH.

Como se puede observar en la figura 91 para la muestra de rac-KP, no se observan diferencias entre ambos enantiómeros en ninguno de los pH estudiados

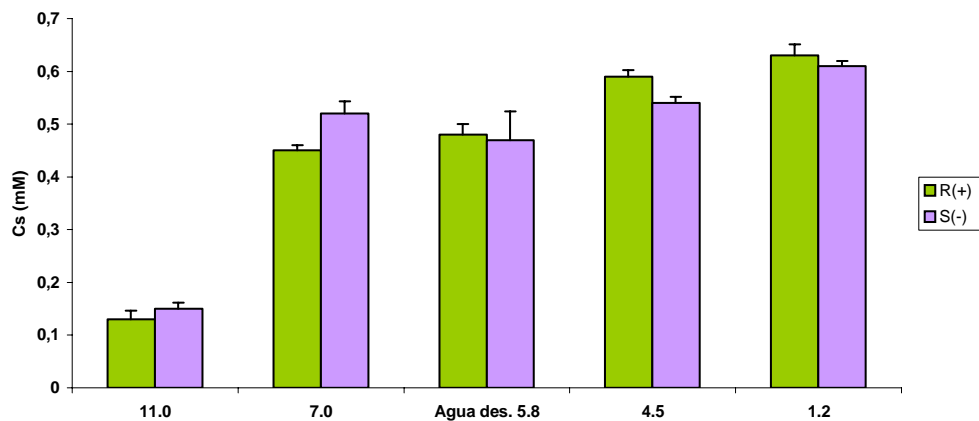


Figura 92. Enantiómeros puros R(+)-TH y S(-)-TH.

Ambos enantiómeros puros poseen una mayor solubilidad que los obtenidos en el caso anterior, pertenecientes a la muestra de rac-TH, sobre todo a los pH más favorables, pero no existen diferencias significativas ($p > 0.01$) en cuanto a la solubilidad de cada uno de los enantiómeros.

7.1.2. Distintas proporciones de HP β CD

Las muestras que son objeto de estudio en este apartado están adecuadamente descritas en el correspondiente apartado de *Materiales y Métodos*. Se realizó el ensayo con el fin de determinar la solubilidad de los enantiómeros de TH en presencia de la HP β CD a distintas proporciones en agua desionizada, y una cantidad en exceso de rac-TH, R(+)-TH o S(-)-TH. Los tubos se mantuvieron en el baño de agitación a 37°C durante dos días. Las muestras fueron realizadas por triplicado.

La figura 93 muestra el diagrama de solubilidad obtenido para los enantiómeros de TH en agua desionizada:

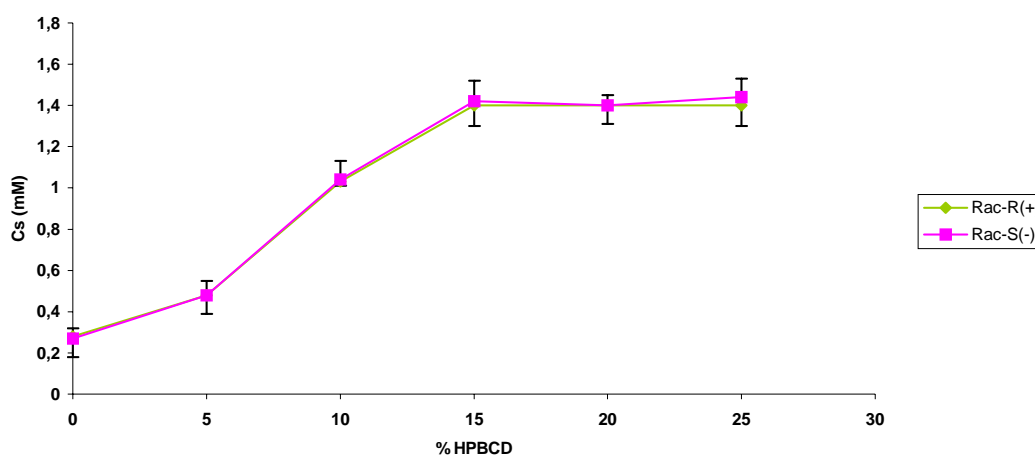


Figura 93. Diagrama de solubilidad de los enantiómeros de las muestras de rac-TH en presencia de HP β CD en agua desionizada a 37°C.

Como se puede observar en la figura 93, la solubilidad de los enantiómeros aumenta linealmente cuando se incrementa la concentración de HP β CD adicionada al medio. El diagrama de solubilidad en estas condiciones experimentales es de tipo A_L. Este comportamiento es complejo siendo característico de los complejos con estequiometría 1:1. Las constantes de formación del complejo (Kc) de los enantiómeros de la forma rac-TH con la HP β CD en agua desionizada fueron calculadas a partir de la pendiente y del intercepto S_o de la porción lineal del diagrama de solubilidad se muestran en la tabla 69.

Tabla 69. Parámetros determinados a partir del diagrama de solubilidad de los enantiómeros puros de la TH en presencia de la HP β CD en agua desionizada.

Fármaco	S _o experim (mM)	S _o gráfico (mM)	Kc (M ⁻¹)	r	p
R(+)-TH	0.28	0.37	187.5	0.926	<0.05
S(-)-TH	0.27	0.36	200.5	0.930	<0.05

En la tabla 60 se observa que existe una relación directa (r) entre el aumento de la solubilidad de los enantiómeros de TH y el incremento en la concentración de la HP β CD. El valor de la Kc para ambos enantiómeros de la forma rac-TH es de aproximadamente 200 M⁻¹, se consideran como adecuados para que mejoren sus propiedades de biodisponibilidad de este fármaco ya que se encuentran dentro del rango de 200-5000 M⁻¹, dicho rango es considerado por varios autores como adecuado para la mejora de la biodisponibilidad de fármacos escasamente solubles¹⁷⁸. Se produce la formación de sistemas estables, en los que se mantiene un adecuado equilibrio entre las moléculas libres de cada enantiómero y las que están incluidas en la cavidad de la HP β CD¹⁷⁹.

A continuación, en la figura 94, observamos la solubilidad de los enantiómeros puros de TH, en combinación con la HP β CD en distintas proporciones.

¹⁷⁸ Blanco, J.L., Vila-Jato, J., Otero, F., Anguiano, S. Drug Dev. Ind. Pharm. 17, 943, (1991).

¹⁷⁹ Uekama, K., Otagiri, M. Critical review in therapeutic carrier system. Cyclodextrins in drug carrier system. 1-40, (1987).

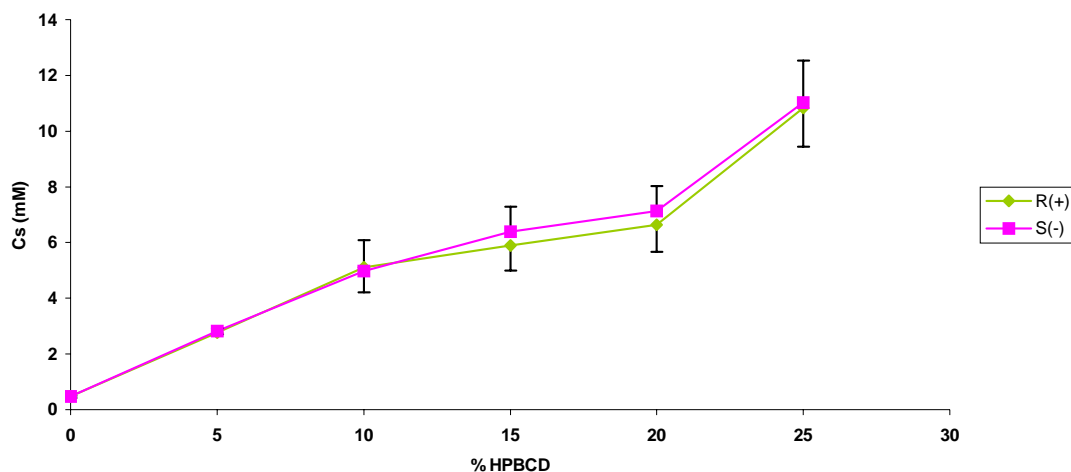


Figura 94. Diagrama de solubilidad de los enantiómeros puros de TH en presencia de HPβCD en agua desionizada a 37°C.

Al igual que en el caso anterior, la solubilidad de los enantiómeros puros de TH en el medio que posee distintas proporciones de HPβCD, muestran aumento lineal y proporcional hasta una concentración de 20%.

La tabla 70 muestra las constantes de estabilidad de los enantiómeros puros de la TH:

Tabla 70. Parámetros determinados a partir del diagrama de solubilidad de los enantiómeros de la rac-TH en presencia de la HPβCD en agua desionizada.

Fármaco	S ₀ experim (mM)	S ₀ gráfico (mM)	Kc (M ⁻¹)	r	p
R(+)-TH	0.48	0.70	1206.2	0.971	<0.05
R(-)-TH	0.47	0.68	1320.7	0.982	<0.05

A la vista de los resultados obtenidos en la tabla 61 podemos decir que al igual que para la muestra racémica, se produce un aumento lineal de la solubilidad para ambos enantiómeros. Por otro lado, los valores de las constantes de formación de los complejos se encuentran dentro del rango 200-5000 M⁻¹ considerado como apto para la mejora de la biodisponibilidad en fármacos poco solubles.

Estos resultados obtenidos que demuestran un aumento en la solubilidad de la TH con la HP β CD están en consonancia con aquellos resultados obtenidos por Krenn et al.¹⁸⁰

7.2. ENSAYOS DE SOLUBILIDAD EN EL AUTOCLAVE

7.2.1. Diferentes proporciones de HP β CD

Continuando con los ensayos de solubilidad de los enantiómeros de rac-TH, utilizaremos el método descrito por Loftsson et al.¹⁸¹, para fármacos poco solubles en agua, por medio del cual se trató de aumentar la complejación del TH y la HP β CD en diferentes proporciones (5, 10, 15, 20, 25%), en agua desionizada (pH 5.8). Preparamos las soluciones de la manera descrita en el apartado de *Materiales y Métodos*. Posteriormente los viales se incluyen convenientemente sellados en el autoclave, y procedió a realizar un ciclo durante 20 minutos, a una temperatura de 120 °C, y presión registrada en el barómetro de 1 atmósfera.

Una vez autoclavadas las muestras, las dejamos enfriar fuera del autoclave y se esperó 1 hora y 30 minutos, para su conveniente estabilización. Posteriormente se procedió a filtrar y diluir las muestras para su análisis por HPLC.

A continuación, en la figura 95 se muestra los diagramas de solubilidad obtenidos para la muestra que contiene rac-TH y las diferentes proporciones de HP β CD:

¹⁸⁰ Krenn, M., Gamcsik, M.P., Vogelsang, G.B., Colvin, O.M., Leong, K.W. Improvements in solubility and stability of thalidomide upon complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *J. Pharm. Sci.* 81(7), 685-689, (1992).

¹⁸¹ Loftsson, T., Másson, M., Sigurjónsdóttir, J.F. Methods to enhance the complexation efficiency of cyclodextrins. *S.T.P.Pharm. Sci.* 9(3), 237-242, (1999).

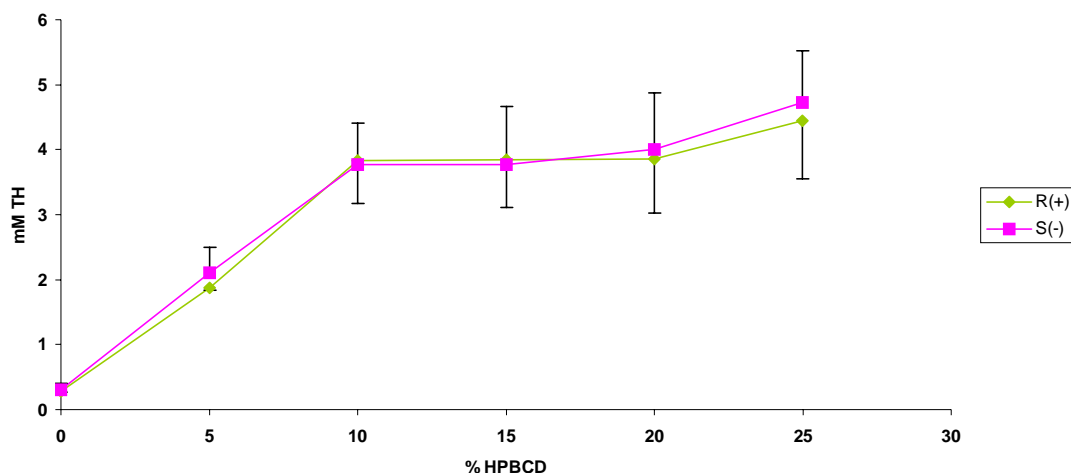


Figura 95. Diagrama de solubilidad de los enantiómeros de la muestra de rac-TH en presencia de HPβCD en agua desionizada, tras un ciclo en el autoclave, a 120°C durante 20 minutos.

Como se puede observar en la figura 95, los enantiómeros de TH que provienen de la forma rac-TH, aumentan su solubilidad de forma lineal, hasta una proporción de 10% de HPβCD, a partir de la cual la solubilidad de los enantiómeros se mantiene sin cambios. De nuevo, y a partir de la proporción de 25% de HPβCD, la solubilidad de nuevo se ve aumentada.

Podemos observar también, la influencia del proceso de autoclavado en la complejación de los enantiómeros de rac-TH por la HPβCD. Tras dicho proceso, la solubilidad aumenta con respecto a los resultados obtenidos tras el baño en agitación a 37°C de manera significativa ($p < 0.01$) del orden de 3 o 4 veces.

La tabla 62 muestra las constantes de estabilidad de los enantiómeros puros la TH:

Tabla 71. Parámetros determinados a partir del diagrama de solubilidad de los enantiómeros de la rac-TH en presencia de la HPβCD en agua desionizada.

Fármaco	S_o experim (mM)	S_o gráfico (mM)	Kc (M^{-1})	r	p
R(+)-TH	0.28	1.1	647	0.892	<0.05
R(-)-TH	0.31	1.1	609	0.916	<0.05

A la vista de los valores obtenidos para los distintos parámetros calculados y mostrados en la tabla 62, podemos decir que se observa una cierta linealidad entre el aumento de la solubilidad de los enantiómeros de rac-TH y la cantidad de HPβCD adicionadas al medio. Por otro lado las constantes de

formación del complejo, nos dan unos valores de 647 y 609 M^{-1} , para R(+) y S(-).TH respectivamente que se encuentran dentro del rango 200-5000 M^{-1} propuesto por Blanco et al¹⁸².

7.2.2. Diferentes proporciones de polímeros hidrosolubles y ácidos orgánicos (50 mM)

Se realizaron diferentes combinaciones utilizando los polímeros hidrosolubles (HPMC y PVP), en la proporción de 0.25%, en presencia de la HP β CD 10%. Los porcentajes que fueron previamente descritos y utilizados en nuestro estudio están dentro del rango descrito por Loftsson et al.¹⁸³ como adecuado para realizar la complejación de los fármacos por las CD. Se seleccionó la HP β CD y la proporción de 10 % a añadir al medio, teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente en el autoclave y descritos en el apartado anterior

. Las muestras preparadas están convenientemente descritas e indicadas en el apartado de *Materiales y Métodos*. En todo momento se trabajó, tan sólo, con la forma rac-TH.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 96, mostrada a continuación:

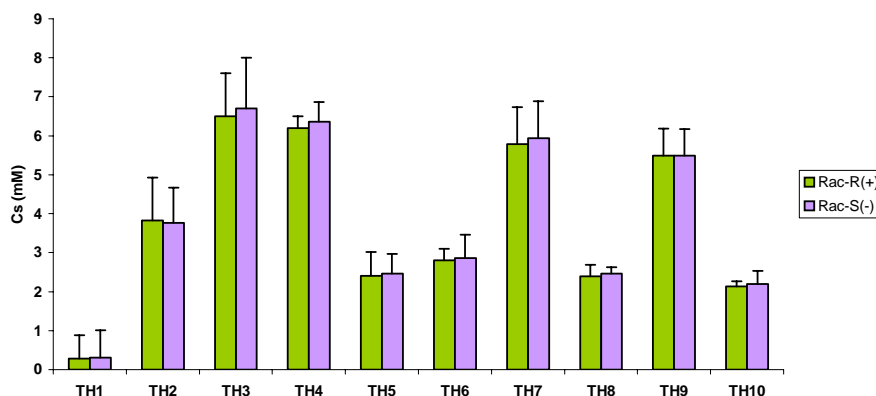


Figura 96. mM de los enantiómeros de rac-TH solubilizados en presencia de HPMC o PVP, ácido cítrico (50 mM) o ácido tartárico (50 mM) en presencia o ausencia de HP β CD 10%.

¹⁸² Blanco, J.L., Vila-Jato, J., Otero, F., Anguiano, S. Drug Dev. Ind. Pharm. 17, 943, (1991).

¹⁸³ Loftsson, T. Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug bioavailability through addition of water-soluble polymers. Pharmazie, 53 (11), 733-740, (1998)

A la vista de los resultados obtenidos tras el ciclo en el autoclave con las distintas combinaciones de los polímeros y/ o los ácidos orgánicos, la solubilidad de los enantiómeros de la forma rac-TH aumenta cuando los polímeros hidrosolubles, tanto HPMC como PVP son adicionados al medio (muestras TH3 y TH4), con respecto a la muestra que tan sólo contiene la 10% HP β CD (TH.2).

Por otro lado, la adición al medio de los ácidos orgánicos, el ácido cítrico (TH5) o el ácido tartárico (TH6), no provocaron un aumento en la solubilidad de los enantiómeros. La adición de éstos al medio, debería provocar, en principio, una acidificación del medio, y por tanto una ionización en la molécula de TH, que posee características básicas, y por tanto un aumento de solubilidad. Sin embargo los resultados difieren de lo esperado, debido posiblemente a la sinergia entre la temperatura del ciclo en el autoclave y la acidificación en el medio, que provocan una degradación en la molécula de TH.

La combinación de los polímeros y los ácidos, está asimismo incluida en esta figura, a la vista de los resultados obtenidos, se puede decir que la combinación de los polímeros y los ácidos (HPMC y ácido cítrico (TH.7), HPMC y ácido tartárico (TH.9), PVP y ácido cítrico (TH8), PVP y ácido tartárico (TH.10)), en principio no favorece el aumento en la solubilidad de los enantiómeros de rac-TH, respecto a los resultados obtenidos para las muestras que tan sólo contienen a los polímeros. Sin embargo, si observamos que la HPMC (TH7 y TH9), protege de la degradación provocada por los ácidos orgánicos, y no la PVP (TH8 y TH10). Esta protección se observó también en el estudio de investigación realizado por Calero¹⁸⁴ y en la trabajo realizado por Krenn et al.¹⁸⁵ el cual destaca la aparición de una mayor estabilidad en la molécula de TH en aquellas muestras que han sido incluidas en soluciones que contenían la HP β CD.

No se encuentra en ningún caso estudiado diferencias significativas ($p > 0.05$), en cuanto a solubilidad enantioselectiva, entre los enantiómeros de la TH.

¹⁸⁴ Calero Montoya, J. Efecto de la utilización de ciclodextrinas en la solubilidad y estabilidad de aciclovir, ketoprofeno, ricobendazol y talidomida. Tesis Doctoral. U.C.M. Marzo 2001.

¹⁸⁵ Krenn, M., Gamcsik, M.P., Vogelsang, G.B., Colvin, O.M., Leong, K.W. Improvements in solubility and stability of thalidomide upon complexation with hidroxypropyl-beta-cyclodextrin. J. Pharm. Sci. 81(7), 685-689, (1992).

8. MATRICES HIDRÓFILAS DE KETOPROFENO, RICOBENDAZOL Y TALIDOMIDA.

Dentro de los sistemas monolíticos de cesión sostenida para administración oral se encuentran los comprimidos matriciales y dentro de los polímeros que se pueden utilizar para formular estos comprimidos se encuentran las hidroxipropilmetilcelulosas (HPMC) que debido a su carácter quiral pueden dar lugar a interacciones en la solubilización de fármacos racémicos, lo que es objeto de estudio en este apartado.

Las formulaciones que son estudiadas en este apartado están compuestas por un fármaco con características quirales, KP, RBZ o TH, y un excipiente quiral (HPMC 15). Las posibles interacciones aparecidas entre cada uno de los enantiómeros y la HPMC 15 fueron estudiadas, para observar la posible aparición de compuestos diastereoisómeros que pueden diferir en su estabilidad, solubilidad y velocidad de liberación. Ésto ha sido estudiado de manera extensa encontrándose numerosas citas bibliográficas^{186,187,188,189,190}, siendo las formas farmacéuticas de liberación controlada de las que se tiene mayor información. Ésto es debido a que la posible existencia de diferencias en el porcentaje de disolución de los enantiómeros del fármaco para formulaciones convencionales no tendrá relevancia clínica, a diferencia de las formulaciones de liberación sostenida, en las que la formación de diastereoisómeros entre el fármaco y el excipiente puede dar lugar a diferencias significativas en los porcentajes de disolución que originen una diferente velocidad de absorción. Sin embargo, debemos decir que las

¹⁸⁶ Álvarez, C., Torrado, J.J., Cadórniga, R. Stereoselective drug release from ketoprofen and ricobendazole matrix tablets. *Chirality*, 11, 611-615, (1999).

¹⁸⁷ Solinis, M.A., de la Cruz, Y., Hernández, R.M., Gascón, A.R., Calvo, B., Pedraz, J.L. Release of ketoprofen enantiomers from HPMC K100M matrices-diffusion studies. *Int. J. Pharm.* (in press).

¹⁸⁸ Aubry, A.F., Wainer, I.W. An in vitro study of the stereoselective dissolution of (rac)-verapamil from two sustained release formulations. *Chirality*, 5:84-90, (1993).

¹⁸⁹ Janjikhel, R.K., Adeyeye, C.M. Dissolution of ibuprofen enantiomers from coprecipitates and suspensions containing chiral excipients. *Pharm. Dev. Tech.* 4: 9-17, (1999).

¹⁹⁰ Srichana, T., Suedee, R. Evaluation of stereoselective dissolution of racemic salbutamol matrices prepared with commonly used excipients and 1H-NMR study. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27(5),457-464, (2001).

diferencias en la velocidad de cesión descritas en los trabajos consultados han sido nulas o muy pequeñas.

Los éteres de celulosa son los polímeros con mayores aplicaciones en el campo de las formas orales de liberación sostenida, concretamente la HPMC es el polímero más utilizado para controlar la liberación de fármacos. Para nuestro estudio hemos seleccionado la HPMC 15 como excipiente quiral para la elaboración de matrices hidrófilas. La principal característica de este tipo de matrices es que la liberación del fármaco se realiza por una combinación de procesos: difusión del principio activo a través de la barrera gel formada tras la hidratación del polímeros y erosión superficial de dicha barrera. Las propiedades de la HPMC para provocar cesión enantioselectiva de fármacos con propiedades quirales fueron descritas por Duddu et al.¹⁹¹ al estudiar la liberación del propranolol de matrices elaboradas con la HPMC E4M. Tras diversos estudios llegan a la conclusión de que la cesión se debe a la diferencia producida en la difusión de cada uno de los enantiómeros a través de la barrera, ya que la erosión que se produce en la matriz no tiene carácter estereoselectivo.

Por otro lado, los mecanismos de liberación de fármacos solubles a partir de matrices elaboradas con diferentes variedades de la HPMC (Methocel ®) fueron estudiadas por Pham et al.¹⁹². Teniendo en cuenta que existen cuatro variedades de Methocel ® denominadas con las letras E, F, K y J, correspondientes a HPMC con diferentes grados de viscosidad, siendo la K y J las que proporcionan la mayor viscosidad. Pham et al. estudiaron concretamente los Methocel ® K4M, K15M y K100M cuya viscosidad nominal en dispersiones acuosas al 2% es 4.000, 15.000 y 100.000 cps respectivamente. Se llega a la conclusión de que la liberación de los fármacos solubles en agua, como por ejemplo el sulfato de salbutamol, está regulada principalmente por un proceso de difusión controlado a su vez por el hinchamiento del polímero, particularmente para las matrices elaboradas con las celulosas que poseen la mayor viscosidad. Por este motivo y teniendo en cuenta que la posible liberación enantioselectiva depende de la difusión, hemos seleccionado la variedad 15 para la elaboración de las formulaciones utilizadas en este estudio.

¹⁹¹ Duddu, S.P., Vakilynejad, M., Jamali, F., Grant, D.J.W. Stereoselective dissolution of propranolol hydrochloride from hydroxypropylmethylcellulose matrices. *Pharm. Res.* 10Ñ 1648-1653, (1993).

También se realizaron matrices hidrófilas utilizando un polímero sin propiedades quirales, para comparar los resultados obtenidos en ambas condiciones. Theis et al.¹⁹³ realizaron ensayos comparativos entre la cesión de fármacos a partir de matrices elaboradas con distintos tipos de excipientes. El excipiente no quiral seleccionado fue un polimetacrilato, en concreto el EUDRAGIT RL, que provoca la formación de matrices hidrófilas de cesión sostenida, y que ha sido debidamente descrito en la *Parte Teórica*.

Todos y cada uno de los lotes de comprimidos realizados con los distintos fármacos, fueron estudiados desde el punto de vista farmacotécnico, en cuanto a la uniformidad de masa y contenido, resistencia a la rotura y dimensiones. Dichos ya aunque han sido mencionados en el apartado de *Materiales y Métodos*.

¹⁹² Pham, A.T., Lee, P.I. Probing the mechanisms of drug release from hydroxypropylmethylcellulose matrices. *Pharm. Res.* 2, 1379-1384, (1994).

¹⁹³ Theis DL, Lucisano LJ, Halstead GW. Use of stable isotopes for evaluation of drug delivery systems: comparison of ibuprofen release in vivo and in vitro from two biphasic release formulations utilizing different rate-controlling polymers. *Pharm. Res.* 11(8),1069-1176, (1994).

8.1. KETOPROFENO

Los resultados descritos en este apartado corresponden a las formulaciones de rac-KP, R(-)-KP, S(+)-KP y MF (1:1) de ambos enantiómeros descritas en el apartado de *Materiales y Métodos*. La nomenclatura de las formulaciones consta de una letra (inicial del nombre de fármaco, en este caso K) y un subíndice numérico que caracteriza a cada formulación.

8.1.1. Comprimidos de rac-Ketoprofeno (K_1) con HPMC 15.

La figura 97 recoge los perfiles de disolución de los enantiómeros de la forma rac-KP para la formulación elaborada con HPMC 15, y denominada K_1 .

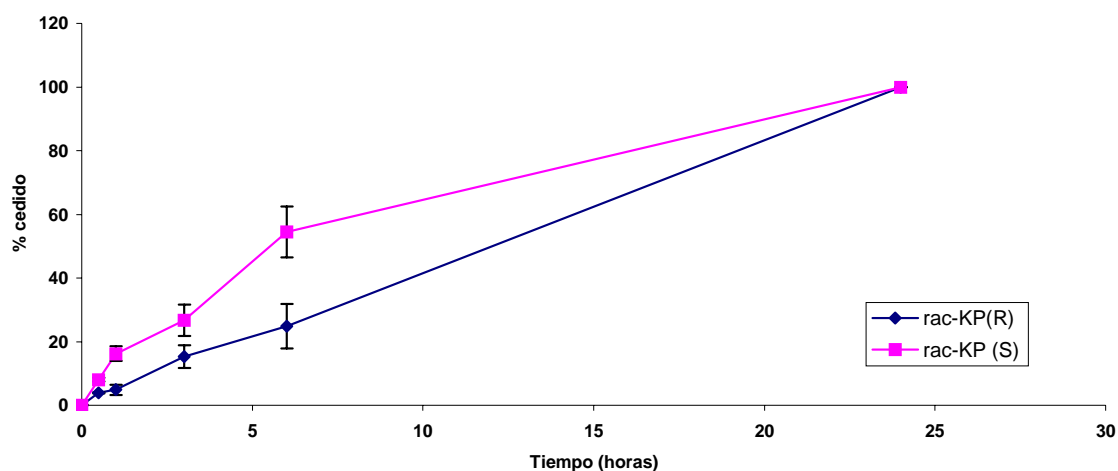


Figura 97. Porcentaje liberado de R(-) y S(+) de una matriz de 200 mg de rac-KP y HPMC 15 frente al tiempo.

Se observó una cesión sostenida para ambos enantiómeros de la forma rac-KP desde el inicio y hasta las 24 horas de duración del ensayo, donde el resultado hallado corresponde al 100%. Tal y como se esperaba el perfil obtenido es característico de una disolución dependiente de la difusión del fármaco a través de la matriz, que coincide con aquel obtenido previamente por otros autores¹⁹⁴.

Los datos del porcentaje liberado frente al tiempo se ajustaron a la ecuación no lineal $(W_t/W_\infty) = Kt^n$. Los valores obtenidos, para K (constante de velocidad de disolución) y n (exponente) se muestran en la tabla 72.

Tabla 72. Valores de los parámetros cinéticos obtenidos para la formulación K₁. (Media ± D.E.)

	K (%h ⁻ⁿ)	n	r ²
R(-)-KP	6.00 ± 0,95	0.78 ± 0,06	0.986
S(+)-KP	14.82 ± 1,48	0.71 ± 0,12	0.987

Los valores de la constante K mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los enantiómeros de la formulación elaborada con la forma rac-KP, siendo el enantiómero S(-)-KP el que posee una mayor velocidad de liberación a través de la matriz. La formulación libera los enantiómeros de KP de manera anómala, ya que el valor de n fue de 0.78 y 0.71 respectivamente, en el que interviene tanto la difusión del fármaco como la erosión de la matriz. La alta velocidad utilizada para realizar el ensayo (150 r.p.m.) facilita la erosión de la matriz y por tanto la cesión de los enantiómeros de KP al medio, debido a que su baja hidrosolubilidad dificulta la difusión del fármaco a través de la matriz.

A la vista de los resultados obtenidos, observamos la aparición de una posible interacción enantioselectiva entre los enantiómeros de rac-KP y la HPMC 15, durante la difusión, que da lugar a interacciones quirales encontradas, tanto en el porcentaje liberado (figura 99) como en los parámetros cinéticos entre los enantiómeros (tabla 72). Según los resultados obtenidos podemos hablar de una mayor interacción del enantiómero R(-)-KP con la HPMC 15, que retarda su difusión al exterior, en comparación con los resultados obtenidos para el S(+)-KP cuya cesión es mayor en todos los casos estudiados, excepto a las 24 horas en el que se encontró un 100% cedido para ambos enantiómeros. Las diferencias encontradas en cuanto a la cesión de los enantiómeros a través de la matriz de HPMC 15 son de carácter estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

¹⁹⁴ Bonferoni, M.C., Caramella, C., Sangalli, M.E., Conte, U., Hernandez, R.M., Pedraz, J.L. Rheological behaviour of hydrophilic polymers and drug release from erodible matrices. *J. Control. Rel.* 18, 205-212, (1992).

Existen citas bibliográficas, que describen resultados similares. Por ejemplo, Duddu et al.¹⁹⁵ estudiaron la disolución de los enantiómeros del propranolol a partir de matrices elaboradas con otro tipo de HPMC, tipo E4M. Ellos observaron también pequeñas diferencias en cuanto al porcentaje liberado entre los enantiómeros. Concluyen destacando que la diferencia observada en la liberación depende única y exclusivamente de la distinta difusión de los enantiómeros de salbutamol a través de la barrera quiral hidratada próxima a la matriz quiral y/o podría reflejar una diferencia en la constante de complejación de cada enantiómero con el excipiente quiral en la capa hidratada, ya que el otro mecanismo implicado en la liberación, la erosión de la matriz, no posee, en ningún caso, carácter enantioselectivo.

8.1.2. Comprimidos de R(-)-Ketoprofeno (K₃) y S(+)-Ketoprofeno (K₄) con HPMC 15

A diferencia del estudio anterior, aquí se utilizan distintos materiales de partida, según sea el R(-)-KP o el S(+)-KP. En la figura 100, se recogen las curvas de porcentaje liberado frente al tiempo del R(-)-KP (enantiómero puro) y S(+)-KP (enantiómero puro), para las formulaciones elaboradas con HPMC 15 como excipiente, y denominadas respectivamente K₃ y K₄. Hemos incluido los resultados de ambas formulaciones de enantiómeros puros en la misma figura para observar las posibles repercusiones en cuanto a interacciones y difusión enantioselectiva observada en el apartado anterior.

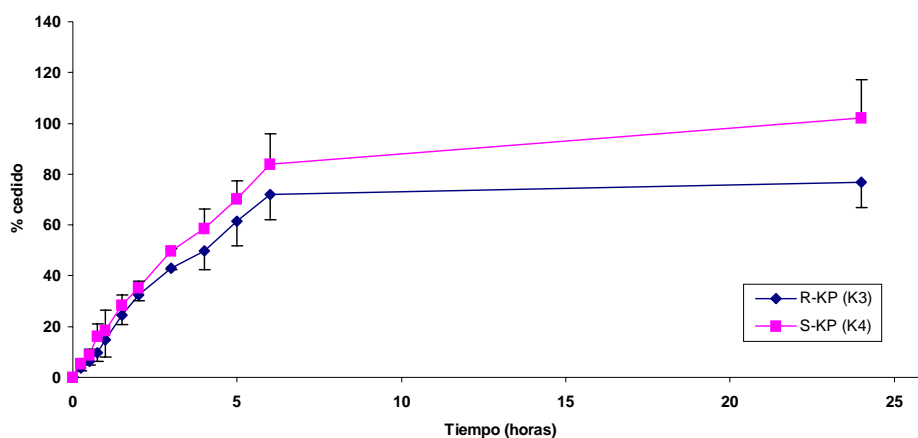


Figura 98. Porcentaje liberado frente al tiempo de matrices de HPMC 15 de 100 mg de R(-)-KP (K₃) y S(+)-KP (K₄).

¹⁹⁵Duddu, S.P., Vakilynejad, M., M., Jamali, F., Grant, D.J.W. Stereoselective dissolution of propranolol hydrochloridhre from hydroxypropylmethylcellulose matrices. Pharm. Res. 10, 1648-1653, (1993).

A la vista de los resultados obtenidos, y al igual que en el caso anterior observamos que el perfil de cesión obtenido para ambos enantiómeros de KP en sus correspondientes matrices de HPMC 15 K_3 y K_4 , se ajusta perfectamente a una liberación controlada, a lo largo de toda la duración del ensayo.

Los datos del porcentaje liberado frente al tiempo se ajustaron a la ecuación no lineal $(W_t/W_\infty) = Kt^n$. Los valores obtenidos, para K (constante de velocidad de disolución) y n (exponente) se muestran en la tabla 73.

Tabla 73. Valores de los parámetros cinéticos obtenidos para las formulaciones K_3 y K_4 . (Media \pm D.E.)

	K ($\%h^{-n}$)	n	r^2
R(-)-KP (Puro)	18.07 ± 1.91	$0.86 \pm 0,05$	0.996
S(+)-KP (Puro)	18.20 ± 1.46	0.96 ± 0.09	0.994

Según los parámetros farmacocinéticos, según el valor de K la velocidad de liberación es similar en ambos enantiómeros. La liberación de los enantiómeros puros de las matrices HPMC 15 se realiza, nuevamente, por medio de un transporte anómalo. Dicho transporte es debido tanto a la difusión del fármaco a través del polímero, o bien a través de la erosión de la matriz. Como ya dijimos en el apartado anterior, debido a la baja solubilidad del KP, y la alta velocidad utilizada para realizar el ensayo (150 r.p.m.) que provoca la erosión de la matriz y por tanto, siendo ésta principal responsable de la liberación de los enantiómeros al medio.

De nuevo podemos, hablar de la aparición de una interacción quiral entre el enantiómero R(-)-KP y la HPMC 15, de ahí los resultados obtenidos de cesión menor, a todos los tiempos de toma de muestra. Incluso a las 24 horas, para esta matriz que contiene 100 mg de rac-KP no se produciría una cesión del 100% de R(-)-KP. Sin embargo, para el enantiómero S(+)-KP se observa una difusión mayor que se refleja, en el mayor porcentaje de S(+)-KP cedido al medio de disolución.

8.1.3. Comprimidos de una mezcla física de R(-)-Ketoprofeno y S(+)-Ketoprofeno(1:1) con HPMC 15 (K₂) y Eudragit RL (K₅).

La figura 99 representa el porcentaje cedido para la formulación elaboradas con la mezcla física (MF) de 200 mg de R(-)-KP y S(+)-KP en proporción 1:1 para la formulación elaborada con HPMC 15, y denominada K₂.

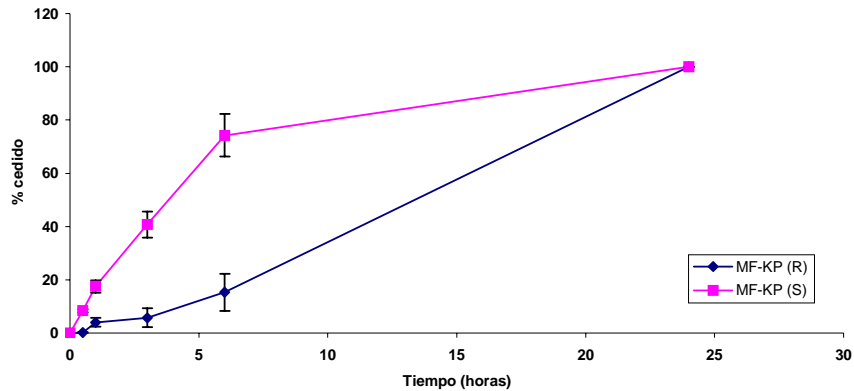


Figura 99. Porcentaje cedido de R-KP y S-KP de una matriz hidrófila de HPMC 15.

Como se puede observar, en la figura 101, se muestra el perfil de cesión de los enantiómeros de KP a lo largo de todo el ensayo. Como ya hemos señalado anteriormente, se trata de un perfil dependiente de la difusión del fármaco a través de la matriz. El perfil de liberación corresponde de nuevo al tipo de “liberación sostenida” para ambos enantiómeros.

Por otro lado, los datos del porcentaje liberado frente al tiempo se ajustaron a la ecuación no lineal $(W_t/W_\infty) = Kt^n$. Los valores obtenidos, para K (constante de velocidad de disolución) y n (exponente) se muestran en la tabla 74.

Tabla 74. Valores de los parámetros cinéticos obtenidos para la formulación K₂. (Media ± D.E.)

	$K (\%h^{-n})$	n	r^2
R-KP (Puro)	1.13 ± 0.06	1.59 ± 0,09	0.892
S-KP (Puro)	16.11 ± 2.02	0.85 ± 0,08	0.998

A la vista de los resultados farmacocinéticos obtenidos, podemos decir que para el enantiómero S(+)-KP, el comportamiento en cuanto a la velocidad y forma de liberación podemos decir que se comporta de la misma forma que en los casos anteriormente estudiados. Siendo la forma de liberación según la n de tipo anómalo, siendo tanto la difusión del fármaco como la erosión de la matriz responsables de la cesión de éste al medio. Volvemos a señalar que las 150 r.p.m. utilizadas para realizar los ensayos del KP fármaco poco soluble en agua, facilitan la erosión de la matriz y por tanto facilitan la cesión de éste al medio.

Sin embargo los resultados obtenidos para el enantiómero R(-)-KP son significativamente diferentes ($p < 0.05$) a los obtenidos para su homólogo, S(+)-KP. La velocidad de liberación es menor (K), y la n presenta un valor de 1.59, tipo Super Caso II. La curva (figura 101) para el enantiómero R(-)-KP tiene tendencia a linealizarse y presentar un mecanismo de liberación de orden cero, ello se debe a que el mecanismo predominante que controla la liberación del fármaco sea la erosión superficial de la matriz y no la difusión fickiana, contribuyendo como ya hemos dicho anteriormente, la baja la solubilidad del fármaco. Estos resultados coinciden con aquellos obtenidos por otros autores, Pérez Marcos et al.¹⁹⁶ al estudiar la cinética de liberación de fármacos a partir de matrices elaboradas con carbomer.

Al igual, que en los casos estudiados anteriormente la interacción quiral que se produce entre el enantiómero R(-)-KP y la matriz quiral de HPMC 15 es mayor que con el enantiómero S(+)-KP, y de ahí la mayor cesión obtenida de este último a lo largo de todo el ensayo. Debemos decir que en este caso, a pesar de que las proporciones de la MF cumplen las proporciones 1:1 de la mezcla racémica, los resultados obtenidos cuando estudiamos la solubilidad de los enantiómeros de KP, procedentes de los productos puros y procedentes de la mezcla racémica los resultados obtenidos fueron siempre mayores para los productos puros. Debemos decir que esta diferencia encontrada entre uno y otro bajo estas condiciones, se trata de condiciones *no sink* o saturación que favorece también la aparición de dichas diferencias enantioselectivas.

La figura 100 muestra los resultados de S/R ratio a diferentes tiempos de las formulaciones K₁ y K₂, para observar si es cierto que las diferencias de solubilidad pueden afectar a la velocidad de disolución.

¹⁹⁶ Pérez Marcos, B., Gutiérrez, C., Gómez-Amoza, J.L., Martínez-Pacheco, R., Souto, C., Concheiro, A. Usefulness of certain varieties of carbomer in the formulation of hydrophilic furosemide matrices. Int. J. Pharm 67, 113-117, (1991).

A la vista de los resultados obtenidos, y si no hubiese diferencias de cesión entre R(-)-KP y S(+)-KP, el S/R ratio debería ser cercano a la unidad. Como se puede observar en la figura 100, en ambas formulaciones existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la cesión de ambos enantiómeros. En ambos casos el enantiómero S(+)-KP es cedido más rápido que el enantiómero R(-)-KP.

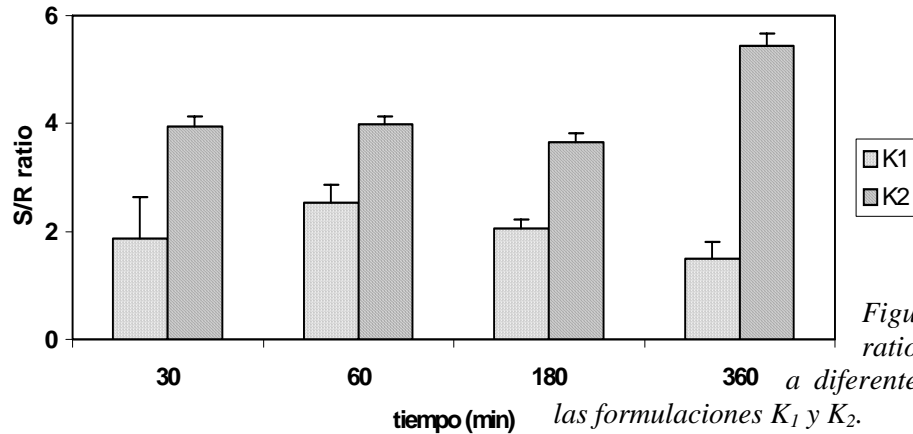


Figura 100. S/R ratio de KP cedido a diferentes tiempos para las formulaciones K_1 y K_2 .

La figura 102 también nos muestra que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el S/R ratio de la formulación K_1 (formulación elaborada con el racemato) y la formulación K_2 (formulación elaborada con la mezcla física 1:1), siendo la K_2 la que muestra mayor estereoselectividad en cuanto a la cesión de los enantiómeros. A partir de aquí todas las matrices elaboradas se realizarán con la mezcla física de ambos enantiómeros.

A continuación se presentan los perfiles de cesión obtenidos para los enantiómeros de R(-)-KP y S(+)-KP, pertenecientes a una MF (1:1) elaborada con otro excipiente que provoca una cesión sostenida similar a la HPMC 15, el Eudragit RL (K_5) (figura 103), y que no posee centros asimétricos en su estructura. Por tanto, no provocará interacciones enantioselectivas.

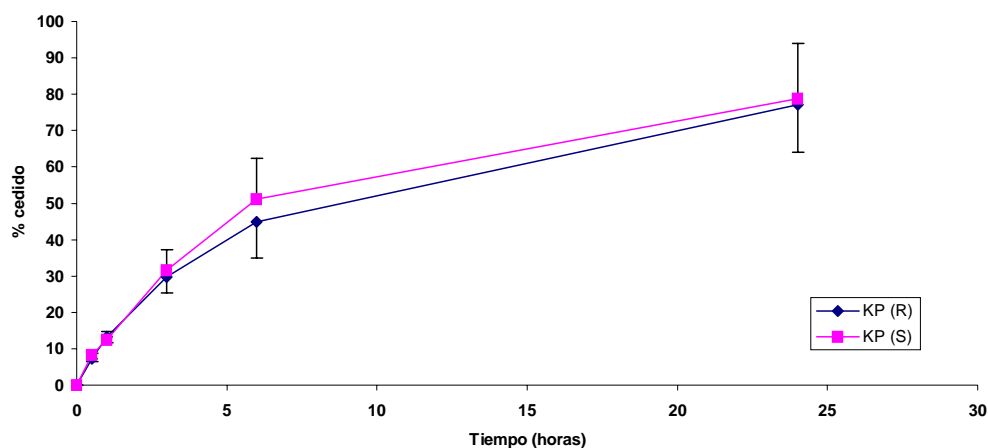


Figura 101. Porcentaje cetido de R(-)-KP y S(+)-KP de una matriz hidrófila de Eudragit RL.

Como se puede observar en la figura 101, la cesión de los enantiómeros de KP a través de la matriz hidrófila elaborada con Eudragit RL ofrece una cesión característica de disolución dependiente de la difusión del fármaco a través de la matriz. En este caso no encontramos diferencias enantioselectivas significativas ($p > 0.05$), a ninguno de los tiempos estudiados.

Por otro lado, los datos del porcentaje liberado frente al tiempo se ajustaron a la ecuación no lineal $(W_t/W_\infty) = K_t^n$. Los valores obtenidos, para K (constante de velocidad de disolución) y n (exponente) se muestran en la tabla 75.

Tabla 75. Valores de los parámetros cinéticos obtenidos para la formulación K_5 . (Media \pm D.E.).

	K ($\%h^{-n}$)	N	r^2
R(-)-KP (Puro)	16.39 ± 1.54	$0.74 \pm 0,13$	0.996
S(+)-KP (Puro)	16.91 ± 1.97	$0.75 \pm 0,21$	0.998

Como se puede observar en la tabla 75, los resultados obtenidos para la formulación de elaborada con el excipiente aquiral, obtenemos unos parámetros de velocidad de liberación similares a aquellos obtenidos para las formulaciones elaborada con los enantiómeros puros (K_3 y K_4). La velocidad de liberación será similar en ambos casos, la n ofrecerá la información sobre el tipo de

liberación que poseen, que será de tipo anómalo, influyendo ambos factores, tanto la erosión como la difusión del fármaco a través de la matriz.

A continuación, y para observar las diferencias que existen en la cesión de los enantiómeros en ambos tipos de matrices, mostramos, la figura 102, que representa el S/R ratios de las figuras mostradas anteriormente en la figura 99 y figura 101

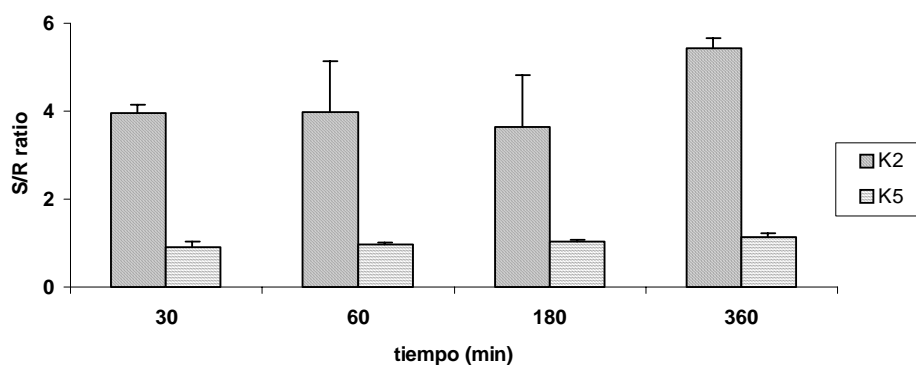


Figura 102. S/R ratio de los enantiómeros de KP a diferentes tiempos para la matriz de HPMC 15 (K_2) y de Eudragit RL (K_5).

A la vista de los resultados obtenidos en la figura 102, aunque el ratio encontrado a todos los tiempos estudiados y en ambos tipos de formulaciones, siempre fue superior a 1, tan sólo se encontraron diferencias enantioselectivas ($p < 0.05$) en cuanto a la cesión de los enantiómeros en la matriz de HPMC 15.

En la bibliografía podemos encontrar diferentes estudios con otros fármacos quirales y la HPMC, donde se observan resultados dispares según los autores y el tipo de fármaco estudiado. Por ejemplo, se hallaron diferencias significativas entre los enantiómeros del clorhidrato de propanolol¹⁹⁷, cuando se utiliza la HPMC como excipiente de elección en la elaboración de matrices.

Por otro lado, Solinis et al.¹⁹⁸ para el sulfato de salbutamol no encontraron diferencias enantioselectivas entre los enantiómeros de dicho fármaco. Las diferencias en cuanto a los resultados encontrados por los distintos autores pueden ser debidas a las diferentes solubilidades de los fármacos en estudio. Por ejemplo el sulfato de salbutamol es una molécula que posee una muy baja solubilidad en agua (aproximadamente 25%) y el efecto del enantiomerismo encontrado para ella no fue de carácter relevante. Sin embargo, para otras moléculas, propanolol o verapamil, que poseen una

¹⁹⁷ Duddu, S.P., Vakilynejad, M., Jamali, F., Grant, D.J.W. Stereoselective dissolution of propanolol hydrochloride from HPMC matrices. *Pharm. Res.* 10(11), 1648-1653, (1993).

¹⁹⁸ Solinis, M.A., Lugará, S., Calvo, B., Hernández, R.M., Gascón, A.R., Pedraz, J.L. Release of salbutamol sulfate enantiomers from HPMC matrices. *Int. J. Pharm.* 161, 37-43, (1998)

solubilidad mucho menor en agua (aproximadamente 5%), se encontraron diferencias enantioselectivas de carácter significativo.

Siguiendo este razonamiento, el KP es incluso menos soluble en agua (aproximadamente 0.03%) y a la vista de los resultados obtenidos y mostrados con anterioridad puede ser más susceptible de tener este efecto enantioselectivo.

8.1.4. Comprimidos de una mezcla física de R(-)-Ketoprofeno y S(+)-Ketoprofeno (1:1) con HPMC 15 a distintas concentraciones

Como ya hemos dicho anteriormente dichas diferencias enantioselectivas además de ser debidas a una interacción enantioselectiva más fuerte para el enantiómero R(-)-KP, pueden ser también debidas a la baja solubilidad de los enantiómeros de KP, y al efecto “no sink” o de saturación del medio. Para ello se elaboraron otras matrices que contenían la mezcla física pero en menor proporción. La composición de las matrices que serán utilizadas en este apartado se encuentran descritas en el apartado de *Materiales y Métodos*, y son denominadas K₆, K₇ y K₈.

Como se puede observar, la composición de dichas matrices es proporcional a la formulación K₂, con el fin de que todas ellas mantengan una similitud entre la dosis que contengan y la superficie de la matriz.

Los perfiles de cesión para cada una de las matrices, se muestran en las siguientes figura:

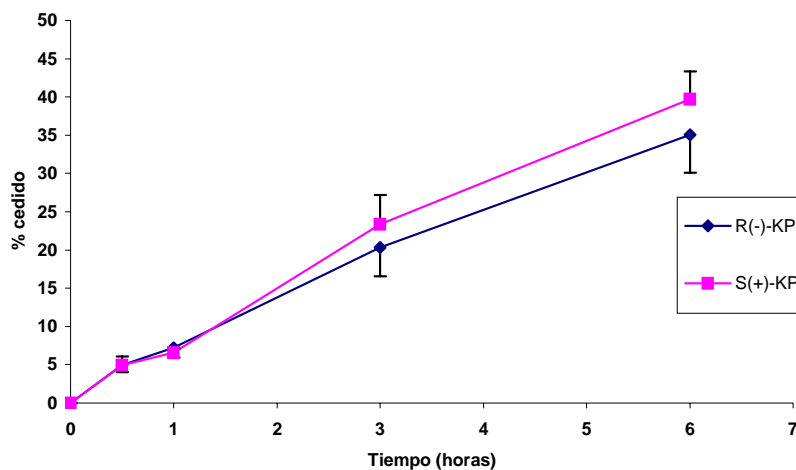


Figura 103. Porcentaje cedido de R(-)-KP y S(+)-KP de una matriz hidrófila de HPMC 15, que contiene 100 mg de la MF.

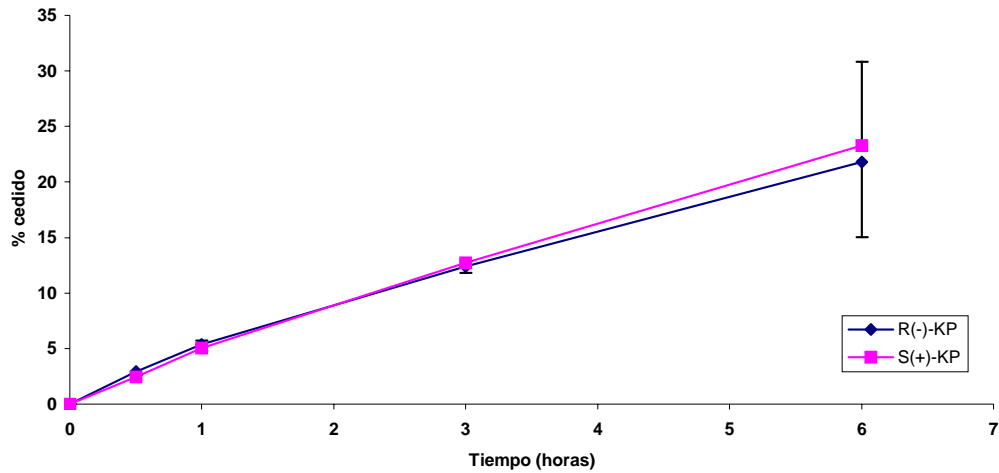


Figura 104. Porcentaje cedido de R(-)-KP y S(+)-KP de una matriz hidrófila de HPMC 15, que contiene 50 mg de la MF.

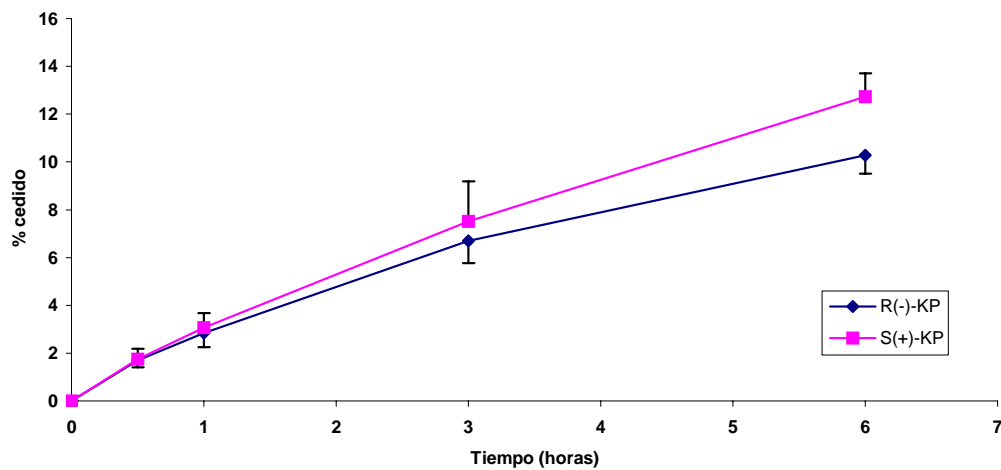


Figura 105. Porcentaje cedido de R(-)-KP y S(+)-KP de una matriz hidrófila de HPMC 15, que contiene 25 mg de la MF.

A la vista de los resultados obtenidos para las figuras 103, 104 y 105, el perfil de cesión de los enantiómeros de KP sigue siendo una liberación lenta. Por otro lado observamos que la riqueza de los comprimidos tiene un efecto directo en el porcentaje de fármaco cedido. La cantidad cedida al medio aumenta según aumenta la dosificación de la matriz.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Suedee et al.¹⁹⁹ donde destacan la cesión enantioselectiva de S(+)-KP, S-ibuprofen y R-propranolol a partir de gránulos tipo MIP's.

Por otro lado, los datos del porcentaje liberado frente al tiempo se ajustaron a la ecuación no lineal $(W_t/W_\infty) = Kt^n$. Los valores obtenidos, para K, para las tres formulaciones (constante de velocidad de disolución) y n (exponente) se muestran en la tabla 76.

Tabla 76. Valores de los parámetros cinéticos obtenidos para las distintas formulaciones. (Media \pm D.E.).

Formulación		$K (\% h^{-n})$	n	r^2
100 mg	R(-)-KP	20.38 \pm 1.02	0.89 \pm 0.03	0.953
	S(+)-KP	23.04 \pm 1.73	0.80 \pm 0.05	0.981
50 mg	R(-)-KP	20.50 \pm 0.86	0.91 \pm 0.01	0.996
	S(+)-KP	23.86 \pm 0.99	0.80 \pm 0.11	0.998
25 mg	R(-)-KP	24.04 \pm 0.81	0.81 \pm 0.04	0.999
	S(+)-KP	27.98 \pm 1.93	0.76 \pm 0.01	0.999

Como se puede observar en la tabla 76 los resultados de velocidad de liberación y forma de liberación son similares entre si, mostrando una velocidad de liberación aceptable en todos los casos, y una forma de liberación de tipo anómala, similar a la encontrada en prácticamente todos los casos anteriores. De nuevo la liberación será debida tanto a la difusión de los enantiómeros a través del polímero como a la erosión de la matriz durante el ensayo. Este último paso se considera el más probable para un fármaco poco soluble como es el KP, siendo la velocidad de giro del ensayo de 150 r.p.m.

¹⁹⁹ Suedee, R., Srichana, T., Rattananont, T. Enantioselective release of controlled delivery granules based on molecularly imprinted polymers. Drug Deliv., 9(1), 19-30, (2002).

Para observar la estereoselectividad en función de la dosis y de la concentración en el medio, calculamos los ratios para las matrices de 200 mg (K_2), 100 mg (K_6), 50 mg (K_7) y 25 mg (K_8). La figura 106 recoge los resultados obtenidos:

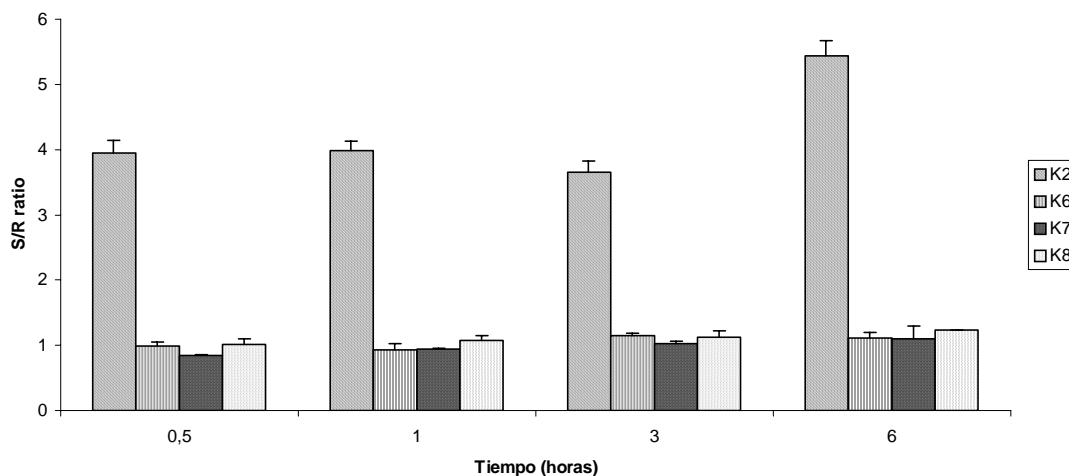


Figura 106. S/R ratio de KP a diferentes tiempos, en las diferentes formulaciones; 200 mg (K_2), 100 mg (K_6), 50 mg (K_7) y 25 mg (K_8)

Como se puede observar en la figura 108, cuando se disminuye la dosis de la MF de los enantiómeros en las formulaciones, y por tanto las condiciones de cesión se producen en un ambiente que se acerca a las condiciones “sink”, el efecto del enantiomerismo en la cesión disminuye. Así vemos que el S/R ratio obtenido para las formulaciones que contienen 100 mg (K_6), 50 mg (K_7) y 25 mg (K_8), de la mezcla física (1:1) de ambos enantiómeros es cercano a uno y por tanto se considera que la estereoselectividad bajo esas condiciones es muy baja.

Bajo nuestras condiciones, la estereoselectividad aparece cuando se trabaja en condiciones “no sink” y en dosis altas de fármaco incluido en la matriz. Diferentes resultados fueron encontrados por Solinis M.A.²⁰⁰ en los estudios realizados para la cesión de los enantiómeros de KP a través de matrices elaboradas con HPMC K100M. En dicho estudio de investigación las diferencias enantioselectivas encontradas fueron mínimas en todos los casos. Este hecho es posible debido a que las condiciones de trabajo fueron diferentes, la dosis de principio activo incluido en las formulaciones fue muy baja (9.6 mg), cumpliéndose por tanto, condiciones “sink” en todos los ensayos realizados.

Por otro lado, otro estudio encontrado en la bibliografía²⁰¹, habla de la liberación de los enantiómeros de KP a partir de formulaciones elaboradas con HPMC K100M se ve condicionada por la solubilidad del fármaco en función del pH del comprimido. Los pH de los comprimidos en este

²⁰⁰ Solinis Aspiazu, M.A. Liberación de los enantiómeros de Salbutamol y Ketoprofeno a partir de matrices elaboradas con excipientes quirales. Tesis Doctoral. Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad del País Vasco. (2000).

²⁰¹ Solinis, M.A., de la Cruz, Y., Hernández, R.M., Gascón, A.R., Calvo, B., Pedraz, J.L. Release of ketoprofen enantiomers from HPMC K 100M mstrices-difussion studies. Int. J. Pharm. (in press).

estudio son pH 2.5 y pH 10, y comprimidos sin tamponar. Los resultados obtenidos muestran la existencia de una relación directa entre el pH y la cesión del fármaco de la matriz. Además en dicho estudio también se observan diferencias en el porcentaje liberado y en los parámetros cinéticos de los enantiómeros que muestran una interacción de la HPMC preferentemente con el S(+)-KP liberándose por tanto en mayor proporción el enantiómeros R(-)-KP. Por otra parte la relación R/S ketoprofeno de los coeficientes de difusión y del porcentaje liberado para el gel elaborado con la HPMC K100M, se deduce que al eliminar el proceso de erosión del mecanismo global de liberación, se favorece la liberación enantioselectiva del fármaco.

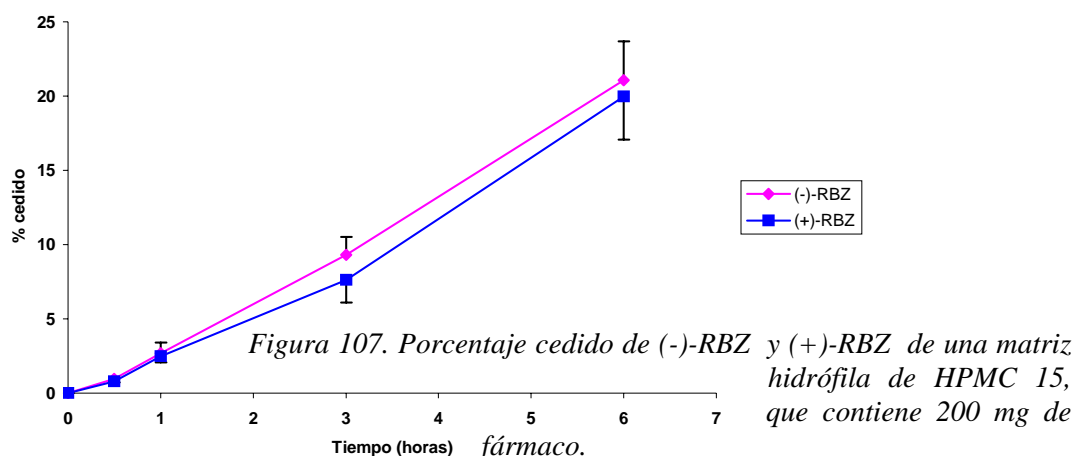
8.2. RICOBENDAZOL

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente para los enantiómeros de KP, estudiaremos la cesión de los enantiómeros de RBZ en las distintas condiciones, descritas en el apartado de *Materiales y Métodos*. En todas las formulaciones elaboradas para el estudio de la cesión de los enantiómeros de RBZ, utilizamos la mezcla racémica, debido a que no existe hasta el momento la posibilidad de conseguir cantidad suficiente de ambos enantiómeros. La nomenclatura de las formulaciones consta de una letra (inicial del nombre de fármaco, en este caso R) y un subíndice numérico que caracteriza a cada formulación.

Previamente estudiaremos la cesión a través de las matrices de tipo quiral, la HPMC 15. Posteriormente se repitieron las condiciones pero sustituyendo el excipiente quiral por uno que no posee dichas propiedades, el Eudragit RL. Finalmente y al igual que con los enantiómeros de KP, se estudió la cesión de los enantiómeros de RBZ de distintas matrices, elaboradas con la HPMC 15, y que poseen distintas dosis del fármaco.

8.2.1. Comprimidos de rac-Ricobendazol (R₁) con HPMC 15.

La figura 107 muestra el perfil de cesión de los enantiómeros de RBZ a partir de una matriz de elaborada con HPMC 15 (400 mg), con una dosis de fármaco de 200 mg



Como se puede observar, en la figura 107, se muestra el perfil de cesión de los enantiómeros de RBZ a lo largo de todo el ensayo. Se trata de un perfil dependiente de la difusión del fármaco a través de la matriz. El perfil de liberación corresponde de nuevo al tipo de “liberación sostenida” para ambos enantiómeros. Las posibles diferencias estereoselectivas serán estudiadas posteriormente y se muestran conjuntamente con los resultados obtenidos con las matrices elaboradas con el excipiente no quiral en la figura 111.

Los datos del porcentaje liberado frente al tiempo se ajustaron a la ecuación no lineal $(W_t/W_\infty) = Kt^n$. Los valores obtenidos, para K (constante de velocidad de disolución) y n (exponente) se muestran en la tabla 77.

Tabla 77. Valores de los parámetros cinéticos obtenidos para la formulación (R₁). (Media \pm D.E.)

	K (%h ⁻ⁿ)	n	r^2
(-)-RBZ	10.39 \pm 1.35	1.24 \pm 0.38	0.890
(+)-RBZ	7.70 \pm 0.54	1.59 \pm 0.54	0.790

Como se puede observar en la tabla 77, existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la velocidad de liberación de ambos enantiómeros. Por otro lado, la forma de liberación corresponde al tipo super caso II, donde la mayor parte de la cesión de fármaco al medio se debe a la erosión de la matriz. Este hecho ha sido también observado anteriormente para los enantiómeros de KP. El RBZ se trata también de un fármaco muy poco soluble en agua y por lo tanto liberación al exterior se verá facilitada por la erosión de la matriz que liberará el principio activo y no por las propiedades intrínsecas de los enantiómeros del RBZ que a su vez se encontrarán en un medio con un pH (7.2) que no favorece su ionización y por tanto su solubilidad.

8.2.2. Comprimidos de rac-Ricobendazol (R₂) con Eudragit RL.

A continuación se muestra la figura 108, que presenta el perfil de cesión de los enantiómeros de RBZ a través de una matriz de Eudragit RL.

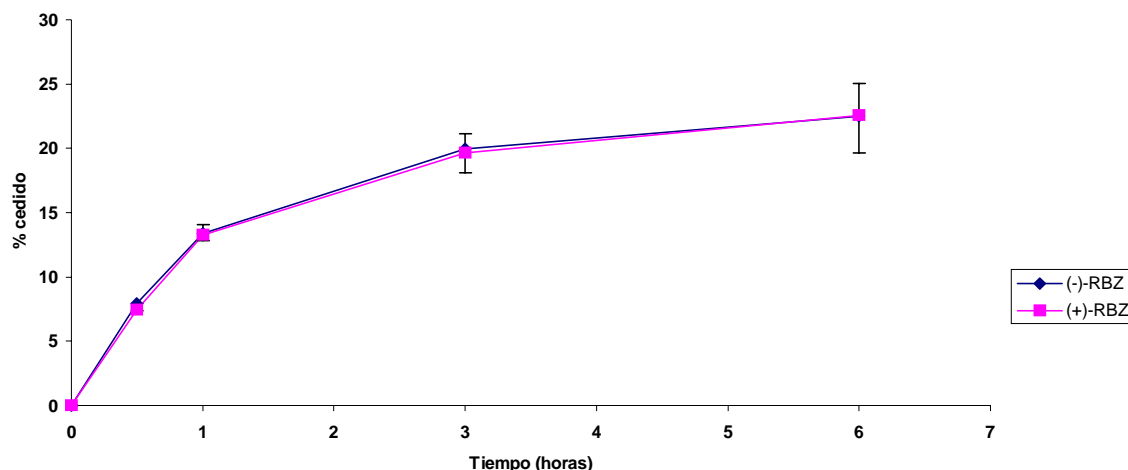


Figura 108. Porcentaje cedido de (-)-RBZ y (+)-RBZ de una matriz hidrófila de Eudragit RL, que contiene 200 mg de fármaco.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos decir que la cesión de los enantiómeros de RBZ a través de la matriz de Eudragit sigue un modelo sigmoideal que corresponde a una cesión sostenida. No existen diferencias enantioselectivas en cuanto a la cesión de uno y otro enantiómero en el proceso de difusión de éstos a través de la matriz.

Tabla 78. Valores de los parámetros cinéticos obtenidos para la formulación (R₂). (Media ± D.E.).

	$K (\%h^{-n})$	n	r^2
(-)-RBZ	53.42 ± 5.67	0.50 ± 0.07	0.960
(+)-RBZ	51.46 ± 4.91	0.52 ± 0.02	0.944

A la vista de los resultados obtenidos, deducimos que la velocidad de liberación es similar para ambos enantiómeros, de una manera adecuada. Por otro lado la liberación del principio activo a partir de este tipo de matriz se realiza por difusión en todos los casos, ya que el valor de n osciló entre 0.50 y 0.52 como se muestra en la tabla 78 donde se recogen los parámetros cinéticos obtenidos tras el ajuste de los datos a la ecuación no lineal. Por tanto, el mecanismo de transporte será Fickiano (Caso I).

Para comparar los resultados obtenidos en ambos tipos de matrices, se compararon los resultados de los enantiómeros cedidos al medio calculando su (-)/(+) ratio.

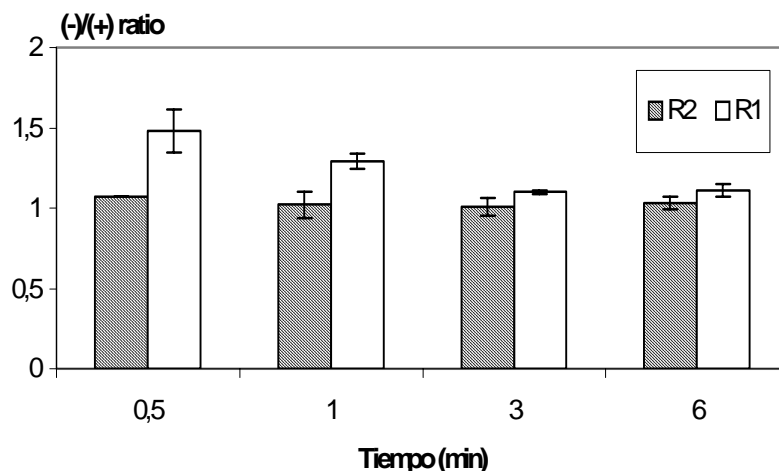


Figura 109. S/R ratio de los enantiómeros de KP a diferentes tiempos para la matriz de HPMC 15 (R_1) y de Eudragit RL (R_2).

Como se puede observar en la figura 109, los resultados correspondientes a los $(-)/(+)$ ratio en ambos casos siempre fue superior a la unidad. Dichas diferencias fueron mayores para la matriz elaborada con HPMC 15, que posee carbonos asimétricos. Se produce una mayor interacción del enantiómero (+) con la HPMC 15 y por tanto una menor cesión de éste al medio, en comparación con el enantiómero (-). Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente para los enantiómeros de KP.

8.2.3. Comprimidos de Ricobendazol con HPMC 15 a distintas concentraciones

Como ya hemos dicho anteriormente dichas diferencias enantioselectivas además de ser debidas a una interacción enantioselectiva más fuerte para el enantiómero (+)-RBZ, pueden ser también debidas a la baja solubilidad de los enantiómeros de RBZ, y al efecto “no sink” o de saturación del medio. Para ello se elaboraron otras matrices que contenían menores dosis. La composición de las matrices que serán utilizadas en este apartado se encuentran descritas en el apartado de *Materiales y Métodos*, y son denominadas R_3 y R_4 .

Los $(-)/(+)$ ratio de RBZ cedidos a diferentes tiempos en las diferentes formulaciones son presentadas en las figura 110.

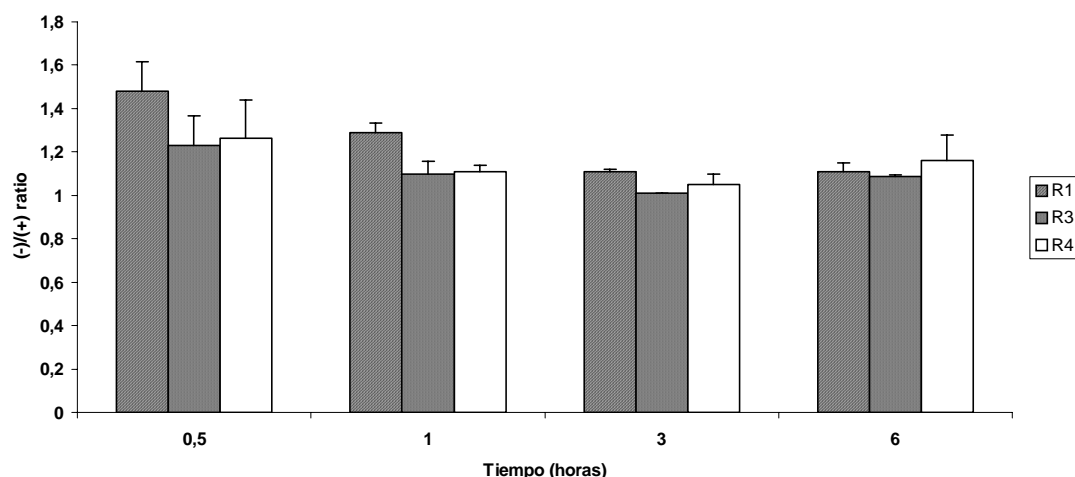


Figura 110. (-)/(+) ratio de RBZ a diferentes tiempos, en las diferentes formulaciones; 200 mg (R_1), 50 mg (R_3) y 20 mg (R_4).

El mismo efecto que el observado para los enantiómeros de KP, es observado aquí para los enantiómeros de RBZ. Para la formulación R_1 el ratio (-)/(+) muestra que el enantiómero (-)-RBZ se disuelve más rápido, desde un punto de vista estadísticamente significativo ($p < 0.05$) que el enantiómero (+). Este hecho puede ser debido a la interacción enantioselectiva producida por el enantiómero y la matriz quirál, pero como ya hemos dicho anteriormente, debido a la baja solubilidad del RBZ y a la alta dosis de los comprimidos, que provocan la pérdida de las condiciones “sink” en el medio.

Para las formulaciones elaboradas con menores dosis de RBZ, (R_3 y R_4), el ratio (-)/(+) es menor y más próximo a 1 que la muestra R_1 . Esto quiere decir que se vuelven a repetir los resultados y por tanto las conclusiones que se ya obtuvieron para los comprimidos de elaborados con KP. Por tanto, a bajas concentraciones de RBZ (50 y 20 mg) se produce un menor efecto de enantiomerismo en la cesión de los enantiómeros, ya que nos alejamos de las condiciones “no sink”.

8.3. TALIDOMIDA

Los resultados descritos en este apartado corresponden a las formulaciones de las formulaciones de rac-TH descritas en el apartado de *Materiales y Métodos*. La nomenclatura de las formulaciones consta dos letras (nombre de fármaco, en este caso TH) y un subíndice numérico que caracteriza a cada formulación.

Previamente estudiaremos la cesión a través de las matrices de tipo quiral, elaboradas con la HPMC 15. Posteriormente se repitieron las condiciones pero sustituyendo el excipiente quiral por uno que no posee dichas propiedades, el Eudragit RL, pero que proporciona una liberación sostenida semejante a la que ofrece la HPMC 15.

Finalmente, y al igual que con los enantiómeros de los fármacos anteriormente estudiados, KP y RBZ, se estudió la cesión de los enantiómeros de TH de distintas matrices elaboradas con la HPMC 15 y que poseen distintas dosis del fármaco.

8.3.1. Comprimidos de rac-Talidomida (TH₁) con HPMC 15 y Eudragit RL (TH₂)

La figura 111 muestra el perfil de cesión de los enantiómeros de TH a partir de una matriz elaborada con HPMC 15 (100 mg), con una dosis de fármaco de 50 mg.

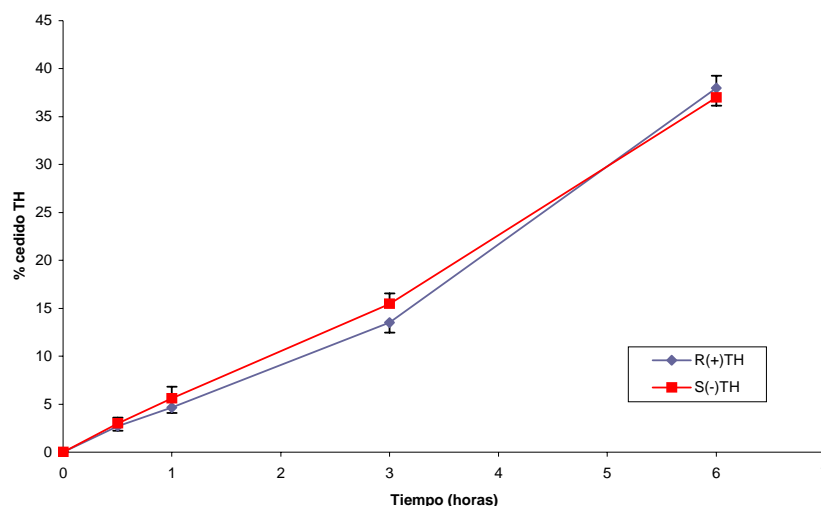


Figura 111. Porcentaje cedido de R(+)-TH y S(-)-TH de una matriz hidrófila de HPMC 15, que contiene 50 mg de fármaco.

Como se puede observar en la figura 111, el perfil de cesión de los enantiómeros de TH es característico de la difusión del fármaco a través de la matriz más que de la erosión de la misma. El perfil corresponde al de tipo “liberación sostenida” para ambos enantiómeros. Las diferencias

estereoselectivas serán estudiadas posteriormente y conjuntamente con los resultados obtenidos con las matrices elaboradas con el excipiente no quirál R(+)/S(-).

Los datos del porcentaje liberado frente al tiempo se ajustaron a la ecuación no lineal $(W_t/W_\infty) = Kt^n$. Los valores obtenidos, para K (constante de velocidad de disolución) y n (exponente) se muestran en la tabla 79.

Tabla 79. Valores de los parámetros cinéticos obtenidos para la formulación (TH₁). (Media \pm D.E.)

	K (%h ⁻ⁿ)	n	r^2
R(+)-TH	12.99 \pm 1.43	0.90 \pm 0.02	0.997
S(-)-TH	15.19 \pm 1.31	0.92 \pm 0.01	0.999

Como se puede observar en la tabla 79, existe una similitud entre la velocidad (K) y la forma de liberación de ambos enantiómeros (n), siendo ésta de tipo anómalo, ello se debe a que los mecanismos predominantes que controlan la liberación del fármaco son la erosión superficial de la matriz y la difusión fickiana, contribuyendo a su vez la baja solubilidad de la TH. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por Siepmann et al.²⁰²

No existe para ninguno de los enantiómeros de la TH una interacción estereoselectiva con el excipiente quirál HPMC 15. Por lo tanto el R(+)/S(-) ratio es cercano a la unidad.

A continuación mostramos el perfil de disolución de los enantiómeros de rac-TH a partir de una matriz elaborada con el excipiente aquiral, Eudragit RL. Los resultados de cesión para ambos enantiómeros se muestran a continuación en la figura 112:

²⁰² Siepmann J, Kranz H, Bodmeier R, Peppas NA. HPMC-matrices for controlled drug delivery: a new model combining diffusion, swelling, and dissolution mechanisms and predicting the release kinetics. Pharm. Res 16(11),1748-1756, (1999).

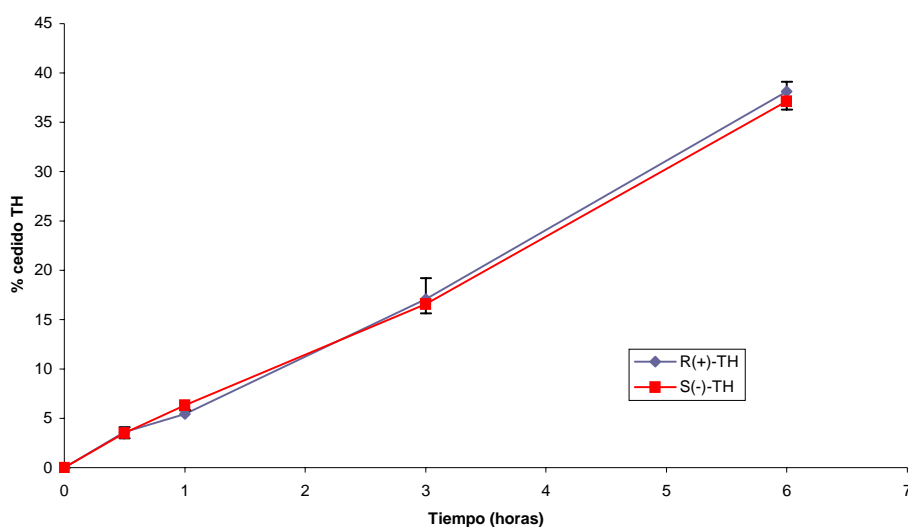


Figura 112. Porcentaje cedido de R(+)-TH y S(-)-TH de una matriz de Eudragit RL.

Como se puede observar en la figura 112, la cesión de los enantiómeros de rac-TH a través de la matriz hidrófila elaborada con Eudragit RL ofrece una cesión característica de disolución dependiente de la difusión del fármaco a través de la matriz. De nuevo, en este caso no encontramos diferencias enantioselectivas ($p > 0.05$) en ninguno de los casos estudiados.

Los datos del porcentaje liberado frente al tiempo se ajustaron a la ecuación no lineal $(W_t/W_\infty) = Kt^n$. Los valores obtenidos, para K (constante de velocidad de disolución) y n (exponente) se muestran en la tabla 80.

Tabla 80. Valores de los parámetros cinéticos obtenidos para la formulación (TH₁). (Media \pm D.E.)

	K (% h^{-n})	n	r^2
R(+)-TH	16.20 \pm 1.32	0.88 \pm 0.21	0.980
S(-)-TH	17.16 \pm 1.45	0.87 \pm 0.23	0.999

Como se puede observar en la tabla 80, las constantes de velocidad de liberación (K) y forma de liberación son muy semejantes a aquellos valores obtenidos para la matriz elaborada con la HPMC 15. Por tanto el mecanismo de liberación en este caso será también de carácter anómalo, debido a la ya comentada difusión fickiana.

A continuación, y para observar las diferencias que existen entre la cesión de los enantiómeros en ambos tipos de matrices, mostramos la figura 113, que representa el R(+)/S(-) ratio de las figuras 111 y 112, es decir de las matrices elaboradas con HPMC15 y Eugragit RL y rac-TH.

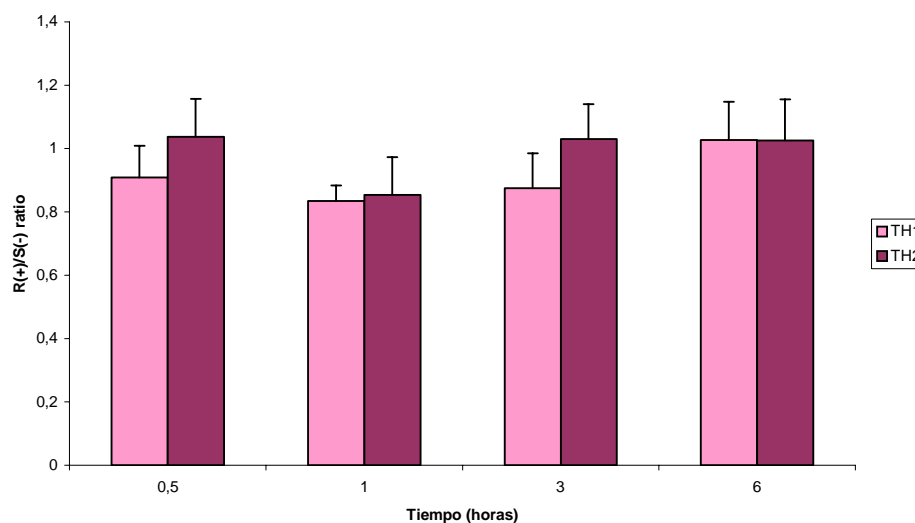


Figura 113. R(+)/S(-) ratio de los enantiómeros de rac-TH a diferentes tiempos para la matriz de HPMC 15 (TH₁) y Eudragit RL (TH₂).

A la vista de los resultados obtenidos en la figura 113, en ambos tipos de matrices y a todos los tiempos estudiados, no existen diferencias enantioselectivas significativas ($p > 0.05$) en cuanto a la cesión de los enantiómeros de rac-TH.

La ausencia de diferencias enantioselectivas puede deberse a la no aparición en medio de condiciones de saturación o efecto “no sink”, debido a que comparativamente con respecto a los fármacos anteriormente estudiados la aparición de dichas condiciones “no sink” provocaban a su vez posibles diferencias en cuanto a la solubilidad de los enantiómeros.

8.3.2. Comprimidos de rac-Talidomida a distintas concentraciones (TH₃ y TH₄)

Se elaboraron matrices que contenían una dosis menor de rac-TH. La composición de las matrices utilizadas en este caso se encuentran apropiadamente descritas en el apartado de *Materiales y Métodos*.

Como se puede observar la composición de las matrices, es en ambos casos proporcional a la formulación TH₁, con el fin de que todas ellas mantengan una similitud entre la dosis que contienen y la superficie de la matriz.

Los perfiles de cesión para cada una de las matrices se muestran en las siguientes figuras:

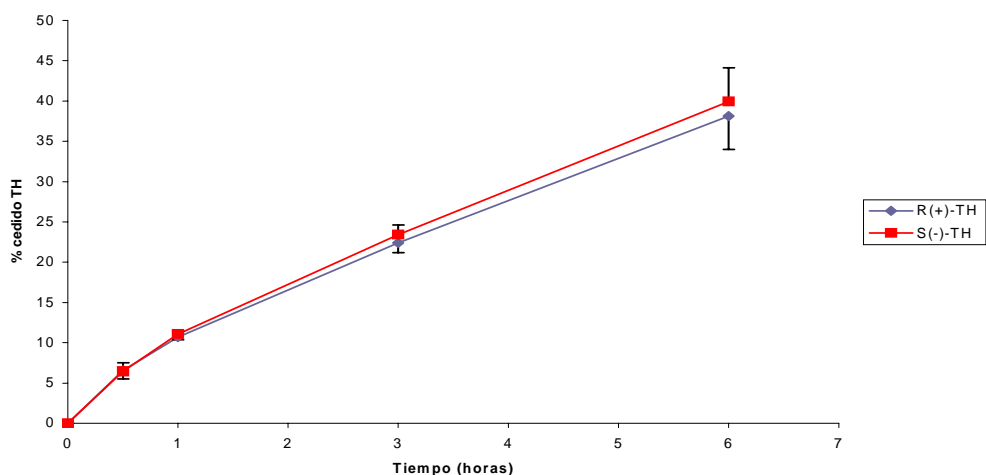


Figura 114. Porcentaje cedido de R(+)-TH y S(-)-TH de una matriz hidrófila de HPMC 15 que contiene 20 mg de rac-TH.

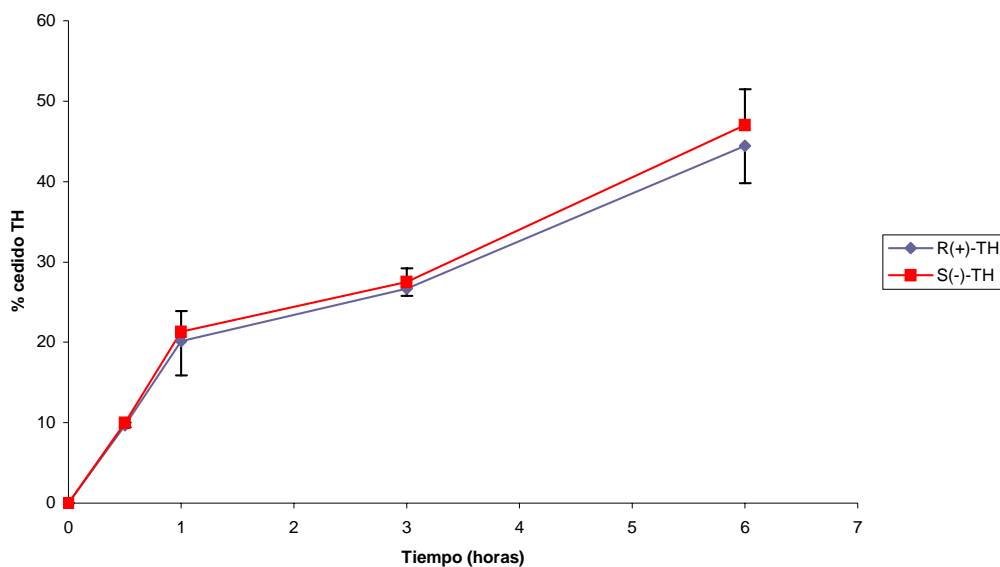


Figura 115. Porcentaje cedido de R(+)-TH y S(-)-TH de una matriz hidrófila de HPMC 15, que contiene 10 mg de rac-TH.

A la vista de los resultados obtenidos en la figura 114 y 115, el perfil de cesión de los enantiómeros de TH sigue siendo similar. La relación está vez es inversamente, cuanto menor es la dosis del fármaco mayor es la cesión al medio.

Los datos del porcentaje liberado frente al tiempo se ajustaron a la ecuación no lineal $(W_t/W_\infty) = Kt^n$. Los valores obtenidos, para K (constante de velocidad de disolución) y n (exponente), en cada caso, se muestran en la tabla 81.

Tabla 81. Valores de los parámetros cinéticos obtenidos para las distintas formulaciones. (Media \pm D.E.).

Formulación		K (% h^{-n})	n	r^2
20 mg	R(+)-TH	27.84 ± 1.12	0.68 ± 0.01	0.999
	S(-)-TH	$29.94 \pm 1,28$	0.71 ± 0.05	0.998
10 mg	R(+)-TH	35.66 ± 1.52	0.53 ± 0.01	0.842
	S(-)-TH	36.33 ± 1.19	0.53 ± 0.04	0.861

Como se puede observar en la tabla 81, la velocidad y forma de liberación dependerá de la dosis del comprimido. En este caso la velocidad de liberación será proporcionalmente mayor cuanto menor sea la dosificación del comprimido, mayor velocidad de liberación para los comprimidos de 20 mg.

Por otro lado el tipo de liberación de forma anómala en las matrices elaboradas con la dosis de 20 mg, por tanto serán responsables de la cesión tanto la erosión como la difusión del fármaco a través de la matriz. Sin embargo la difusión será de tipo Fickiniano (Caso I) para la menor dosis del fármaco (matrices elaboradas con una dosis de 10 mg) y en este caso la liberación del fármaco solo será debido a la difusión del fármaco a través de la misma. Dicho comportamiento puede ser debido al tamaño del comprimido, debido que al ser muy pequeño la erosión del mismo es ciertamente lenta, produciéndose por tanto una mayor trascendencia en los resultados de la difusión del fármaco a través de la misma.

DISCUSIÓN FINAL

El objetivo de esta tesis ha sido determinar la aparición de diferencias enantioselectivas entre los enantiómeros de distintos fármacos: ketoprofeno (KP), ricobendazol (RBZ) y talidomida (TH), desde dos puntos de vista bien diferenciados como son la solubilidad y la velocidad de disolución.

1. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA CRISTALINA

Teniendo en cuenta la importancia que presenta la estructura interna cristalina para justificar los posibles comportamientos se procedió a su estudio detallado por medio de distintas técnicas: determinación del punto de fusión, difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido.

Los resultados obtenidos para cada uno de los fármacos en estudio nos ofrecen los siguientes resultados:

1.1. KETOPROFENO

Se realizó el estudio detallado de su forma racémica, así como de los enantiómeros por separado R(-)-KP y S(+)-KP, además de la mezcla física (MF) de ambos enantiómeros que cumple con la proporción presente en la forma rac-KP (1:1). Debido a que tuvimos suficiente cantidad de los enantiómeros de KP, se procedieron a estudiar las transiciones vítreas originadas en las muestras que poseen distintas proporciones de los enantiómeros, R(-)-KP y S(+)-KP.

Según los resultados obtenidos y mostrados en la tabla 82, la forma racémica y los enantiómeros poseen diferentes estructuras entre sí. Los enantiómeros aunque poseen similar punto de fusión difieren en su estructura interna cristalina. Este hecho fue observado por la técnica de difracción de rayos X.

El estudio morfológico de los cristales nos lleva a observar también particularidades entre todas y cada una de las formas de KP disponibles para el estudio. Aunque todos los cristales poseen estructura cristalina bien definida y mayoritariamente de forma prismática, el tamaño de los mismos difiere según la muestra; siendo, como se puede observar en la tabla 82, los cristales de S(+)-KP mayores que los de R(-)-KP y éstos a su vez mayores que los de la forma rac-KP.

Tabla 82. Características de la estructura cristalina de las distintas formas de KP.

Muestra	Punto de fusión (°C) (DSC)	Estructura cristalina (Difracción rayos X)	Morfología (Micr. elect. barrido)
Rac-KP	94.1	SI-Distinta a las otras muestras	Prismas <50 µm
R(-)-KP	75.8	SI-Distinta a las otras muestras	Prismas <100 µm
S(+)-KP	76.8	SI-Distinta a las otras muestras	Prismas <250 µm

Las diferencias encontradas entre los enantiómeros son debidas a su forma de purificación a partir de la forma rac-KP. Este hecho deberá tenerse en cuenta posteriormente para justificar los resultados obtenidos en la solubilidad y velocidad de disolución de las distintas formas de KP en las diferentes condiciones.

De los estudios de recristalización de KP a distintas proporciones de sus enantiómeros se evidenció que la forma rac-KP se trata de un verdadero compuesto racémico y no de un compuesto conglomerado. Se estudiaron proporciones intermedias entre 100% puro de cada uno de los enantiómeros y la forma rac-KP compuesta por un 50% R(-)-KP y 50% S(+)-KP. Se observó la cinética de transición de un estado (enantiómeros puros) a otro estado estable (racémico puro en proporción 50%/50%) pasando por las diferentes etapas metaestables. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 83.

Tabla 83. Punto de fusión y comportamiento de las mezclas recrystalizadas de los enantiómeros de KP.

<i>R(-)-KP//S(+)-KP</i>	<i>Estado</i>	<i>Punto de fusión (°C)</i>
100% // 0%	Estable	78.92
85% // 15%	Metaestable	71.30 // 81.58
75% // 25%	Metaestable	70.86 // 88.01
65% // 35%	Metaestable	69.59 // 92.77
50% // 50%	Estable	95.11
35% // 65%	Metaestable	67.77 // 91.81
25% // 75%	Metaestable	71.15 // 87.82
15% // 85%	Metaestable	72.38 // 81.24
0% // 100%	Estable	76.04

Como se puede observar en la tabla 83, ambos enantiómeros darán un resultado similar al obtenido tras el estudio calorimétrico directo. También para la mezcla física (50% R(-) // 50% S(+)) muestra como resultado un único punto de fusión correspondiente al compuesto formado y que coincide con el obtenido tras el estudio calorimétrico de la forma rac-KP. El estudio cristalográfico de la muestra rac-KP y del recrystalizado de la MF (50%/50%) muestra que durante el proceso de recrystalización los enantiómeros reacomodan su estructura a la forma más estable, es decir la forma racémica.

1.2. TALIDOMIDA

Para la TH se procedió a realizar el estudio de caracterización, tanto de su forma racémica, como de los enantiómeros R(+)-TH y S(-)-TH por separado.

Durante el estudio calorimétrico de la TH también se observó un diferente punto de fusión entre la forma racémica y los enantiómeros. A su vez, la estructura interna observada por difracción de rayos X también es semejante para los enantiómeros entre sí, y ligeramente diferente respecto de la forma rac-TH. Mediante el estudio morfológico, por observación directa de los cristales,

se observa una similitud entre los enantiómeros que a su vez difieren en su forma y tamaño respecto a su forma rac-TH.

Dichas diferencias serán tenidas en cuenta, como en el caso anterior, para los posteriores estudios de solubilidad y velocidad de cesión en las distintas condiciones.

Tabla 84. Características de la estructura cristalina de las distintas formas de TH.

Muestra	Punto de fusión (°C) (DSC)	Estructura cristalina (Difracción rayos X)	Morfología (Micr. elect. barrido)
Rac-TH	270.0	SI	Acicular <100 µm
R(+)-TH	255.0	SI-Semejante a S(-)-TH	Acicular <20 µm
S(-)-TH	258.0	SI-Semejante a R(+)-TH	Acicular <20 µm

1.3. RICOBENDAZOL

Por último para el RBZ y debido a que hasta este momento no existe disponibilidad de las formas enantioméricas se realizó la caracterización utilizando tan sólo la forma racémica.

La caracterización de su estructura cristalina de la forma racémica se hizo de la misma forma que para los fármacos anteriores.

Tabla 85. Características de las estructura cristalina de rac-RBZ.

Muestra	Punto de fusión (°C) (DSC)	Estructura cristalina (Difracción rayos X)	Morfología (Micr. elect. barrido)
RBZ	75.0	SI	Irregular Múltiples tamaños

2. ESTUDIOS DE LA SOLUBILIDAD EN LAS DISTINTAS CONDICIONES

Los estudios de solubilidad se realizaron en dos condiciones distintas de temperatura: en baño de agitación a 37°C y en condiciones de sobrepresión en un autoclave a 120°C durante 20 minutos. Teniendo en cuenta los estudios de caracterización de la estructura cristalina de las distintas formas de los fármacos en estudio obtuvimos los siguientes resultados:

2.1. KETOPROFENO

- Baño de agitación a 37°C

Distintos pH's

Teniendo en cuenta las características de ácido débil que posee el KP, su solubilidad se verá aumentada según aumenta el pH de la solución para todas las formas de KP estudiadas. El aumento de la solubilidad se produce de manera proporcional desde los pH ácidos hacia los pH básicos utilizados.

Debemos señalar que para la MF de ambos enantiómeros (1:1) se observó una diferencia enantioselectiva (figura 116) significativa ($p < 0.05$) en cuanto a la solubilidad de los enantiómeros, siendo en todos los casos mayor la solubilidad del enantiómero S(+)-KP. Este valor de mayor solubilidad, se debe a una mayor velocidad de disolución del enantiómero S(+)-KP con respecto al R(-)-KP. Este hecho parece que está directamente relacionado a la distinta estructura interna que poseen los enantiómeros, señalada en el apartado anterior.

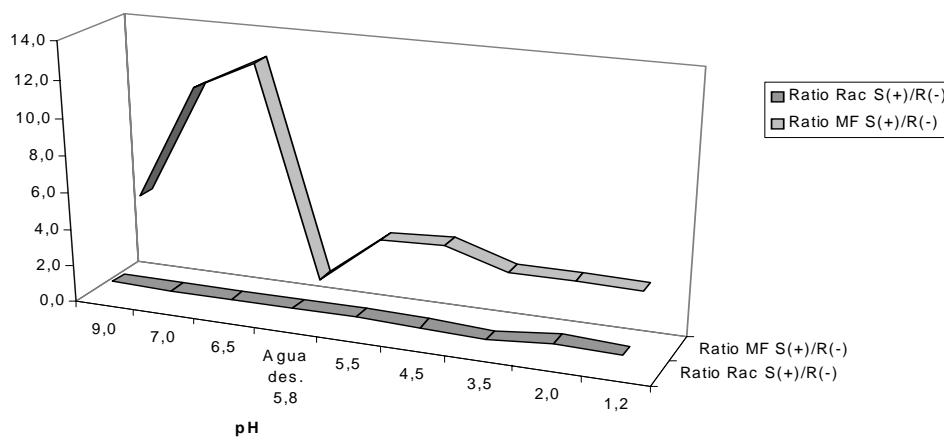


Figura 116. Ratios S(+)/R(-) de la muestra rac-KP y de la MF (1:1) a distintos pH

En la figura 116 se muestran también los ratios S(+)/R(-) de la muestra rac-KP y de la muestra MF (1:1). Como se puede observar, no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) a ningún pH estudiado cuando los enantiómeros de la forma rac-KP son analizados.

Observando los resultados obtenidos podemos decir también que para la MF (1:1) los ratios S(+)-KP/R(-)-KP disminuye según nos vamos acercando a los pH más ácidos y por tanto disminuye la solubilidad de la molécula. Por tanto la velocidad de disolución del S(+)-KP traducido en solubilidad obtenida con respecto al R(-)-KP se ve acelerada cuando el pH del medio es favorable a la solubilidad del KP, es decir, a pH básicos.

Incorporación de agentes solubilizantes

Por otro lado, la incorporación de agentes solubilizantes como por ejemplo distintos tipos de CD (β -CD, HP β CD y γ -CD) en la solubilización de los enantiómeros de la forma rac-KP fue también estudiada. Hay que tener en cuenta que la HP β CD se trata de una molécula con propiedades quirales que podrá producir interacciones enantioselectivas que den como resultado distinta solubilidad de los enantiómeros. También se procedió a introducir otros agentes hidrotrópicos en las muestras que poseen las CD mencionadas anteriormente. Dichos agentes serán, la PVP, y la HPMC, esta última posee también átomos quirales en su estructura y por tanto es a su vez susceptible de formar interacciones enantioselectivas. El pH de la solución también fue modificado con la TEA (trietanolamina), molécula que alcaliniza la solución y por tanto favorece la solubilización del KP.

- Efecto de la ciclodextrinas y los polímeros hidrosolubles

Se produce un aumento de solubilidad de los enantiómeros de la forma rac-KP en todas las muestras a las que se les incorporan las CD, siendo el mayor aumento el logrado con la HP β CD 10% (aproximadamente 23 veces). El aumento en la solubilidad de los enantiómeros de la forma rac-KP añadiendo β -CD 10% y γ -CD 10% es similar (aproximadamente 3 veces).

Por otro lado los polímeros hidrosolubles (PVP 0.25% y HPMC 0.25%) no modificaron la solubilidad de los enantiómeros de la forma rac-KP cuando son añadidas al medio que no contiene ninguna de las CD estudiadas. Por tanto no ejercen ningún tipo de interacción (sea positiva o negativa)

bajo estas condiciones de trabajo y la solubilidad de los enantiómeros de la forma rac-KP permanece igual que en la solución de partida que tan sólo contiene agua destilada.

La combinación de las CD con los polímeros hidrosolubles (PVP 0.25% o HPMC 0.25%) no posee relevancia en el caso de las soluciones preparadas con β -CD y γ -CD a concentración de 10%, debido a que los valores de solubilidad son prácticamente los mismos que los registrados para la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP en presencia tan sólo de la CD que corresponda.

Sin embargo cuando la HP β CD es utilizada en combinación con los polímeros hidrosolubles, nos encontramos con una interacción positiva por parte de la HPMC 0.25% y la HP β CD que se traduce en una mayor solubilidad con respecto a la muestra que tan sólo contiene dicha CD, mientras que la adición de la PVP 0.25%, no produce interacción alguna y la solubilidad permanece inalterada.

- Ciclodextrinas, polímeros hidrosolubles y efecto del pH

De nuevo se estudia el pH en la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP. Esta vez utilizamos un agente alcalinizador del medio, como es la TEA. El pH alcalino que se produce en el medio provoca un aumento en la solubilidad por la ionización de la molécula. La combinación de la TEA con las CD provoca un aumento en la solubilidad en proporción al obtenido cuando tan sólo la CD era adicionada al medio. Por tanto el mayor aumento de solubilidad total se registra para la HP β CD 10% (aproximadamente el doble que sin la TEA). Sin embargo, la solubilidad total de los enantiómeros de rac-KP aumentó más en proporción cuando la TEA es añadida a las muestras que contienen la β -CD y γ -CD (aproximadamente 5 veces más) Ver figura 117.

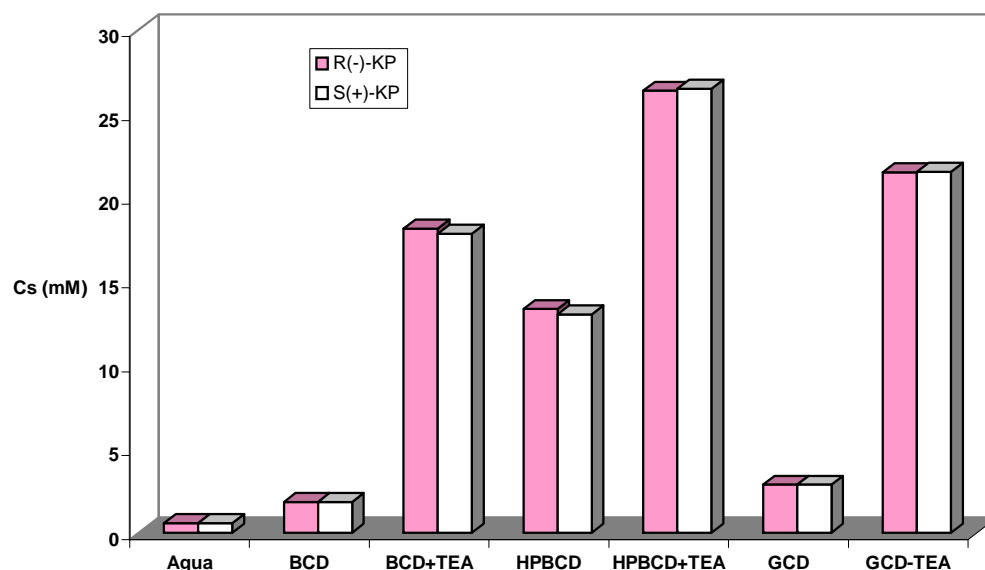


Figura 117. Comparativa de los distintos tipos de CD (HP β CD, β -CD y γ -CD) en presencia de la TEA y repercusiones en su solubilidad.

Como se puede observar en la figura 117, la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP aumenta en presencia de las CD. La que da mayores valores de solubilidad será la HP β CD 10%, seguida de la γ -CD y por último la β -CD. Cuando se adiciona la TEA al medio podemos comprobar que los mayores valores de solubilidad se obtienen por la alcalinización del medio que posee la HP β CD 10%. Sin embargo proporcionalmente se producen mayores aumentos cuando se alcalinizan aquellos medios que contiene las otras dos CD (β -CD y γ -CD).

La combinación de los tres factores: CD, polímeros y TEA, produce diferentes efectos según la CD utilizada. Por ejemplo, para la HP β CD 10% y la β -CD, la adición de la HPMC 0.25% al medio alcalinizado provoca un ligero aumento en la solubilidad, mientras que cuando la PVP 0.25% es adicionada la solubilidad obtenida es similar a la registrada tan sólo con las CD. Sin embargo, para la γ -CD obtuvimos una interacción negativa de las muestras que contiene tanto la HPMC 0.25% como la PVP 0.25% que se traduce en un descenso de la solubilidad con respecto a la muestra que contiene tan sólo la γ -CD en combinación con la TEA.

Los comportamientos explicados anteriormente se detallan a continuación en la tabla 86:

Tabla 86. Resumen del comportamiento de la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP en presencia de soluciones que contienen distintos tipos de CD (β -CD, HP β CD y γ -CD) con o sin adición de HPMC 0.25% o PVP 0.25%, en un medio alcalinizado con la TEA.

	<i>Agua des.</i>	<i>HPβCD 10%</i>	<i>β-CD 10%</i>	<i>γ-CD 10%</i>
<i>Agua des.</i>	Baja solubilidad	Aumento solubilidad (23 veces)	Aumento solubilidad (3 veces)	Aumento solubilidad (3 veces)
<i>Agua des.+HPMC 0.25%</i>	Baja solubilidad. No influye	Interacción + Aumento	No influye	No influye
<i>Agua des.+PVP 0.25%</i>	Baja solubilidad. No influye	No influye	No influye	No influye
<i>TEA</i>	----	Aumento	Aumento	Aumento
<i>Agua des.+HPMC 0.25%+TEA</i>	----	No influye	Interacción +	Interacción -
<i>Agua des.+PVP 0.25%+TEA</i>	----	Interacción – Descenso	No influye	Interacción -

Se estudiaron la posible aparición de diferencias enantioselectivas en las distintas condiciones para todas y cada una de las muestras descritas anteriormente. Para ello se calculó el ratio S(+)-KP/R(-)-KP de los enantiómeros de la forma rac-KP. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

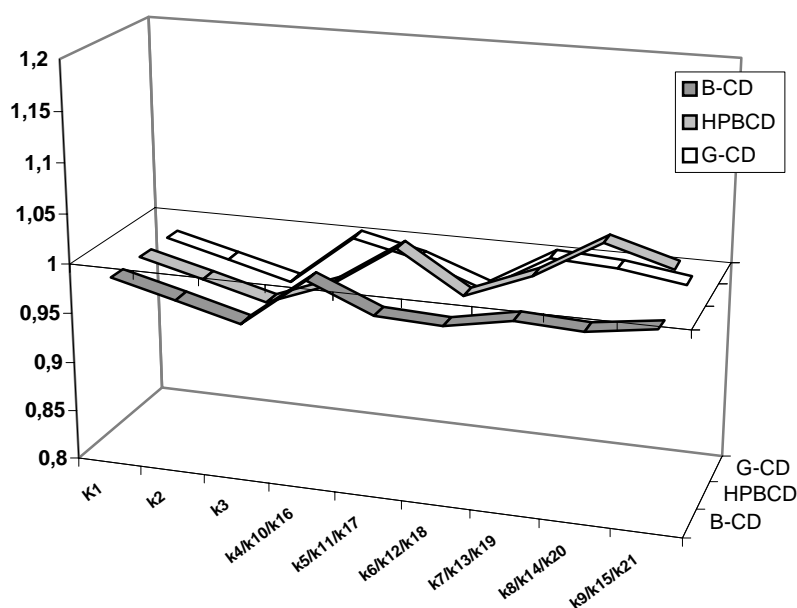


Figura 118. Ratio R(-)/S(+) de la muestra rac-KP con distintos tipos de CD en distintas condiciones.

Como se puede observar en la figura 118 no existen diferencias enantioselectivas entre los enantiómeros de la muestra de rac-KP que fueron estudiados con distintos tipos de CD y otros agentes solubilizantes, y con el modificador de pH.

La proximidad de ratio a 1 en todas las condiciones refleja la inexistencia de interacciones enantioselectivas entre los enantiómeros de rac-KP y la HP β CD 10% o la HPMC 0.25%, agentes que como ya hemos dicho anteriormente poseen carbonos asimétricos en su estructura susceptibles de originar diferencias enantioselectivas.

- HP β CD y distintos pH

Por sus propiedades asimétricas, así como su mayor solubilidad que dieron lugar a los mejores resultados para los enantiómeros de las muestras de rac-KP, se seleccionó la HP β CD 10% para estudiar la solubilidad de los mismos a los distintos pH utilizados anteriormente sin el uso de las CD.

La HP β CD 10% aumenta la solubilidad a todos los pH estudiados, tanto a pH ácidos como básicos, el aumento en la solubilidad se debe mayoritariamente a su inclusión en la cavidad de la misma. De ahí que para los enantiómeros de la forma rac-KP, la solubilidad que se obtiene es similar a todos los pH estudiados (entre 12 y 18 mM).

Sin embargo para los enantiómeros puros de KP, y debido a sus características cristalinas aumentan su solubilidad de nuevo, por encima de los niveles alcanzados. El comportamiento, en cuanto a la solubilidad obtenida a su vez es similar a todos los pH (aproximadamente 50 mM).

Para la MF (1:1) también obtenemos una mayor solubilidad a todos los pH y de nuevo volvemos a registrar una mayor velocidad de disolución en el medio para el enantiómero S(+)-KP que será comentado posteriormente con más detalle.

Se pretendió observar la influencia que posee dicho agente solubilizante, que como ya hemos señalado anteriormente, posee propiedades quirales en su estructura. Según los resultados encontrados, la utilización de la HP β CD 10% provoca un aumento significativo ($p < 0.05$) en la solubilidad de los enantiómeros tanto de la forma rac-KP, como de la MF (1:1). Como se puede observar en la figura 119, y desde un punto de vista cristalino, de nuevo los enantiómeros que provienen de la forma rac-KP tendrán el mismo comportamiento, en cuanto a solubilidad, y de ahí que su ratio sea prácticamente igual a 1 a todos los pH estudiados.

Por otro lado los enantiómeros puros que conforman la MF (1:1), tendrán de nuevo diferentes propiedades en cuanto a su solubilidad. De ahí que los ratios S(+)/R(-) es diferente a la unidad a los pH más bajos, conservando prácticamente el ratio que se obtuvo en aquellas muestras que no contenían HP β CD 10%. A pH superiores y que dieron las mayores diferencias en las muestras que no presentaban HP β CD 10%, el ratio esta vez es 1, por tanto la influencia del pH y de la presencia en el medio del agente solubilizante favorece la solubilización de la estructura más soluble (S(+)), como de la menos soluble (R(-)), por medio de la inclusión de ambos tipos de enantiómeros en la cavidad hidrófoba de la HP β CD 10%.

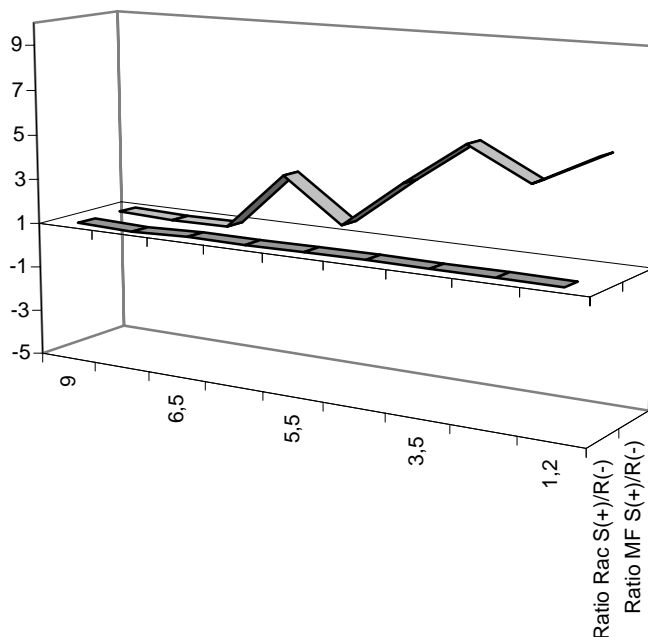


Figura 119. Ratios S(+)/R(-) de la muestra rac-KP y de la MF (1:1) a distintos pH, en presencia de HP β CD 10%.

- Sobrepresión y altas temperaturas en el autoclave

Lo que se pretendió observar bajo estas condiciones forzadas de presión y temperatura es el aumento de solubilidad de los enantiómeros de KP en soluciones que contienen HP β CD, además de ver si existen interacciones enantioselectivas entre el agente solubilizante quiral y los enantiómeros de KP. Los estudios previos se realizaron con el rac-KP en distintas soluciones (agua y pH 9.0) con concentraciones crecientes de HP β CD, y se observó que efectivamente existía un aumento lineal de la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP en ambos medios estudiados. El estudio de los parámetros de solubilidad nos llevó a la conclusión de que los complejos formados en agua desionizada son mucho más estables que aquellos que se forman a pH 9.0. De nuevo, no se encontraron diferencias enantioselectivas entre la solubilidad de uno y otro enantiómero de la forma rac-KP en ningún caso y en ninguno de los dos medios estudiados.

Partiendo de estos primeros resultados obtenidos se tomó la concentración de 10% de HP β CD, y se prepararon soluciones a las que a su vez se les adicionaron, distintas proporciones de los agentes higrotrópicos como la PVP (0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25) o la HPMC (0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25), con o sin modificación de pH por medio de la TEA. Con este estudio se pretendió observar la influencia que estos factores poseen en el aumento de solubilidad debido a la capacidad que tienen los

polímeros hidrosolubles para ayudar a la acomplejación de la molécula por la CD en estas condiciones forzadas. Además observaremos también la posible aparición de diferencias enantioselectivas.

Resultados de la HPMC *versus* PVP.

Se procedió a comparar los distintos resultados obtenidos para ambos polímeros utilizados. Para ellos mostramos dos figuras (figura 120 y 121). La primera de ellas muestra los resultados correspondientes a la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP en las distintas proporciones de HPMC y PVP.

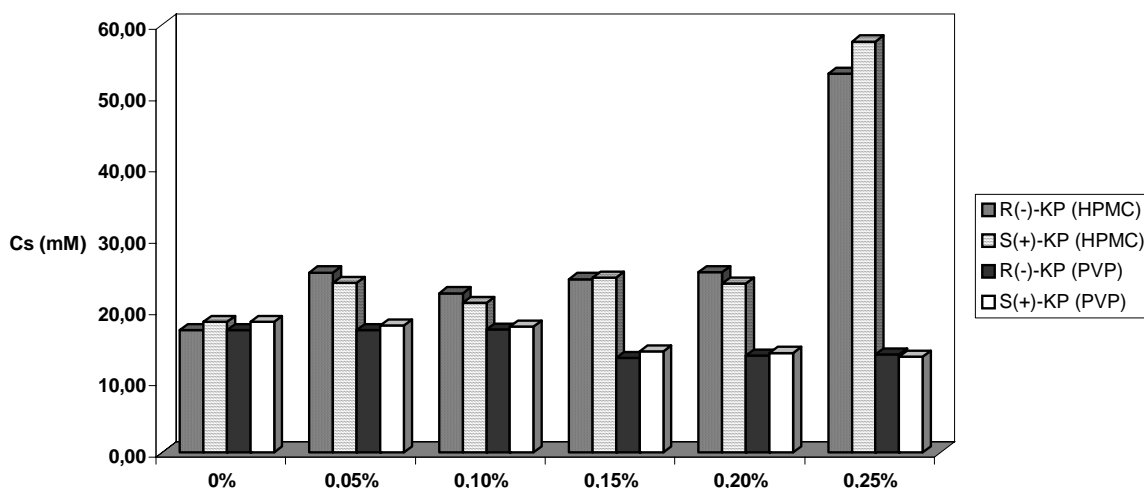


Figura 120. Comparativa de la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP con un 10 % $HP\beta CD$ y diferentes proporciones de PVP y HPMC.

Como se puede observar en todos los casos estudiados la complejación de los enantiómeros de rac-KP por la $HP\beta CD$ será mayor cuando se adiciona HPMC al medio, y sobre todo en la proporción de 0.25%.

Por otro lado tras modificar el pH del medio, en muestras con distintas cantidades de HPMC y PVP se muestran a continuación:

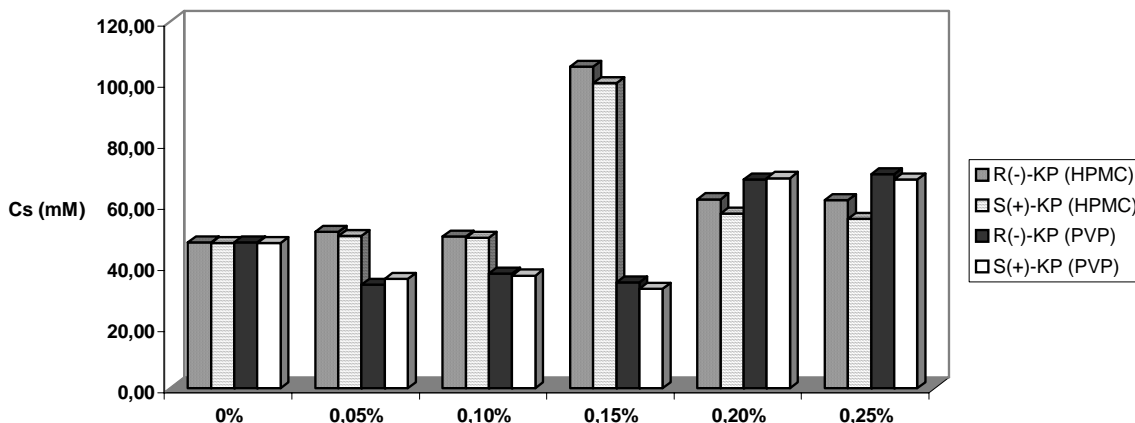


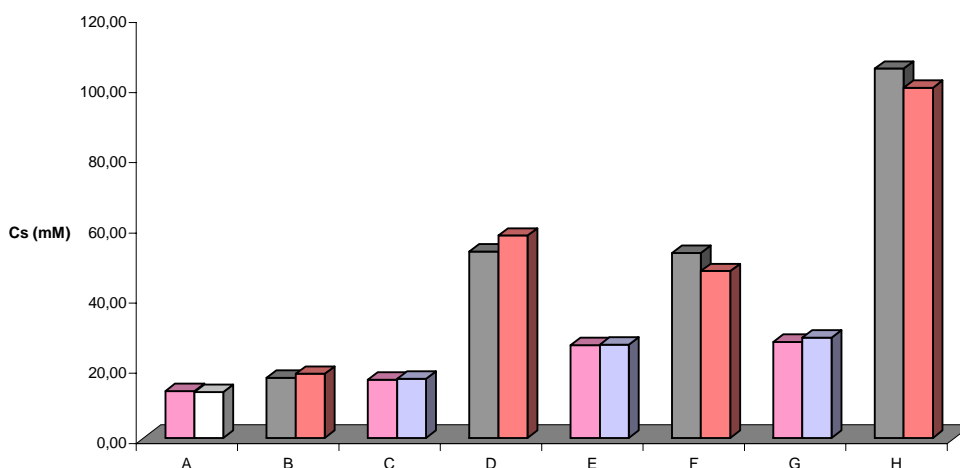
Figura 121. Comparativa de la solubilidad de los enantiómeros de rac-KP con un 10 % HPβCD y diferentes proporciones de PVP y HPMC en un medio alcalinizado por la TEA.

Como se puede observar en la figura 121, la solubilidad de los enantiómeros de KP, se ve aumentada en todos los casos con respecto a los resultados mostrados en la figura 120, este hecho se debe como ya hemos explicado repetidamente a la influencia que ejerce el pH alcalino sobre la ionización del rac-KP, y por tanto dadas sus características de ácido débil, aumenta su solubilidad en un medio de pH alcalino.

Por otro lado se observa que la complejación de los enantiómeros de rac-KP con la HPβCD 10% es siempre mayor cuando se utiliza la HPMC, hasta una proporción de 0.15%, donde se produce el aumento máximo de solubilidad registrado para los enantiómeros de rac-KP. Por otro lado a partir de dicha proporción la solubilidad del rac-KP desciende (aproximadamente un 40%), y origina unos resultados en las proporciones de 0.20 y 0.25% incluso menores a los registrados utilizando la PVP.

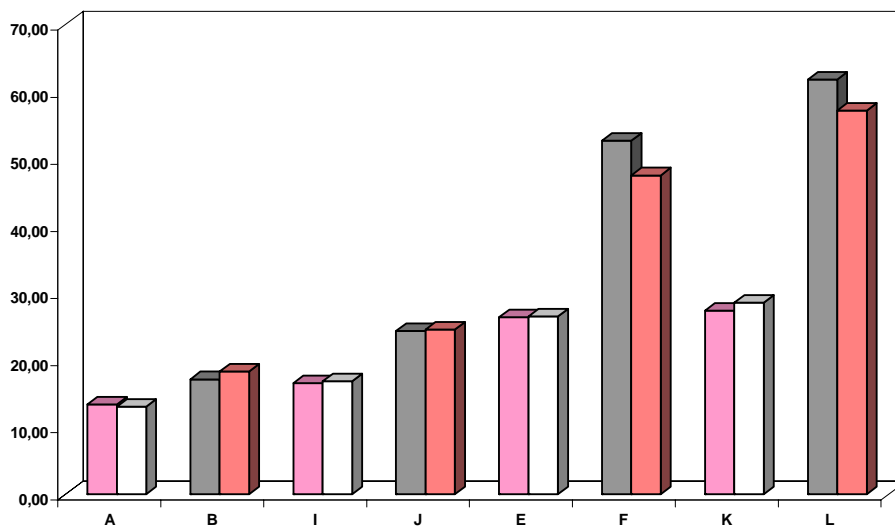
Los mejores resultados obtenidos cuando el polímero utilizado es la PVP se encuentran en las proporciones de 0.20 y 0.25% en el medio que a su vez está alcalinizado en presencia de TEA.

La solubilidad obtenida para los enantiómeros de KP en estas condiciones es mucho mayor que aquella que fue obtenida en el baño de agitación a 37°C. La figura 122 que se muestra a continuación muestra algunos datos comparativos entre la solubilidad obtenida en el baño de agitación y tras el ciclo en el autoclave:



HPBCD 10% (Baño 37°C)	A
HPBCD 10% (Autoclave)	B
HPBCD 10%+HPMC 0.25% (Baño 37°C)	C
HPBCD 10%+HPMC 0.25% (Autoclave)	D
HPBCD 10%+TEA (Baño 37°C)	E
HPBCD 10%+TEA (Autoclave)	F
HPBCD 10%+TEA+HPMC 0.25% (Baño 37°C)	G
HPBCD 10%+TEA+0.20% HPMC (Autoclave)	H

Figura 122. Comparativa resultados de solubilidad entre baño de agitación a 37°C y autoclave (con HPMC).



HPBCD (Baño 37°C)	A
HPBCD 10% (Autoclave)	B
HPBCD+PVP 0.25% (Baño 37°C)	I
HPBCD 10%+0.20% PVP (Autoclave)	J
HPBCD 10%+TEA (Baño 37°C)	E
HPBCD 10%+TEA (Autoclave)	F
HPBCD 10%+TEA+PVP 0.25% (Baño 37°C)	K
HPBCD 10%+0.20% PVP+TEA	L

Figura 123. Comparativa resultados de solubilidad entre baño de agitación a 37°C y autoclave (con PVP).

A la vista de los resultados obtenidos, la solubilidad de los enantiómeros de KP aumenta en mayor cuantía para las muestras sometidas tras el ciclo en el autoclave, principalmente cuando la muestra posee además la HPMC 0.15% o PVP 0.20%, TEA y la HP β CD 10%.

En la figura 124, se muestra el ratio R(-)/S(+) de rac-KP en presencia de soluciones que contienen HP β CD 10%, y distintas proporciones de HPMC o PVP:

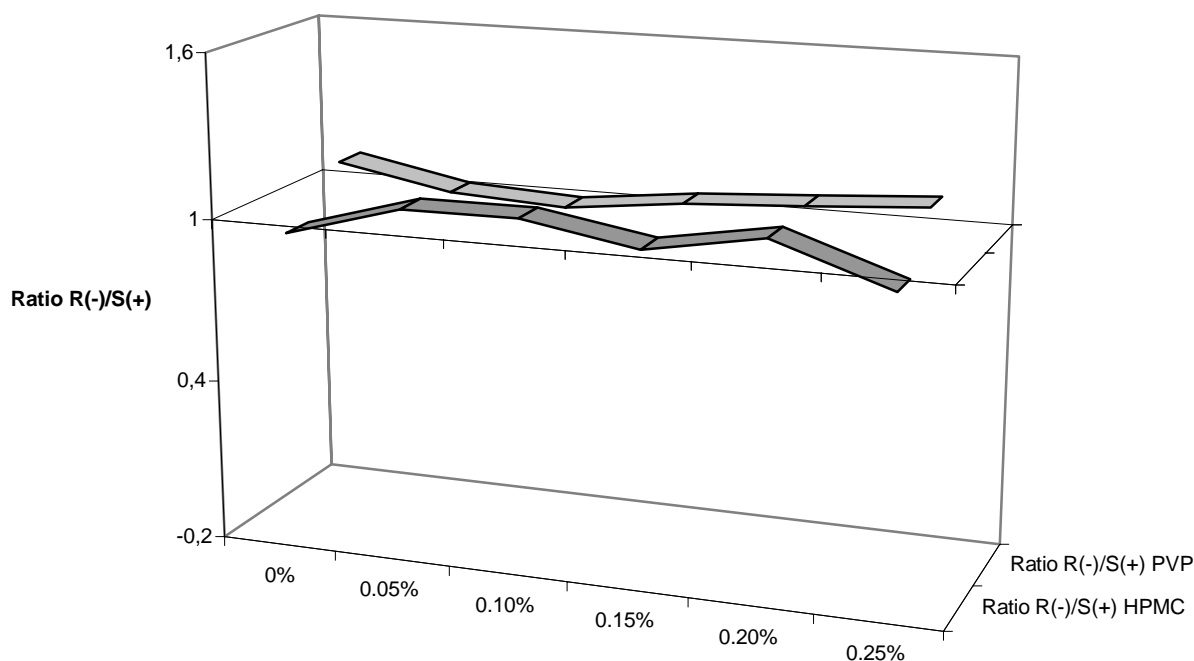


Figura 124. Ratio R(-)/S(+) de los enantiómeros de rac-KP con un 10% HP β CD y diferentes proporciones de PVP y HPMC.

Como se puede observar en la figura 124, el ratio de los enantiómeros es prácticamente 1 en todos los casos, por lo tanto la HPMC y HP β CD no ejercen influencia enantioselectiva en los enantiómeros de rac-KP.

A continuación repetiremos el estudio pero esta vez se utilizan las muestras alcalinizadas con la TEA para favorecer la solubilidad del KP.

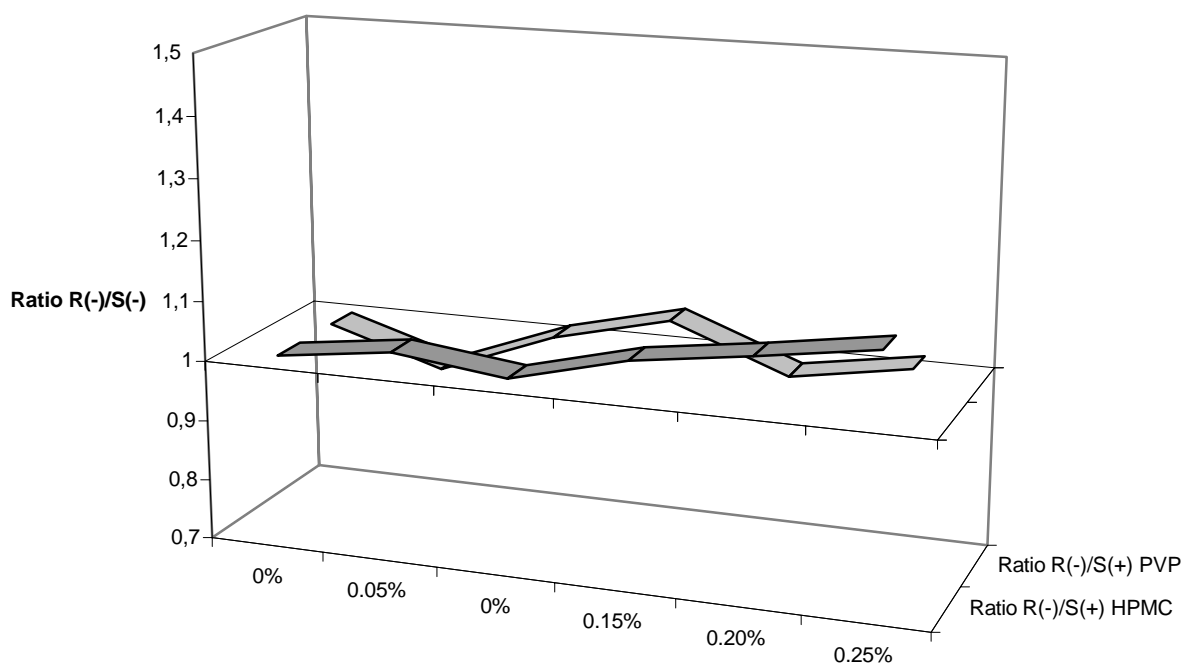


Figura 125. Ratio R(-)/S(+)¹ de los enantiómeros de rac-KP con un 10% HP β CD y diferentes proporciones de PVP y HPMC en un medio alcalinado por la TEA.

Como se puede observar en la figura 125, el ratio R(-)/S(+)¹ permanece prácticamente igual a 1 en todos los casos, no existen diferencias enantioselectivas entre uno y otro enantiómero en ninguna de las condiciones ensayadas.

Enantiómeros puros y mezcla física

También realizamos estudios utilizando los enantiómeros puros distintas en condiciones parecidas a las estudiadas con el KP racémico. Los resultados obtenidos se pueden observar en la siguiente figura:

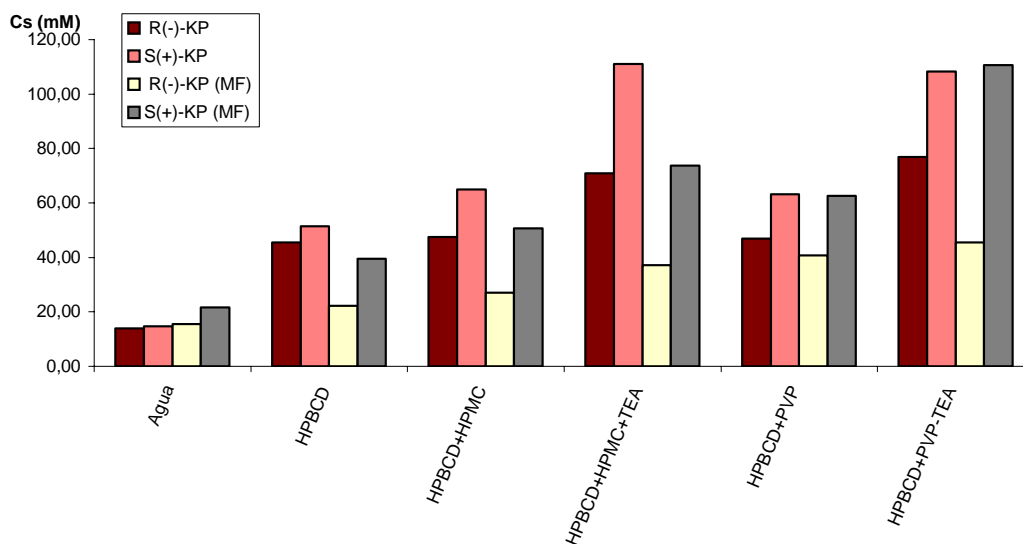


Figura 126. Cs (mM) de las distintas formas de KP(R(-) y S(+)) puros y la MF (1:1) de ambos, en distintas condiciones.

Como se puede observar en la figura 126 la solubilidad de los enantiómeros puros de aumenta cuando se adiciona al medio la HPβCD 10%. Por otro lado la adición al medio de los polímeros hidrosolubles, HPMC o PVP favorece la solubilidad de la forma S(+)-KP mientras que la forma R(-)-KP ofrece prácticamente los mismos valores de solubilidad que los obtenidos tan sólo con la HPβCD 10%. Por otro lado el cambio de pH en el medio por medio de la adición en presencia de la HPβCD y los polímeros hidrosolubles (HPMC o PVP) provocan un aumento de solubilidad, fundamentalmente del enantiómero S(+)-KP puro.

La MF (1:1) de ambos enantiómeros provocará nuevamente un comportamiento diferente para uno y otro enantiómero, en cuanto a la velocidad de disolución que poseen. Siendo de nuevo el enantiómero S(+)-KP el que posee una mayor velocidad de disolución y destaca por tanto con una mayor solubilidad final que la obtenida para el enantiómero R(-)-KP en la mezcla física de ambos (1:1). Esto es debido a que como ya hemos dicho anteriormente, la estructura interna cristalina de uno y otro enantiómero es diferente, y de ahí las diferencias encontradas.

Estudiaremos también la posible aparición de diferencias enantioselectivas cuando se utiliza la MF (1:1), en lugar de la forma *rac*-KP. La MF (1:1) se incluirá en la solución con 10% HP β CD con PVP y HPMC con o sin el modificador de pH, TEA.

A continuación se muestra la figura 127 que contiene los resultados de ratio S(+)/R(-).

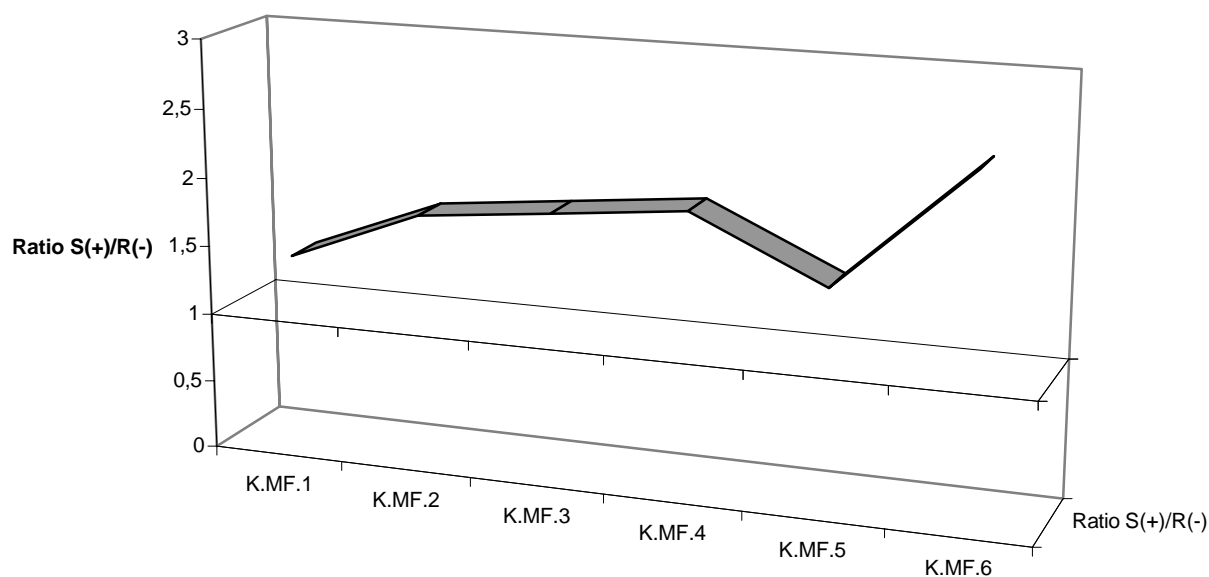


Figura 127. Ratio S(+)/R(-) de la MF (1:1) con un 10% HP β CD y HPMC o PVP en un medio alcalinizado en ciertos casos con TEA.

Como se puede observar en la figura 127, los resultados correspondientes al ratio S(+)/R(-) de los enantiómeros de la MF (1:1) de S(+)-KP y R(-)-KP vuelve a ser diferente a y mayor de 1, al igual que sucedía en las pruebas realizadas en el baño de agitación a 37°C, cuando también se utilizaba la MF (1:1) era utilizada, lo que nos confirma diferencias enantioselectivas.

Este comportamiento diferente no se debe a la presencia en el medio de agentes quirales sino a las propiedades intrínsecas de los cristales, tal y como ya hemos comentado con anterioridad.

2.2. TALIDOMIDA

- Baño de agitación a 37°C

Los ensayos en el baño de agitación a 37°C se hicieron a distintos pH y a distintas concentraciones de la CD más hidrófila, la HP β CD, utilizando muestras que contienen la muestra rac-TH y la MF (1:1). Debemos decir también que al contrario que para los enantiómeros puros de KP, dado que las características de estructura interna de los enantiómeros de TH es prácticamente la misma, no deberían dar resultados diferentes. Nos detendremos en el estudio de la posible aparición de interacciones entre los enantiómeros de la forma rac-TH en las distintas condiciones estudiadas.

La TH es una molécula que como ya hemos señalado anteriormente posee características básicas y por lo tanto aumenta su solubilidad según disminuye el pH de la solución en la que se encuentre.

La figura 128 que se muestra a continuación muestra el ratio R(+)/S(-) de las muestras de rac-TH y MF (1:1) a distintos pH:

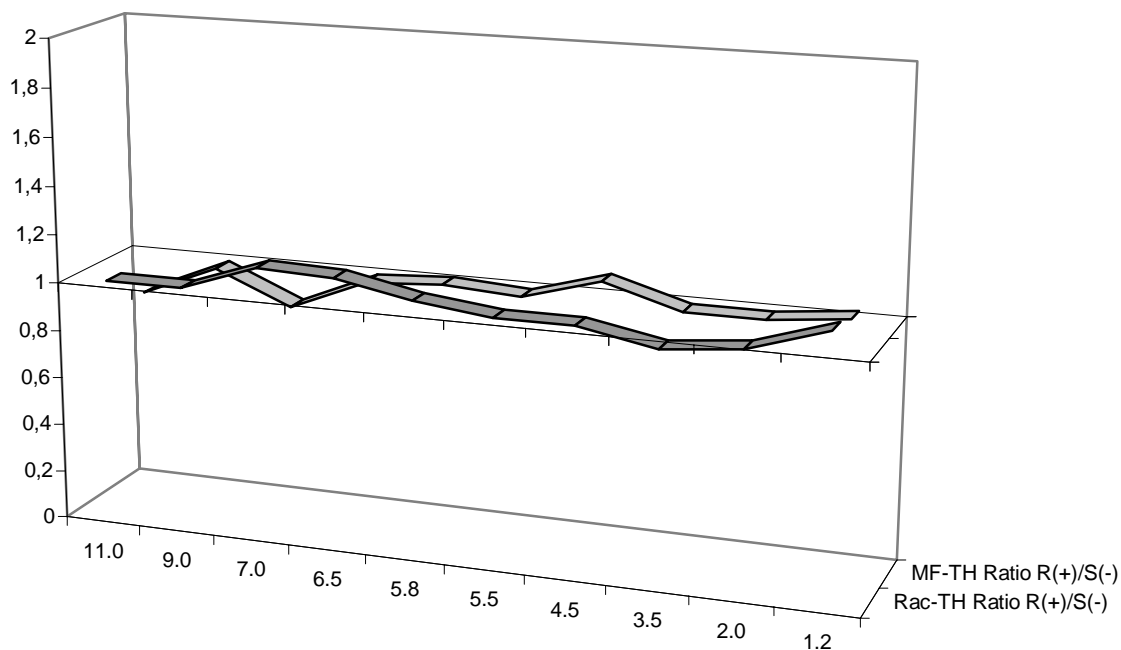


Figura 128. Ratio R(+)/S(-) de la muestra rac-TH y de la MF (1:1) a distintos pH

Según los resultados obtenidos, podemos decir que los enantiómeros puros de TH también aumentaron su solubilidad según el pH del medio en el que se encontraron iba disminuyendo, en ninguno de los pH estudiados aparecen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre ambos. Tampoco entre los enantiómeros de la forma rac-TH aparecen diferencias enantioselectivas significativas ($p > 0.05$), comportándose la solubilidad de la misma manera, disminuye ésta según disminuye el pH. Este hecho se debe a las características similares que poseen en su estructura los enantiómeros de TH y que se comprobó por medio del estudio de su estructura interna cristalina.

Por otro lado también se estudio el comportamiento de los enantiómeros de la muestra rac-TH y de los enantiómeros puros de TH, en presencia de distintas concentraciones de HP β CD, molécula que como ya se ha dicho anteriormente posee propiedades quirales y que puede provocar interacciones enantioselectivas con los enantiómeros.

La solubilidad de los enantiómeros de rac-TH aumenta proporcionalmente a la cantidad de HP β CD adicionadas al medio, hasta el 15%, cantidad a partir de la cual la solubilidad permanece

constante. Los complejos de inclusión formados son de tipo estable, manteniéndose en un adecuado equilibrio entre las moléculas de cada enantiómero libres y las que están inmersas en la cavidad de la HP β CD. Los enantiómeros puros aumentan a su vez proporcionalmente y en mayor cantidad su solubilidad a medida que se va adicionando CD al medio. Los complejos formados también son de tipo estable por tanto se mantiene el equilibrio adecuado entre los enantiómeros libres y aquellos que se encuentran inmersos en la cavidad. El mayor aumento de la solubilidad de los enantiómeros puros que de aquellos que provienen de la forma rac-TH se debe a la estructura cristalina que hemos observado previamente en el estudio. Los enantiómeros puros poseen mayor solubilidad debido al menor tamaño de partícula y punto de fusión, que la forma rac-TH.

Para observar, el posible comportamiento estereoselectivo de los enantiómeros de rac-TH, y de los enantiómeros puros calculamos el ratio R(+)/S(-)-TH.

La figura 129 muestra los ratios de los enantiómeros R(+)/S(-)-TH en las condiciones descritas anteriormente:

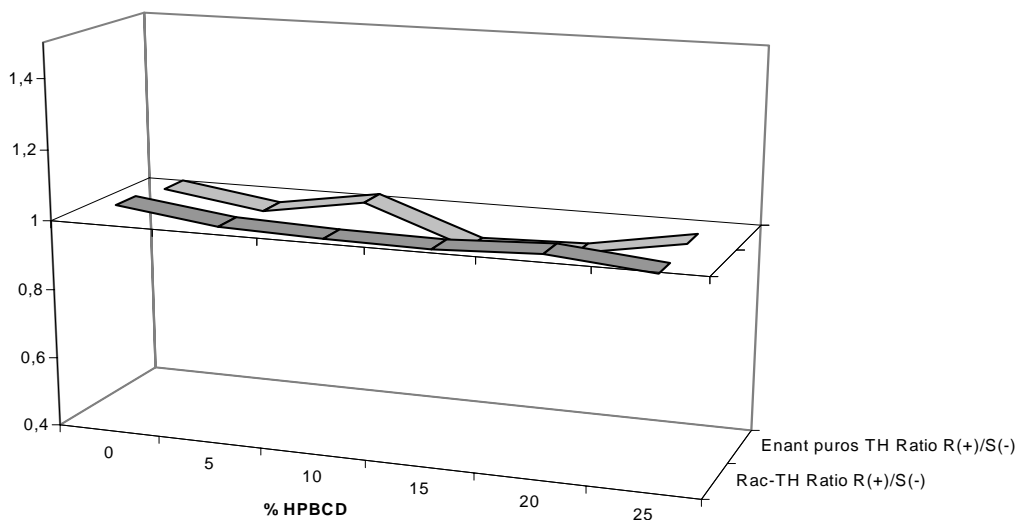


Figura 129. Ratio (+)/R(-) de la muestra rac-TH y de los enantiómeros puros a distintas concentraciones de HP β CD

A la vista de los resultados mostrados, de nuevo, no existe diferencia entre los enantiómeros de TH pertenecientes a la mezcla racémica. Por otro lado para el estudio realizado para los enantiómeros puros de TH por separado observamos que ambos ofrecen el mismo comportamiento a todas las concentraciones de HP β CD. Este hecho es lógico debido a que su estructura cristalina es muy semejante como ya hemos explicado anteriormente.

- Sobrepresión y altas temperaturas en el autoclave

Los estudios de solubilidad de TH fueron realizados con la forma racémica debido a que no poseíamos suficiente muestra de los enantiómeros. De nuevo se comprobará que los enantiómeros de TH que provienen de la forma racémica aumentan su solubilidad a medida que aumenta la proporción de la HP β CD presente en el medio. Los complejos formados serán de carácter estable por encontrarse las constantes de formación dentro de los valores aceptados en la bibliografía.

De nuevo se seleccionó la concentración de HP β CD 10% como la ideal para hacer el resto de estudios de solubilidad. Dichos estudios de solubilidad fueron realizados en presencia de la HP β CD

10% y HPMC o PVP, y/o ácidos orgánicos (cítrico o tartárico) con el fin de observar posibles interacciones enantioselectivas.

Las muestras que fueron preparadas en combinación de distintos polímeros hidrosolubles y ácidos orgánicos, demuestran que la complejación de los enantiómeros de TH por la HP β CD se ve facilitada al adicionar los polímeros hidrosolubles al medio de trabajo, tanto la PVP como la HPMC. Sin embargo la acidificación del medio por parte de los ácidos orgánicos, no provocó un aumento considerable, comparado al obtenido mediante la adición de HP β CD con o sin combinación con la HPMC o PVP. Por último las combinaciones de ambos factores, polímeros hidrosolubles y ácidos provocó un descenso (marcada interacción negativa) en la solubilidad principalmente en aquellas muestras que poseen la HP β CD combinada con la PVP y el ácido cítrico o tartárico. En la figura 130 se muestran las mejores condiciones para aumentar la solubilidad de los enantiómeros de rac-TH.

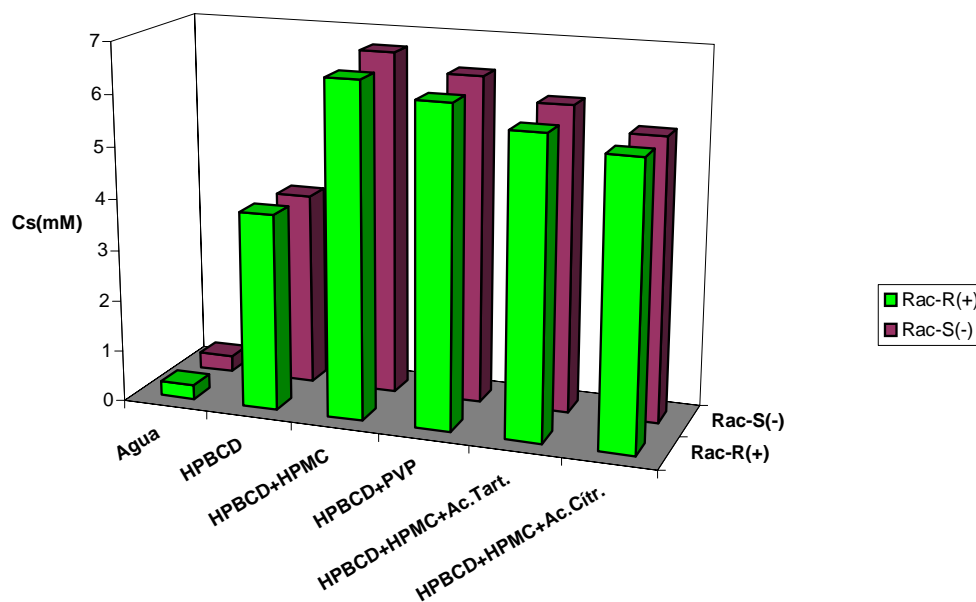


Figura 130. mM de los enantiómeros de rac-TH en las mejores condiciones para su solubilización.

El ratio de R(+)/S(-) de la forma rac-TH en distintas las condiciones, se presenta a continuación en la figura 131:

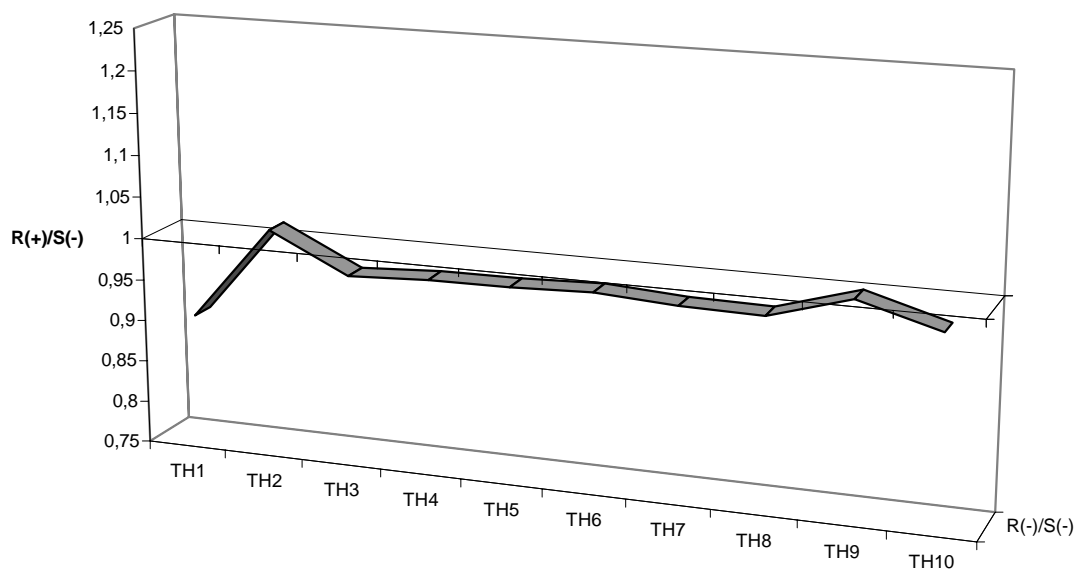


Figura 131. Ratio R(+)/S(-) de la muestra de rac-TH en presencia de HPMC o PVP, ácido cítrico o ácido tartárico en presencia o ausencia de HP β CD 10%.

Como se puede observar los valores del ratio R(+)/S(-)-TH son muy próximos a la unidad por los que no existen diferencias enantioselectivas, en ninguna de las condiciones estudiadas. Este hecho es lógico debido a la estructura interna de los cristales de rac-TH. Tampoco se observan interacciones entre los enantiómeros y los agentes quirales incluidos en el medio, como la HP β CD, la HPMC o el ácido tartárico, que originen diferencias enantioselectivas en la solubilidad de los enantiómeros.

2.3. RICOBENDAZOL

- Baño de agitación a 37°C

Los ensayos en el baño a 37°C tan sólo se hicieron con la muestra de rac-RBZ debido a que no se dispuso de suficiente muestra de los enantiómeros para hacer los estudios correspondientes. Los ensayos que se realizaron fueron bajo diferentes pH, los cuales demostraron que igual que para los fármacos estudiados anteriormente, los enantiómeros de rac-RBZ aumentan su solubilidad a medida que disminuye el pH, por tratarse de una molécula básica, y que no existen diferencias enantioselectivas entre uno y otro a todos los pH estudiados.

Para observar las posibles interacciones que se puedan producir con agentes que poseen propiedades asimétricas, se utilizaron distintos tipos de CD (agentes solubilizantes por complejación de la parte hidrófoba del fármaco en su cavidad que posee a su vez también características hidrófobas). Las CD utilizadas fueron, al igual que para el KP, β -CD, HP β CD y γ -CD al 10%, siendo la HP β CD la que posee carbonos asimétricos en su estructura y que será susceptible de formar interacciones enantioselectivas con los enantiómeros. Por otro lado también se utilizaron otros componentes, tales como los agentes higrotrópicos, PVP y HPMC, polímeros hidrosolubles que facilitan la formación de complejos del fármaco con la CD correspondiente. La HPMC será el agente que posee las propiedades quirales y que podrá originar además de un aumento en la solubilidad, interacciones enantioselectivas. Por último, y como ya hemos señalado, el RBZ posee características básicas y aumenta su solubilidad a pH ácidos, por lo tanto utilizamos también ácidos orgánicos, ácido cítrico y tartárico que modificaron el pH de la solución, tornándolo más ácido y por tanto favoreciendo la solubilización de RBZ. El ácido tartárico se trata de una molécula que posee asimetría en su estructura, por tanto también será capaz de formar interacciones que den origen a diferencias entre la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ.

La solubilidad de los enantiómeros de RBZ aumenta ligeramente y en la misma cuantía en el medio que posee tan sólo los polímeros hidrosolubles, la PVP 0.25% o la HPMC 0.25%. Por otro lado la adición de los ácidos orgánicos (cítrico o tartárico) aumenta a su vez la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ y en mayor medida que con los polímeros hidrosolubles. Este hecho es

debido al cambio de pH que producen en el medio, tornándolo ácido, pH que favorece la solubilidad de la molécula.

La adición de los distintos tipos de CD al medio, provoca un aumento similar y mayor para la β -CD y la HP β CD que para la γ -CD. Este hecho se debe a que la cavidad de esta última es mayor y por tanto la inestabilidad del complejo también es menor. Incluso la solubilidad que se obtiene es menor que la obtenida tras la acidificación del medio por medio de los ácidos orgánicos.

Para todas las CD estudiadas, la combinación de las mismas con los polímeros hidrosolubles (HPMC o PVP) provoca una disminución en la solubilidad de los enantiómeros de RBZ, respecto a la solubilidad obtenida con las CD. Este hecho refleja por lo tanto una interacción negativa de los polímeros en las citadas condiciones, sobre todo cuando se utilizan en combinación con la γ -CD.

La combinación de los ácidos orgánicos con las CD, provocó en todos los casos un aumento de la solubilidad, en comparación con aquellas muestras a las cuales tan sólo se les había adicionado el ácido cítrico o tartárico y que ya fueron comentadas previamente.

Las distintas posibles combinaciones entre los ácidos orgánicos y los polímeros hidrosolubles con las distintas CD estudiadas no dieron aumentos de solubilidad significativos para los enantiómeros de rac-RBZ, sin embargo provocaron interacciones negativas con un descenso de la solubilidad en todos los casos, y más acusado para la HP β CD 10%. Las combinaciones que provocan interacciones negativas son: HPMC 0.25% y ácido tartárico, la HPMC 0.25% y ácido cítrico y la PVP 0.25% y ácido cítrico. La única combinación que al menos no interfirió en la solubilidad fue la combinación de la PVP 0.25% con el ácido tartárico.

La combinación de las CD con los polímeros hidrosolubles y los ácidos orgánicos no ofrece mayores ventajas para el aumento de solubilidad, sin embargo la combinación de las CD con los ácidos orgánicos sí que aumenta significativamente la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ, con respecto al aumento que se consigue cuando las CD o los ácidos orgánicos son utilizados por separado.

En resumen, los mejores resultados obtenidos de solubilidad para cada par de enantiómeros de rac-RBZ en función de la CD utilizada se resume en la siguiente figura mostrada a continuación:

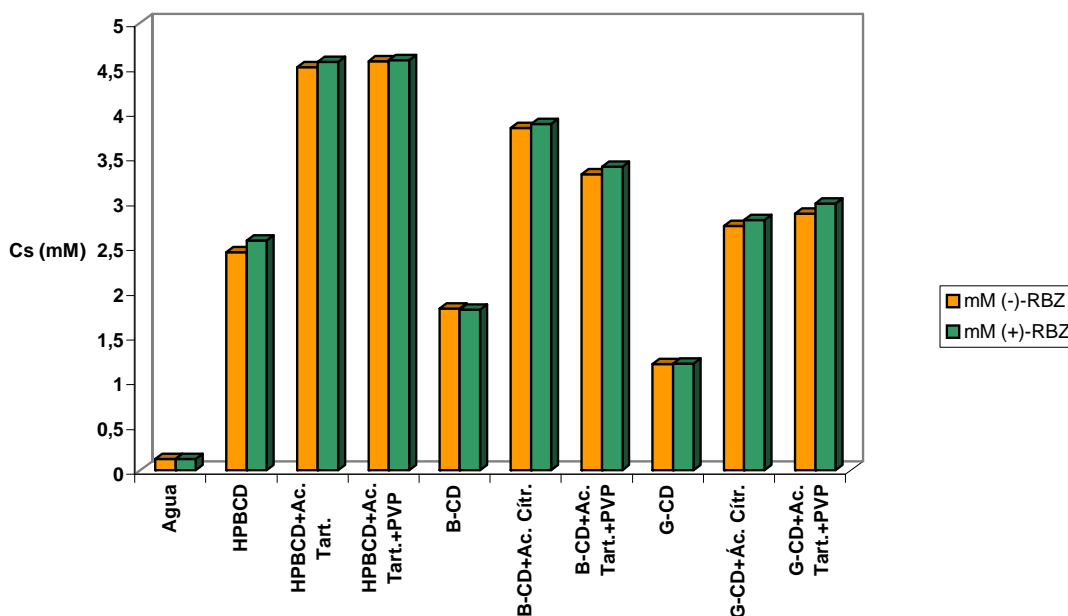


Figura 132. mM de (-)-RBZ y (+)-RBZ en las mejores condiciones según tipo de CD utilizada.

Como se puede observar en la figura 132, el mejor tipo de CD para aumentar la solubilidad de los enantiómeros de RBZ es la HP β CD 10%. Posteriormente la β -CD y en último lugar la γ -CD. La combinación de éstas con los ácidos orgánicos provocó un aumento de la solubilidad de los enantiómeros en todas las formulaciones y especialmente en las mostradas en la figura 132, la HP β CD y el ácido tartárico, la β -CD y el ácido cítrico y la γ -CD y el ácido cítrico. Este aumento de solubilidad utilizando la combinación de las CD con el cambio de pH provocado en el medio por el ácido orgánico correspondiente, provocó en todos los casos el aumento de solubilidad al doble prácticamente respecto a la combinación tan sólo con la CD. Por último, la combinación de las CD con los polímeros

hidrosolubles (HPMC o PVP) y ácidos orgánicos, ofreció resultados muy variados que han sido comentados anteriormente, y en prácticamente todos los casos ofrecieron interacciones negativas, y por consiguiente un descenso en la solubilidad de los enantiómeros de RBZ. Tan sólo la combinación ácido tartárico y PVP con las tres CD ofreció un resultado parecido a aquel obtenido en ausencia del polímero, por lo tanto no se justifica su uso para aumentar la solubilidad ya que ésta permanece igual que en la combinación de la CD con el ácido orgánico.

A continuación se observa el ratio, R(+)/S(-) de los enantiómeros de rac-RBZ, tras ser estudiado en distintas condiciones en solución con la β -CD (figura 133), HP β CD (figura 134) y γ -CD (figura 135):

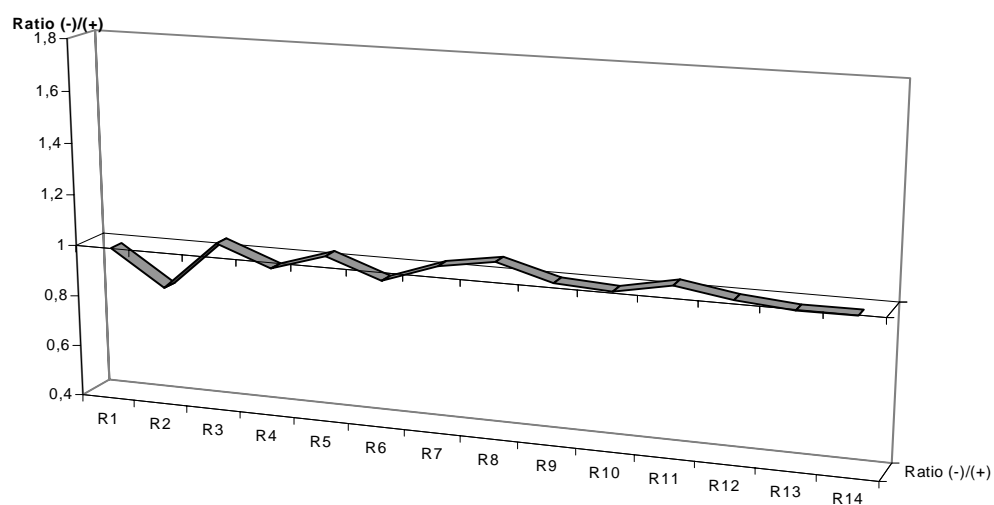


Figura 133. Ratio (-)/(+) de rac-RBZ en distintas soluciones que contienen β -CD en distintas condiciones (con polímeros hidrosolubles y/o ácidos orgánicos).

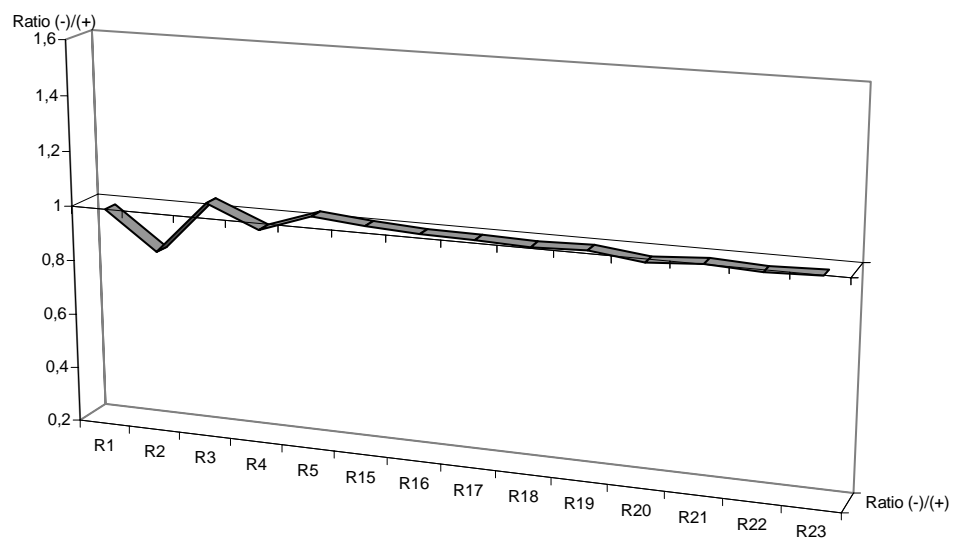


Figura 134. Ratio (-)/(+) de rac-RBZ en distintas soluciones que contienen HP β CD en distintas condiciones (con polímeros hidrosolubles y/o ácidos orgánicos)

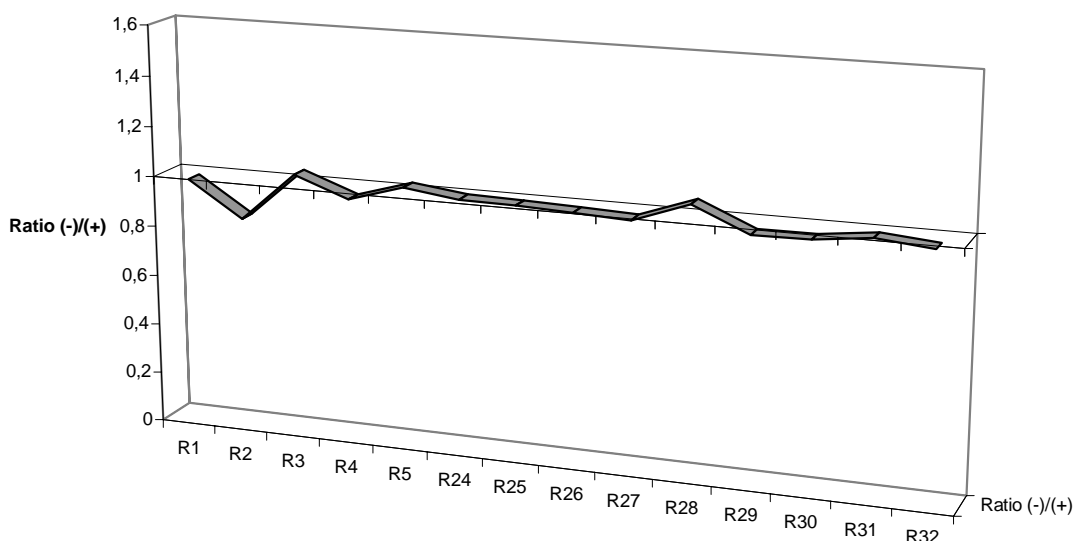


Figura 135. Ratio de (-)/(+) de rac-RBZ en distintas soluciones que contienen γ -CD en distintas condiciones (con polímeros hidrosolubles y/o ácidos orgánicos)

Como se puede observar en las figuras 133, 134 y 135 los ratios de los enantiómeros de la forma rac-RBZ en todas las condiciones estudiadas siempre es similar a 1, por lo tanto no existen diferencias significativas provocadas por interacciones enantioselectivas, con la HP β CD, la HPMC o el ácido tartárico.

- Sobrepresión y altas temperaturas en el autoclave.

Al igual que los ensayos en el baño a 37°C para el autoclave tan sólo dispusimos de rac-RBZ, y no de los enantiómeros puros. Se utilizará la concentración de HP β CD 10% para preparar las soluciones de rac-RBZ. A dichas soluciones se les añadirán distintas proporciones (0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25) de los polímeros hidrosolubles (PVP y/o HPMC) y ácidos orgánicos (cítrico y tartárico), y se estudian los ratios de (-)/(+).

En los estudios previos realizados para los enantiómeros de rac-KP a distintas proporciones de HP β CD en presencia de distintos medios (agua desionizada, pH 1.2 y pH 9.0), podemos decir que tras

el ciclo en el autoclave la solubilidad de los enantiómeros de HP β CD disminuye a los tres pH a partir de 10%, actuando incluso ésta como catalizador de la degradación del RBZ.

Procedimos a realizar distintas combinaciones de RBZ con la HP β CD al 10% y los polímeros hidrosolubles en diferentes proporciones, con o sin la acidificación del medio por medio de los ácidos orgánicos (cítrico o tartárico).

Los mejores resultados para el aumento de la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ se obtuvieron con la HP β CD al 10% y la HPMC 0.15%, el resto de las proporciones de HPMC dará menores resultados de solubilidad e incluso a HPMC 0.25% no se observó un aumento respecto a la muestra que tan sólo contiene la HP β CD 10%. La combinación de las diferentes proporciones polímero hidrosoluble con los ácidos orgánicos (cítrico o tartárico) no provoca un aumento en la solubilidad respecto a los resultados obtenidos tan sólo para el polímero hidrosoluble 0.15%. Por tanto en todos los casos las combinaciones de estos tres factores ofrecen unos valores menores de solubilidad.

Los diferentes valores de PVP añadidos al medio poseerán también una repercusión en la solubilidad. El mejor valor de solubilidad para la PVP añadida a la solución que contiene 10% de CD es la obtenida con una proporción del 0.10%. De nuevo y en la proporción de 0.25%, al igual que sucedía para la HPMC, la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ disminuyen. Por otro lado, la combinación de la CD, el polímero (en diferentes proporciones) y los ácidos orgánicos (cítrico y tartárico) no provoca aumentos significativos en la solubilidad de los enantiómeros de rac-RBZ sino que prácticamente obtenemos el mismo resultado en todas las combinaciones.

Las mejores combinaciones de RBZ con la HP β CD 10% y los polímeros hidrosolubles en combinación o no con los ácidos orgánicos se muestran a continuación:

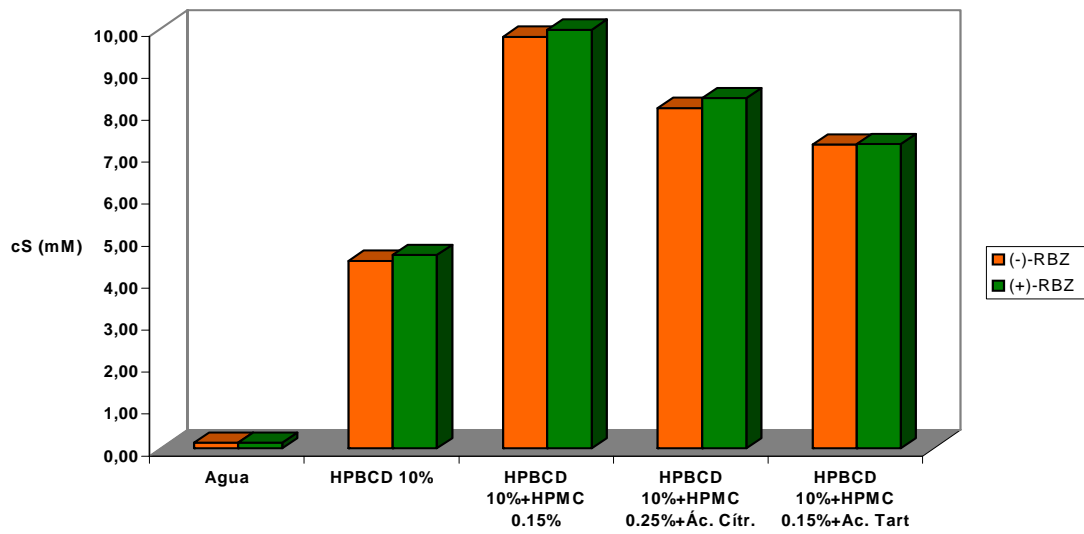


Figura 136. Mejores resultados para las combinaciones de HPβCD 10% con la HPMC y los ácidos orgánicos.

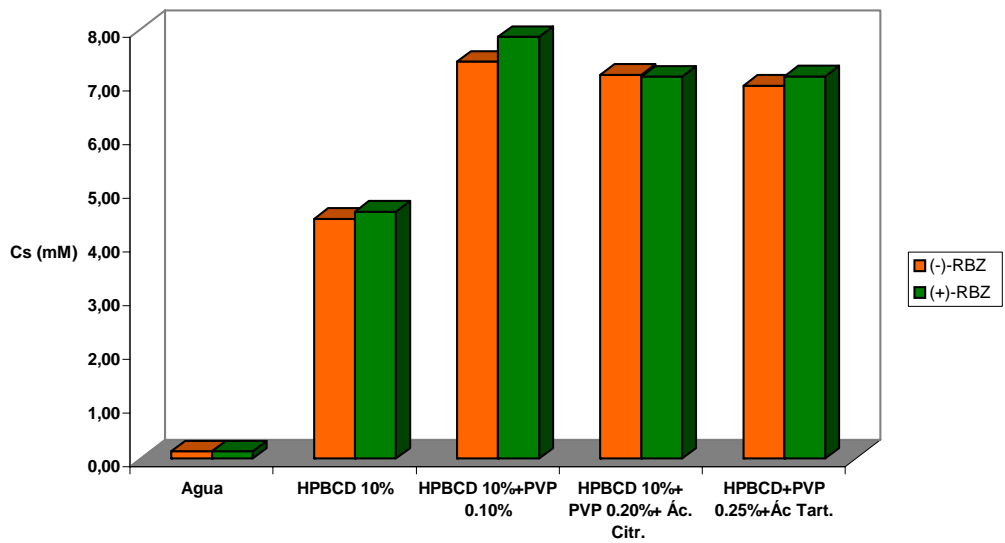


Figura 137. Mejores resultados para las combinaciones de HPβCD 10% con la PVP y los ácidos orgánicos.

En la figura 138 se observan los ratios (-)/(+) de los enantiómeros de RBZ en presencia de la HP β CD 10% en distintas proporciones de HPMC en presencia o ausencia de ácido cítrico o ácido tartárico (50 mM).

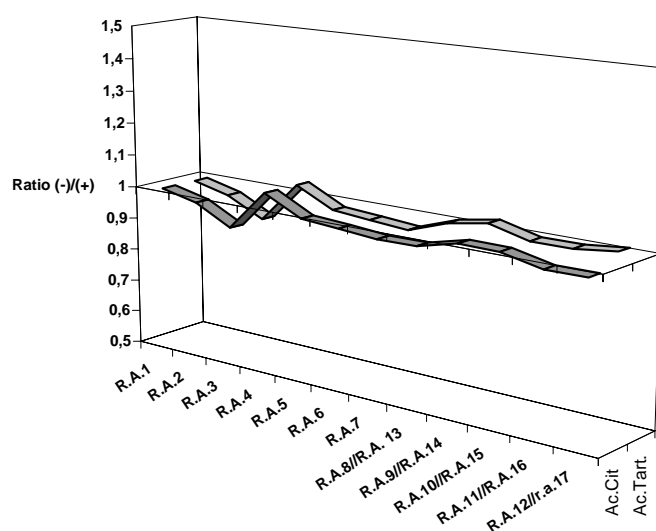


Figura 138. Ratio (-)/(+) de los enantiómeros de rac-RBZ en presencia de HP β CD 10%, y distintas proporciones de HPMC y ácido cítrico (50 mM) o ácido tartárico (50 mM)

Como se puede observar en la figura 138, el ratio de (-)/(+) es prácticamente 1 en todos los casos estudiados. Incluso en aquellas muestras en las que existe gran número de componentes quirales, sea HP β CD, HPMC y el ácido tartárico no se producen interacciones que sean el origen de cambios en la solubilidad de uno de los enantiómeros.

En la figura 139 se observan los ratios (-)/(+) de los enantiómeros de RBZ en presencia de la HP β CD 10% a distintas proporciones de PVP en presencia o ausencia de ácido cítrico o ácido tartárico (50 mM).

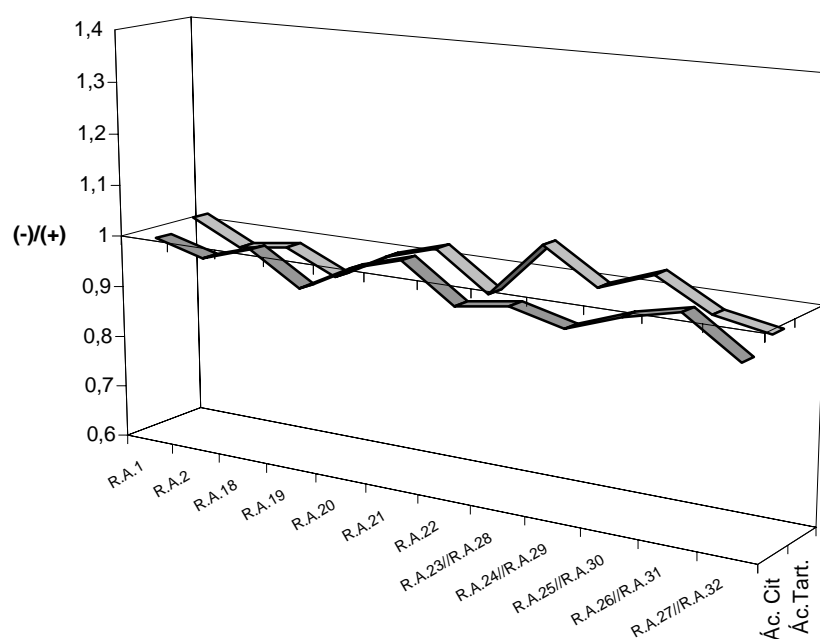


Figura 139. Ratio (-)/(+) de los enantiómeros de rac-RBZ en presencia de HP β CD 10% a distintas proporciones de PVP y ácido cítrico (50mM) o ácido tartárico (50 mM).

De la misma manera que para el caso anterior, los enantiómeros de rac-RBZ siguen conservando la misma solubilidad en los distintos casos, y por tanto el ratio es prácticamente igual a 1. Este hecho se debe a la estructura interna cristalina de rac-RBZ.

3. VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN (MATRICES HIDRÓFILAS)

Como ya anticipamos al principio de esta discusión final, la velocidad de disolución de los fármacos también fue estudiada en distintas condiciones para observar la posible aparición de diferencias enantioselectivas, por medio de matrices hidrófilas elaboradas con excipientes quirales (HPMC) y otras no quirales (Eudragit RL). Cada fármaco, se describe a continuación:

3.1. KETOPROFENO

Las primeras matrices que fueron estudiadas para este fármaco, fueron elaboradas con la forma rac-KP ó la MF (1:1) y la HPMC 15. Los resultados obtenidos, expresados en ratio S(+)/R(-) se muestran a continuación:

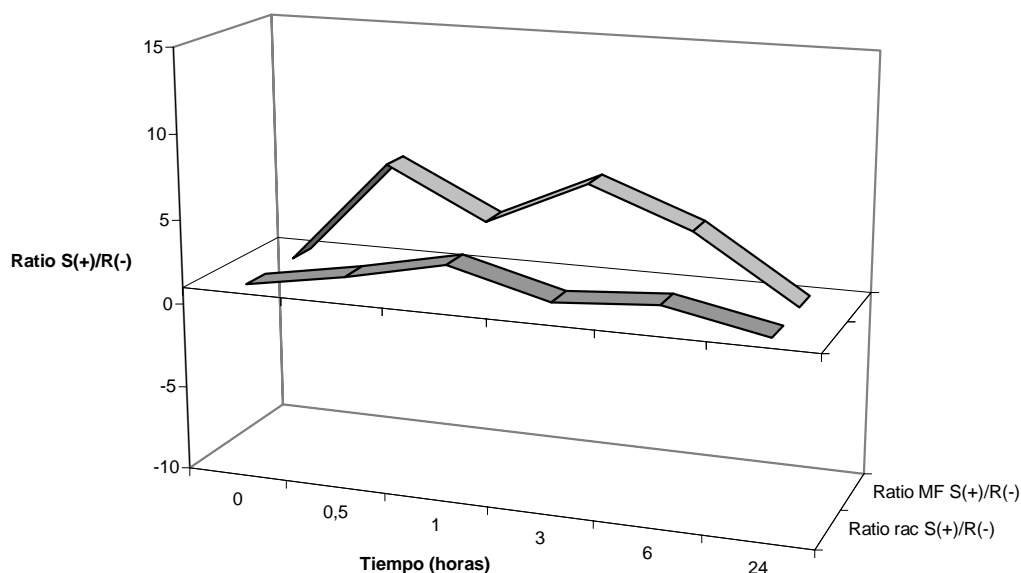


Figura 140. Ratio S(+)/R(-)KP a partir de matrices elaboradas con la forma rac-KP o la MF de los enantiómeros y la HPMC 15.

Como se puede observar en la figura 140 el ratio S(+)/R(-) es mayor a 1 en ambos casos, especialmente para la MF (1:1), tal y como se comentó en la parte de resultados y discusión calculando en esa sección los parámetros cinéticos de las formulaciones y comprobando que en la liberación de

los enantiómeros al medio interviene tanto la difusión del fármaco como la erosión de la matriz. Se observó también una posible interacción enantioselectiva para el R(-)-KP con la HPMC 15, excipiente que posee carbonos asimétricos en su estructura. Por otro lado, dicha interacción se hace mucho más acusada cuando el enantiómeros R(-) proviene de la formulación elaborada con la MF (1:1). Volvemos a obtener en este momento resultados similares a aquellos obtenidos anteriormente cuando se estudió la solubilidad de las distintas formas de KP en las diferentes proporciones. De nuevo el enantiómero puro R(-) parece poseer menor velocidad de disolución que el S(+). De todos modos, tras el estudio de los parámetros cinéticos observamos la posible aparición de una interacción enantioselectiva del enantiómero R(-)-KP perteneciente a la forma de rac-KP, obteniéndose en el perfil ratio de ésta valores de ratio mayores de 1.

Posteriormente, tratamos de estudiar la influencia del excipiente en la velocidad de disolución de los enantiómeros de KP. Para ello realizamos elaboramos las matrices con la MF (1:1) de los enantiómeros de KP y el Eudragit RL, excipiente a su vez con propiedades de cesión sostenida. Se repitieron los estudios en dichas condiciones. A continuación se muestra la gráfica comparativa de los ratios S(+)/R(-) obtenidos con la matriz de HPMC 15 y la de Eudragit RL.

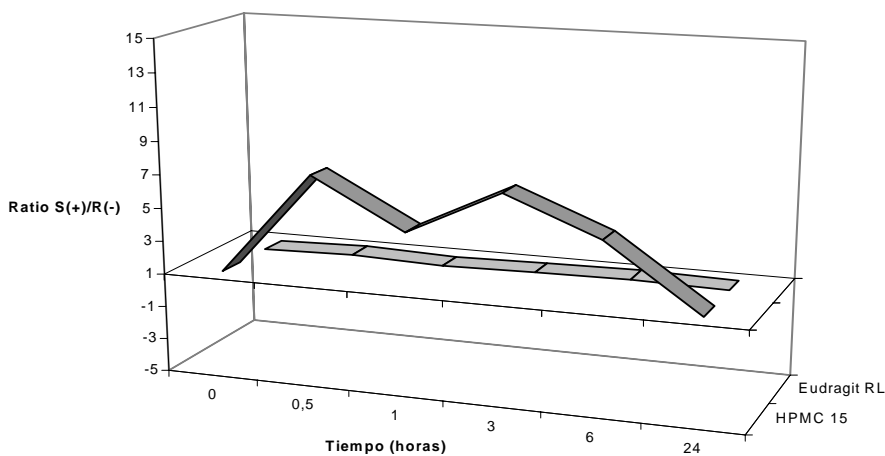


Figura 141. Ratio S(+)/R(-) obtenido a partir de matrices elaboradas con la HPMC 15 o Eudragit RL y MF (1:1) de los enantiómeros puros.

El estudio de los parámetros cinéticos de ambos enantiómeros en ambas formulaciones demostró que la cesión de los enantiómeros a medio, tanto a partir de la matriz elaborada con la

HPMC 15 como con el Eudragit RL, dependía tanto de la difusión de los enantiómeros a través de la matriz, como de la erosión de ésta.

Como se puede observar en la figura 141, el ratio de la formulación elaborada con la HPMC 15 siempre es mayor a 1, mientras que la matriz elaborada con el Eudragit RL ofrece una cesión similar entre ambos enantiómeros. Este hecho demuestra entonces la existencia de una interacción enantioselectiva entre el enantiómero R(-) y la HPMC 15 que ya había sido observada incluso en la formulación elaborada con la forma rac-KP. Dicha interacción se hace más importante cuando el enantiómero puro R(-)-KP es utilizado para realizar el estudio. De nuevo volvemos a incidir en la importancia de la estructura cristalina en los resultados obtenidos.

Posteriormente elaboramos otras matrices que contenían la MF (1:1) y la HPMC 15 pero a dosis menores para comprobar que la interacción enantioselectiva encontrada para el enantiómero R(-)-KP, puede ser debida también a la baja solubilidad de los enantiómeros de KP, y al efecto “no sink” o de saturación del medio. A continuación se presenta los ratios S(+)-KP/R(-)-KP obtenidos para las formulaciones elaboradas con la HPMC 15 y la MF (1:1) a distintas dosis (200, 100, 50 y 25 mg).

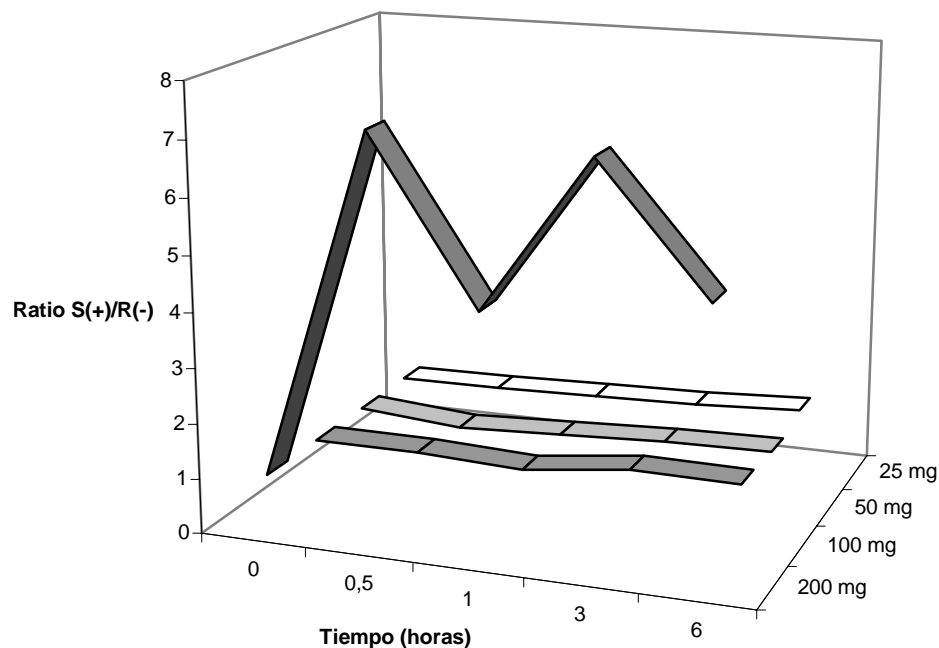


Figura 142. S(+)/R(-) ratio de los enantiómeros de KP en las diferentes formulaciones elaboradas con la MF (1:1) (200, 100, 50 y 25 mg) y la HPMC 15

Como puede observarse en la figura 142, cuando las condiciones de trabajo son “no sink” o de saturación, la estereoselectividad, es decir, la aparición de la interacción enantioselectiva de R(-) con la HPMC 15 aparecen (200 mg). Sin embargo si la riqueza de las matrices se disminuye, y por tanto se cumplen o se acercan a las condiciones “sink” entonces los ratios son prácticamente iguales a 1 (100, 50 y 25). El estudio cinético para todas las formulaciones ofreció resultados similares, siendo responsable de la liberación al medio tanto la difusión del enantiómero a través de la matriz, como la erosión de la matriz.

3.2. TALIDOMIDA

Los comprimidos que se utilizaron fueron, sólo elaborados con la forma rac-TH, debido a no poseer suficiente cantidad de los enantiómeros puros.

Se elaboraron matrices con rac-TH y HPMC 15 o Eudragit RL. Los resultados correspondientes a los ratios R(+)/S(-) se muestran en la figura 143 para estos dos tipos de formulaciones.

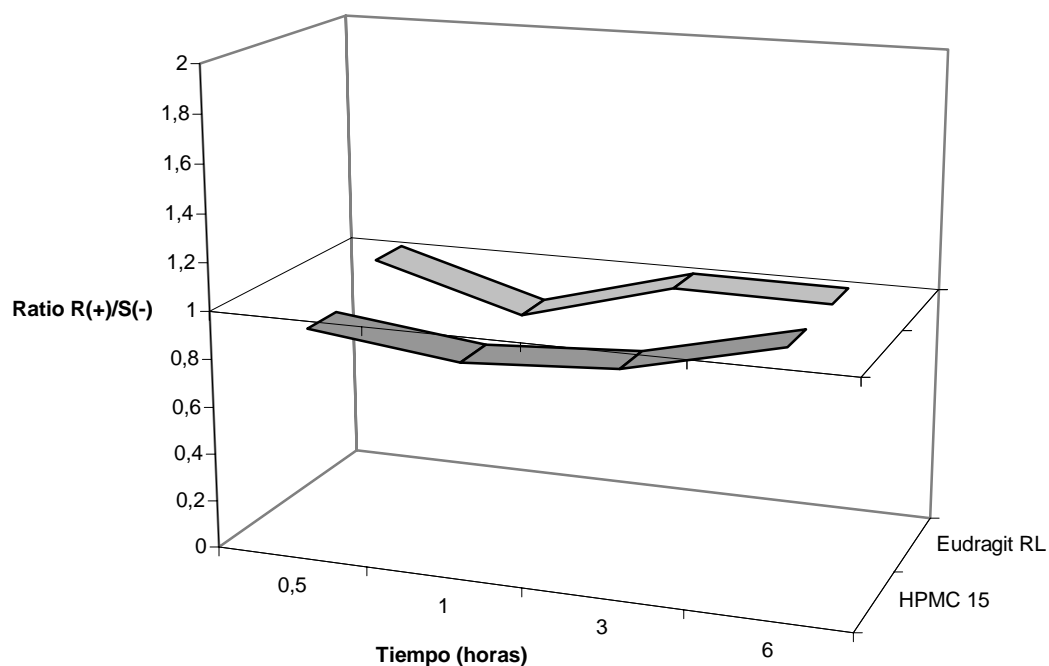


Figura 143. Ratio R(+)/S(-) de los enantiómeros de rac-TH a diferentes tiempos para la matriz de HPMC 15 y Eudragit RL

No existen en ningún caso diferencias enantioselectivas importantes, por tanto no se produce interacciones enantioselectivas entre los enantiómeros de rac-TH y los excipientes, de ahí que el ratio sea siempre prácticamente igual a 1. El estudio cinético demostró que la cesión al medio se debía a los factores tanto de difusión del enantiómero al medio como de erosión de matriz.

También se estudiaron matrices elaboradas a distintas dosis (20 y 10 mg), los resultados se muestran a continuación:

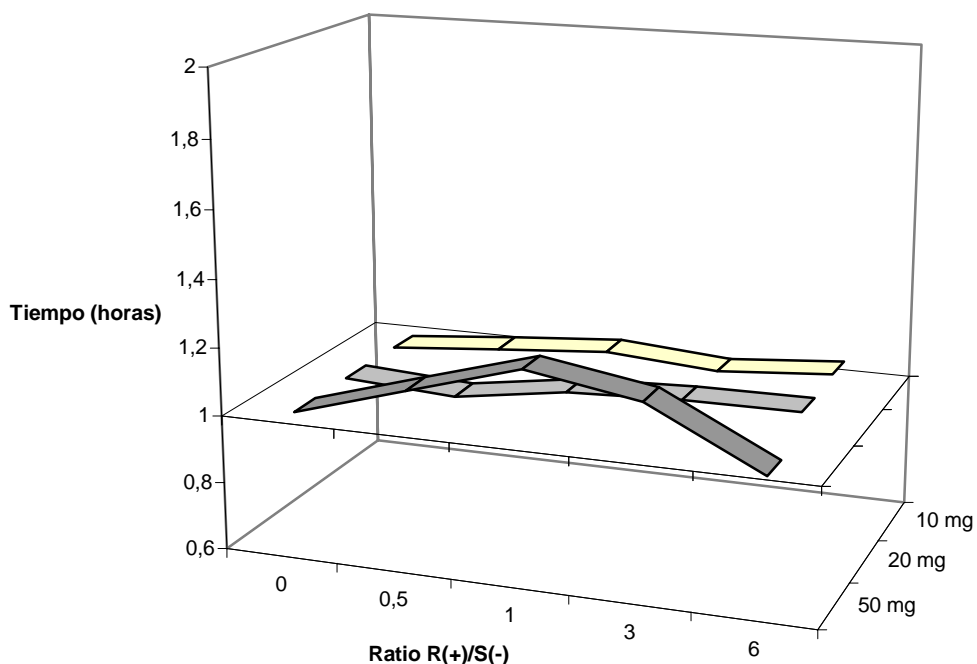


Figura 144. Ratio R(+)/S(-) de los enantiómeros de rac-TH a diferentes tiempos para las distintas matrices elaboradas con la HPMC 15.

Como se puede observar en la figura 144 no aparecen en ningún caso diferencias enantioselectivas. Aparentemente, este hecho es debido a que en el medio no se produjeron las citadas condiciones “no sink” o de saturación del medio pero por otro lado debemos decir que, ya en los estudios de solubilidad realizados siempre en condiciones de saturación no se observaron diferencias enantioselectivas entre los enantiómeros de la forma rac-TH.

El estudio cinético fue similar para las formulaciones de 50 y 20 mg y distinto para el 10 mg en el que la liberación de los enantiómeros al medio se debe única y exclusivamente a la difusión de éstos a través de la matriz.

3.3. RICOBENDAZOL

Al igual que para el fármaco descrito anteriormente, para el RBZ se realizaron todos los estudios utilizando tan sólo la forma rac-RBZ.

A continuación se muestra el ratio (-)/(+) de RBZ a diferentes tiempos para la matriz de HPMC 15 y de Eudragit RL.

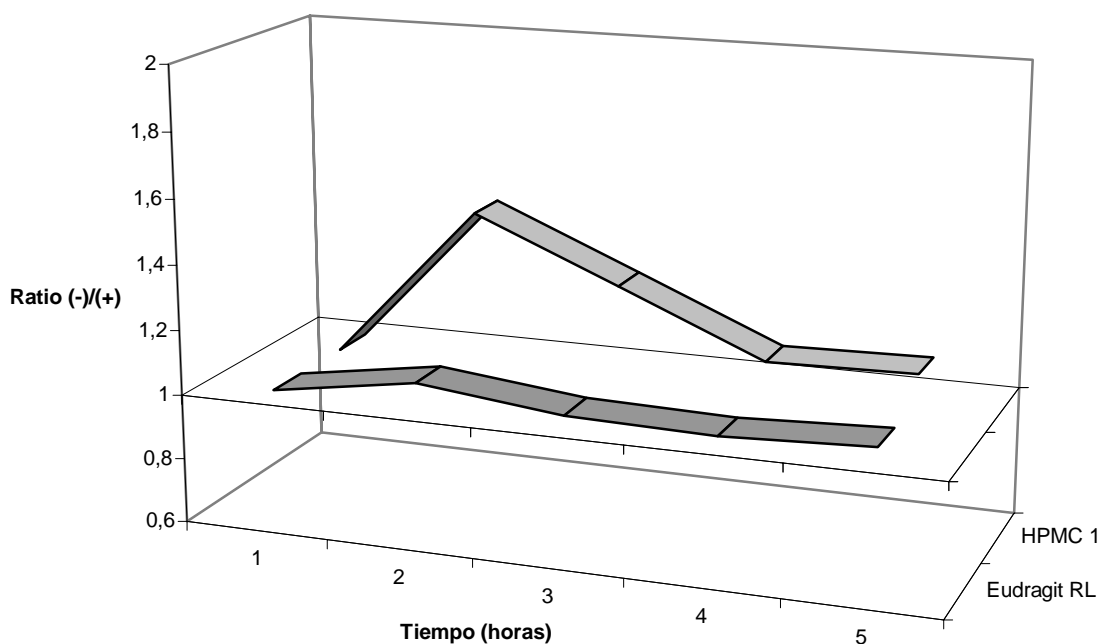


Figura 145. Ratio (-)/(+) de RBZ a diferentes tiempos para las matrices de HPMC 15 y Eudragit RL.

Como se puede observar en la figura 145, se producen ratios mayores de la unidad para las matrices elaboradas con la HPMC 15. El enantiómero (+) aparentemente interactuará más con los carbonos asimétricos que posee la HPMC 15 en su estructura. Los resultados obtenidos con la matriz elaborada con el Eudragit ofrecen siempre resultados similares a la unidad por tanto no existe enantioselectividad en los resultados.

Para comprobar si las condiciones “no sink” utilizadas y la baja solubilidad del RBZ son responsables de la aparición de las diferencias enantioselectivas en el medio, se elaboran como en los casos anteriores otras matrices que poseen menor dosis de RBZ (50 y 20 mg). Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

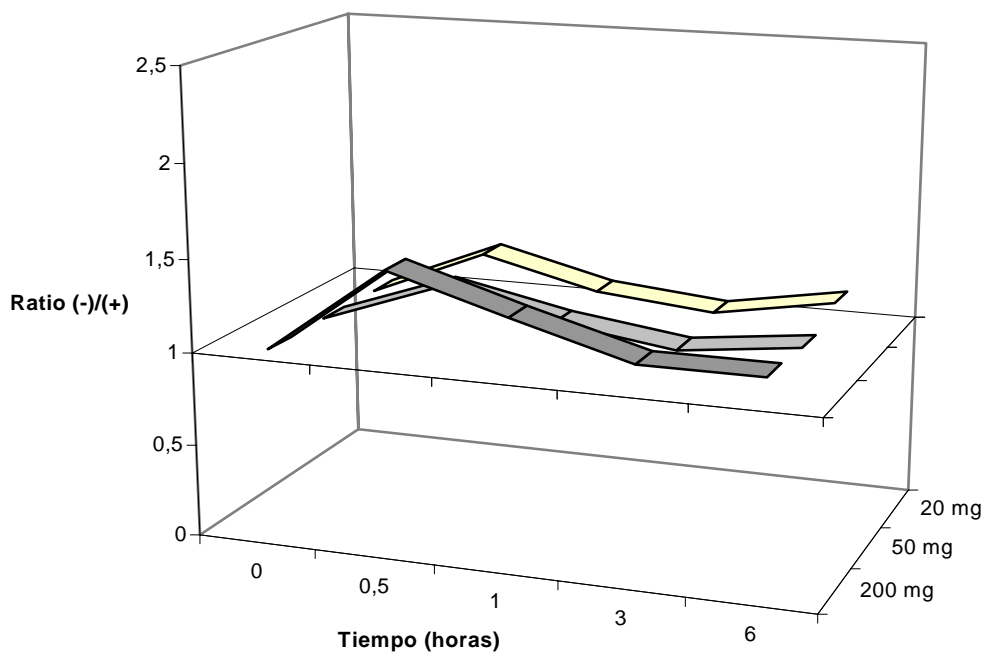


Figura 146. (-)/(+) Ratio de RBZ a diferentes tiempos, en las diferentes formulaciones (200, 50 y 20 mg)

Como se puede observar el ratio de las formulaciones es similar en todos los casos, pero en las formulaciones de 50 y 20 mg se observa que el ratio es prácticamente 1. Este hecho se debe a la baja solubilidad que posee el RBZ y por otro lado a la aparición de condiciones “sink” en el medio.

BIBLIOGRAFÍA

- Advani, S.V., Singh, B.N. Pharmacodynamic, pharmacokinetic and antiarrhythmic properties of d-sotalol, the dextro-isomer of sotalol. *Drugs*. 49, 664-79, (1995).
- Advenier, C., Roux, A., Gobert, C. et al. Pharmacokinetics of ketoprofen in the elderly. *Br. J. Clin. Pharmacol*, 16:65-70, (1983).
- Aggarwal S, Singh PN, Mishra B. Studies on solubility and hypoglycemic activity of gliclazide beta-cyclodextrin-hydroxypropylmethylcellulose complexes. *Pharmazie* 57(3), 191-193, (2002).
- Álvarez, C., Sánchez-Brunete, J. A., Torrado, S., Torrado, J. J. "Enantioselective separation of thalidomide on an immobilized alpha1-acid glycoprotein chiral stationary phase" *Chromatographia*, 52, 455-458 (2000).
- Álvarez, C., Torrado, J. J., Cadórniga, R. "Stereoselectivity drug release from ketoprofen and ribobendazole matrix tablets" *Chirality*, 11 (8), 611-615 (1999).
- Álvarez, C., Van Hees, T., Piel, G., Evrard, B., Delattre, L. Preparation of Mebendazole HPβCD complexes using water-soluble polymers and organic acids. *S.T.P. Pharm. Sci.* 11(12), 129-135, (2001).
- Anderson, J.L., Ding, J., Mc.Culla, R.D., Jenks, W.S., Armstrong, D.W. Separation of sulfoxides and sulfinate esters on four derivatized cyclodextrins chiral stationary phases using capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. A*. 946, (1-2), 197-208, (2002).
- Andrisano, V., Booth, T.D., Cavrini, V., Wainer, I.W. Enantioselective separation of chiral arycarboxylic acids on an immobilized human serum albumin chiral stationary phase. *Chirality*, 9, 178-183, (1997).
- Ariens, E.J. Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 26, 663-8, (1984).
- Aubry, A.F., Wainer, I.W. An in vitro study of the stereoselective dissolution of (rac)-verapamil from two sustained release formulations. *Chirality*, 5:84-90, (1993).
- Baldwin, J.J., Abrams, W.B. Stereochemically pure drugs, and industrial perspective. In: Wainer, I.W., Drayer D.E., editors *Drug stereochemistry: Analytical methods and pharmacology*. New York. Marcel dekker, 311-356, (1988).
- Basci, N.E., Temizer, A., Bozkurt, A., Isirmer, A. Optimization of mobile phase in the separation of beta-blockers by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 18, 745-750, (1998).
- Bessis, D. Thalidomide for systemic lupus erythematosus. *Lancet*, 339, 549-550, (1992).
- Bettini, R., Santi, P., Catellani, P.L., Massima, G., Bellotti A., Guyot-Hermann, A.M., Trublin, F., Colombo, P. Permeation of piroxicam-β-cyclodextrin through artificial membranes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 38 (6), 203-208, (1992).
- Blanco, J.L., Vila-Jato, J., Otero, F., Anguiano, S. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 17, 943, (1991).
- Blaschke, G., Kraft, H.P., Fickenstcher, K. Et al. Chromatographische Racemattrennung von Thalidomid und terogene Wirkung der Enantiomere. *Arzneimittelforschung*, 29, 1640-2, (1979).
- Bodmeier, R., Paeratakul, O., Chen, H., Zhang, W. Formation of sustained release wax matrices within hard gelatin capsules in a fluidized bed. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 16, 1505-1519, (1990).

- Bonferoni, M.C., Caramella, C., Sangalli, M.E., Conte, U., Hernandez, R.M., Pedraz, J.L. Rheological behaviour of hydrophilic polymers and drug release from erodible matrices. *J. Control. Rel.* 18, 205-212, (1992).
- Brewster, M.E., Anderson, W.R., estes, K.S., Bodor, N. Development of aqueous parenteral formulations for carbamazepine through the use of modified cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.* 80 (4), 380-383, (1991).
- Brock, C.P., Schweizer, W.B., Dunitz, J.D. On the validity of wallach's rule: on the density and stability of racemic crystals compared with their crystal counterparts. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 9811-9820, (1991).
- Caldwell, J., Winter, S.M., Hutt, A.J. The pharmacological and toxicological significance of the stereochemistry of drug disposition. *Xenobiotica*, 18 suppl. 1, 59-70. (1988).
- Calero Montoya, J. Efecto de la utilización de ciclodextrinas en la solubilidad y estabilidad de aciclovir, ketoprofeno, ricobendazol y talidomida. Tesis Doctoral. U.C.M. Marzo 2001.
- Cao, B.J., Rodgers, R.J. Different behavioural profiles of the R(+)- and S(-)-enantiomers of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin in the murine elevated plus-maze. *Behav. Pharmacol.* 7(8), 810-819 (1996).
- Cushny, A.R. Biological relations of optically isomeric substances. London: Bailliere, Tindall and Cox, 1926.
- Cappello, B., Carmignani, C., Iervolino, M., Immacolata La Rotonda, M., Fabrizio Saettone, M. *Int. J. Pharm.* 1, 213, (1-2), 75-81, (2001).
- Castillo, J. A., Palomo, J., García, J.J., Lastres, J. J. Bolas, F., Torrado, J. J. "Preparation and characterization of alendazole β -cyclodextrin complexes" *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 (12), 1241-1248 (1999).
- Colatsky, T.J. Antiarrhythmic drugs: where are we going?. *Pharmaceuticals News*, 2-17-23, (1995).
- Coltart, D.J., Shand, D.G., Plasma propranolol levels in the quantitative measurement of β -adrenergic blockade in man. *BMJ*, 3, 731-4, (1970).
- Czjeka, M.J., Koch, H.P. Determination of thalidomide and its major metabolites by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* (23) 413, 181-187, (1987).
- Chen, C-H., Shieh, W-R, Lu, P.H., Harriman, S., Chen, C-Y. Metabolic stereoisomeric inversion of ibuprofen in mammals. *Biochim. and Biophys. Acta.* 1078, 411-417, (1991).
- Chen, C-Y., Chen C-S. Stereoselective disposition of ibuprofen in patients with compromised renal haemodynamics. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 40, 67-72, (1995).
- Chi, S.C., Jun, H.W. Release rates of ketoprofen from poloxamer gels in a membraneless diffusion cell. *J. Pharm. Sci.* 80: 280-283, (1991).
- Chiou, G.C.W., Zhao, F., Shen, Z-H. et al. Effects of D-timolol and L-timolol on ocular blood flow and ocular blood pressure. *J. Ocular Pharmacol.* 6, 23-9, (1990).
- Davies, N.M., Wang, G., Tucker, I.G. Effect of a hydrocortisone/hydroxypropyl- β -cyclodextrin solution for ocular drug delivery. *Int. J. Pharm.* 156, 201-209, (1997).
- Doelker, E. Water swollen cellulose derivative in pharmacy. En: Peppas, N.A. (ed.) *Hydrogels in medicine and pharmacy*, vol. 2. CRC Boca Raton. Florida, (1980).

- Dollo, G., Thompson, D.O., le Corre, P., Chevanne, F., Le Verge, R. Inclusion complexation of amide-typed local anesthetics with β -cyclodextrin and its derivatives. III. Biopharmaceutics of bupivacaine-SBE7- β CD complex following percutaneous sciatic nerve administration in rabbits. *Int. J. Pharm.* 164, 11-19, (1998).
- Duddu, D.P., Vakilynejad, M., Jamali, F., Grant, D.J.W. Stereoselective dissolution of propranolol hydrochloride from HPMC matrices. *Pharm. Res.*, 10 (11), 1648-1653, (1993).
- Duddu, S.P., Grant, D.J. Formation of the racemic compound of ephedrine base from a physical mixture of its enantiomers in the solid, liquid, solution or vapor state. *Pharm. Res.* 9(8), 1083-1091, (1992).
- Duddu, S.P., Khin-Khin, A., Grant, D.J.W., Suryarayanan, R. A novel X-ray powder diffractometric method studying the reaction between pseudophedrine enantiomers. *J. Pharm. Sci.* 86(3), 340-345, (1997).
- Easson, L.H., stedman, E. Studies on the relationship between chemical constitution and physiological constitution. V. Molecular dissimetry and physiological activity. *Biochem. J.* 27, 1257-66, (1933).
- El-Arini, S.K., Giron, D., Leuenberger, H. Solubility properties of racemic praziquantel and its enantiomers. *Pharm. Dev. Technol.* 3(4), 557-564, (1998).
- Eliel, E.L., Wilen, S.H., Mander, L.N. Stereochemistry of organic compounds; John Wiley & sons: New York, (1994).
- Eriksson, T., Bjorkman, S., Fyge, A. Determination of thalidomide in plasma and blood by high-performance liquid chromatography avoiding hydrolytic degradation. *J. Chromatogr.* 582, 211, (1992).
- Eriksson, T., Bjorkman, S., Roth, B. et al. Stereospecific determination, chiral inversion *in vitro* and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. *Chirality.* 7, 44-52, (1995).
- European Pharmacopeia 3ª Edición. European Department for the quality of medicines within the Council of Europe. Strasbourg (1997).
- Fabro, S., Smith, R.L., Williams, R.T. Toxicity and teratogenicity of optical isomers of thalidomide. *Nature*, 215-69, (1967).
- Fauci, M.T., Mura, P. Effect of water-soluble polymers on naproxen complexation with natural and chemically modified beta-cyclodextrins. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27(9), 909-917, (2001).
- Foster, R.T., Jamali, F., Russell, A.S. Pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers on cholecystectomy patients: influence of probenecid. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 37:589-594, (1989).
- Foster, R.T.; Jamali, F. Stereoselective of ketoprofen in the rat. Influence of route of administration. *Drug Metab. Disp.*, 16: 623-626, (1988).
- Foster, R.T.; Jamali, F.; Russel, A.S.; Alballa, S.R. Pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers in healthy subjects following simple and multiple doses. *J. Pharm. Sci.*, 77: 70-73 (1988).
- Fraunfelder, F.T., Barker, A.F. Respiratory effects of timolol. *N. Engl. J. Med* 311-1441, (1985).
- Frijlink, H.W., Eissens, A.C., Schoonen, A.J.M., Lerck, C.F. The effects of cyclodextrins on drug release from fatty suppository bases. Application of cyclodextrin derivatives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 38 (5), 174-179, (1992).

- Frijlink, W.H., Visser, J. Hefting, N.R., Meijer, D.K.F. Lerck, C.F. The pharmacokinetics of β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin in the rat. *Pharm. Res.* 7 (12), 1248-1252, (1990).
- Frömming, K.H., Szejtli, J. *Cyclodextrin in Pharmacy*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, (1994).
- Fujioka, K., Kurosaky, Y. Sato, S. Noguchi, T., Yamahira, Y. Biopharmaceutical study of inclusion complexes of benzocaine fumarate. *Chem. Pharm. Bull.* 31, 2416, (1983).
- Gorin, I. Thalidomide in hyperalgetic pharyngeal ulceration of AIDS. *Lancet*, 335, 1343, (1990).
- Gross, A.S., Mikus, G., Fischer, C. et al. Stereoselective disposition of flecaidine in relation of the sparteine/debrisoquine metaboliser phenotype. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 28, 555-6, (1988).
- Hayball, P.J., Nation, R.L., Bochner, F. Plasma protein binding of ketoprofen enantiomers in man. Method development and its application. *Chirality*, 3: 460-466 (1991).
- Higuchi, T., Connors, K.A. Phase solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* 4, 117, 212, (1965).
- Höglund, P., Eriksson, T., Björkman, S. A double-blind study of the sedative effects of the thalidomide enantiomers in humans. *J. Pharma. Biopharm.* 26 (4), 363-83, (1998)
- Hooper, W.D., Qing M.S. The influence of age and gender on the stereoselective metabolism and pharmacokinetics of mephobarbital in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 48, 633-40, (1990).
- Irie, T., Otagiri, M., Sunada, M., Uekama, K., Ohtani, Y., Yamada, Y., Sugiyama, Y. Cyclodextrin-induced hemolysis and shape changes of human erythrocytes in vitro. *J. Pharmacobio-Dyn.* 5, 741-744, (1982).
- Irie, T., Tsunenari, K. Uekama, K., Pitha, J. Effect of bile on the intestinal absorption of cyclodextrin in rats. *Int. J. Pharm.* 43, 41-44, (1988).
- Jacques, J., Collet, A., Wilen, S.H. *Enantiomers, Racemates and Resolutions*. John Wiley & Sons. New York, 1981 (edición 1991, modificada por, Krieger Publishing Company, Malabar, FL, 1994).
- Janjikhel, R.K., Adeyeye, C.M. Dissolution of ibuprofen enantiomers from coprecipitates and suspensions containing chiral excipients. *Pharm. Dev. Tech.* 4: 9-17, (1999).
- Janjikhel, R.K., Adeyeye, C.M. Stereospecific formulation and characterization of sustained release ibuprofen microspheres. *J. Microencapsul.* 14(4), 409-426, (1997).
- Jantzen, G.M.; Robinson, J.R. Sustained and controlled-release drug delivery systems. En: Banker, G.S.; Rhodes, C.T. (eds). *Modern Pharmaceutics*. Marcel Dekker, Inc. New York (1996).
- Johnsons M., Hoestery, T., Anderson, B. Solubilization of a tripeptide HIV protease inhibitor using a combination of ionization and complexation with chemically modified cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.* 83, 1142-1146, (1994).
- Karnes, H.T., Sarkar, M.A. Enantiomeric resolution of drug compounds by liquid chromatography. *Pharm. Res.* 4(4), 285-292, (1987).
- Koizumi, K., Miki, H., Kubota, Y. Enhancement of the hypnotic potency of barbiturates by inclusion complexation with β -cyclodextrin. *Chem. Pharm. Bull.* 28(1), 319-322, (1980).

- Kommuru, TR, Khan, MA, Reddy, IK. Racemate and enantiomers of ketoprofen: phase diagram, thermodynamic studies, skin permeability, and use of chiral permeation enhancers. *J. Pharm. Sci.*, 87(7):833-40, (1998).
- Krenn, M., Gamcsik, M.P., Vogelsang, G.B., Colvin, O.M., Leong, K.W. Improvements in solubility and stability of thalidomide upon complexation with hidroxypropyl-beta-cyclodextrin. *J. Pharm. Sci.* 81(7), 685-689, (1992).
- Krosmeier, R.W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., Peppas, N.A. Mechanism of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* 15, 25-35, (1983).
- Lanning C.F., Harmel, M.H. Ketamine anesthesia. *Ann. Rev. Med.* 26, 137-41, (1975).
- Law, B., Houghton, S.J., Ballard, P. An approach to the evaluation and comparison of reversed-phase high-performance liquid chromatography stationary phases. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17,443-453, (1998).
- Lehman, F.P.A., Rodrigues de Miranda, J.F., Ariens, E.J. "Progress in Drug Research". 20, 101, (1976).
- Lennard, M.S., Tucker, G.T., Woods, H.F. Stereoselectivity in pharmacokinetics and drug metabolism. In: Taylor JB, editor. *Comprehensive medicinal chemistry*. Vol. 5. Biopharmaceutics Oxford, Pergamon Press, 187-204, (1990).
- Lennard, M.S., Tucker, G.T., Silas J.H. et al. Differential stereoselective metabolism of metoprolol in extensive and poor debrisoquin metabolisers. *Clin. Pharmacol. Ther.* 34, 732-7, (1983).
- Lenz, W. Malformations caused by drugs in pregnancy. *Lancet*, 45, (1962).
- Levin, S., Sterin, M., Magora, A., Popescu, A. Resolution of enantiomers of uridine analogs, potential, antiviral agents. *J. Chromatogr. A.* 752, 131-146, (1996).
- Li, G., Treiber, G., Maire, K. Et al. Disposition of ibuprofen in patients with liver cirrhosis. Stereochemical considerations. *Clin. Pharmacokinet.* 25. 154-63, (1993).
- Li, Z.J. Implications of chirality on the Physical properties and crystallizations of chiral drugs. Ph.D. Dissertation, University of Minnesota, (1997).
- Li, Z.J., Grant, D.J. W. Thermal analysis as a method for characterizing racemic species. *Pharm. Res.* 13(9) suppl, 340, (1996).
- Li, Z.J., Grant, D.J.W. Relationship between physical properties and crystal structure of chiral drugs. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86 (10), 1073-1078, (1997).
- Lienne, M., Caucle, M., Rosset, R. Direct dissolution of antihelmintic drug enantiomers on chiral AGP protein-bonded chiral stationary phase. *J. Chromatogr.* 472, 265-270, (1989).
- Loftsson, T. Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug bioavailability through addition of water-soluble polymers. *Pharmazie*, 53 (11), 733-740, (1998).
- Loftsson, T., Friðriksdóttir, H. The effect of water-soluble polymers on the aqueous solubility and complexing abilities of β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* 163, 115-121, (1998).

- Loftsson, T., Friðriksdóttir, H., Sigurðardóttir, A.M., Ueda, H. The effect of water-soluble polymers on drug-cyclodextrin complexation. *Int. J. Pharm.* 110, 169-177, (1994).
- Loftsson, T., Gudmundsdóttir, T.K., Friðriksdóttir, H. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 22, 403-407, (1996).
- Loftsson, T., Mátsson, M., Sigurjónsdóttir, J.F. Methods to enhance the complexation efficiency of cyclodextrins. *S.T.P.Pharm. Sci.* 9(3), 237-242, (1999).
- Loftsson, T., Stefánsson, E. Effect of cyclodextrins on topical drug delivery to the eye. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23 (5), 473-481, (1997).
- Lotter, J., Krieg, H.M., Keizer, K., Breytenbach, J.C. The influence of beta-cyclodextrins on the solution of chlortalidone and its enantiomers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25(8), 879-884, (1999).
- M.J.Barbanoj, R.M., Antonijuan, Gich, I. Clinical pharmacokinetic of desketoprofen. *Clin. Pharmacokinet.* 40(4), 245-62. (2001). Review.
- Marques, M.P., Takayanagui, O.M., Bonato P.S., Santos SR, Lanchote, V.L. Enantioselective kinetic disposition of albendazole sulfoxide in patients with neurocysticercosis. *Chirality*, 11(3):218-23, (1999).
- Masuda, K., Ito, A., Ikari, T., Terashima, A., Matsuyama, T. Protective effects of cyclodextrin on the local irritation induced by aqueous preparation of flurbiprofen. *Yakugaku Zasshi.* 104, 1075, (1984).
- Mauleón, D., Artigas, R., García M.L., Carganico, G. Preclinical and clinical development of desketoprofen. *Drugs*, 5:24-46 (1996).
- Melia, C.D. Hydrophilic matrix sustained-release systems based on polysaccharide carriers. *Critical reviews in Therapeutic Drug carrier Systems*, 8, 395-421, (1991).
- Menzel-Soglowek, S., Geisslinger, G., Brune, K. Stereoselective HPLC determination of ketoprofen, ibuprofen and fenoprofen in plasma using a α_1 -Acid glycoprotein. *J. Chromatogr.* 532, 295-303, (1990).
- Moyano Méndez, J.R., Ginés Dorado, J.M. Arias Blanco, M.J. Rabasco Álvarez, A.M. Utilidad de ciclodextrinas y derivados en el campo farmacéutico. *Tecn. Farm.* 71-76, (1994).
- Muller, N., Payan, E., Lapique, F., Bannwarth, B., Netter, P. Pharmacological aspects of chiral nonstereoisomeric anti-inflammatory drugs. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 4:617:634 (1990).
- Mullers, B., Albers, E. Complexation of dihydropyridine derivatives with cyclodextrins and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in solution. *Int. J. Pharm.* 79, 273-288, 1992.
- Mura, P., Faucci, M.T., Bettinetti, G.P. The influence of polyvinylpyrrolidone on naproxen complexation with hydroxypropylbetacyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13 (2), 187-194, (2001).
- Nakamura, Y., Ymaguchi, T., Takahashi, S., Hashimoto, S., Iwatani, K., Nakagawa, Y. Optical isomerization mechanism of R(-)-hydratopic acid derivatives. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 4:s-1 (1981).
- Neau, S.H., Shinwari, M.K., Hellmuth, E.W. Melting point phase diagrams of free base and hydrochloride salts of bevantolol, pindolol and propranolol. *Int. J. Pharm.*, 99, 303-310, (1993).
- Nishimura, K. (S)-form of alpha-methyl-N(alpha)-phthalimidoglutamide, butyrate form, enhanced phorbol ester-induced tumor necrosis factor-alpha production by human leukemia cell HL-

- 60:implication of optical resolution of thalidomide effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2, 455-460, (1994).
- Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K., Pitha, J.J. Differential effects of alpha, beta and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 186 (1-2), 17-22, (1989).
- Otagiri, M., Fujinaga, T., Sakai, A., Uekama, K. The effects of β - and γ -cyclodextrins on release of betamethasone from ointment bases. *Chem. Pharm. Bull.* 32 (6), 2401-5, (1984).
- Otero espinar, F.J., Anguiano Igea, S., Blanco Méndez, J., Vila Jato, J.L. Reduction in the ulcerogenicity of naproxen by complexation with β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* 70, 35-41, (1991).
- Otsuka M, Matsumoto T, Kaneniwa N. Effects of the mechanical energy of multi-tableting compression on the polymorphic transformations of chlorpropamide. *J. Pharm. Pharmacol.*, 41(10), 665-669, (1989).
- Otsuka, M., Onoe, M., Matsuda, Y. Physicochemical stability of phenobarbital polymorphs at various levels of humidity and temperature. *Pharm. Res.* 10(4), 577-82, (1993).
- Owens, P.K., Fell, A.K., Coleman, M.W., Berridge, J.C. Separation of the voriconazole by capillary electrophoresis and liquid chromatography. *Enantiomer*, 4 (2), 79-90, (1999).
- Peppas, N.A. Analysis of fickian and Nonfickian drug release from polymers. *Pharm. Acta Helv.* 60, 110-11, (1985).
- Pérez Marcos, B., Gutiérrez, C., Gómez-Amoza, J.L., Martínez-Pacheco, R., Souto, C., Concheiro, A. Usefulness of certain varieties of carbomer in the formulation of hydrophilic furosemide matrices. *Int. J. Pharm* 67, 113-117, (1991).
- Peterson, A.G., Foley, J.P. Influence of the organic counterion on the chiral micellar electrokinetic separation of basic drugs using the surfactant N-dodecoxycarbonylvaline. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 695, 131-145, (1997).
- Pham, A.T., Lee, P.I. Probing the mechanisms of drug release from hydroxypropylmethylcellulose matrices. *Pharm. Res.* 2, 1379-1384, (1994).
- Piel, G., Evrard, B., Fillet, M., Llabres, G., Delattre, L. Development of non-surfactant parenteral formulation of miconazole by the use of cyclodextrins. *Int. J. Pharm*, 169, 15-22, (1998).
- Piel, G., Evrard, B., Van Hees, T., Llabres, G., Delattre, L. Development of a parenteral and of an oral formulation of albendazole with cyclodextrins. *S.T.P. Pharma Sci.* 9 (8), 257-260, (1999).
- Pitha, J., Milecki, J., Fales, H., Pannel, L., Uekama, K. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, preparation and characterization, effect on solubility of drugs. *Int. J. Pharm.* 29, 73-83, (1986).
- Powell, J.R., Ambre, J.J., Ruo, T.I. The efficacy and toxicity of drug stereoisomers. In: Wainer, I.W., Drayer, D.E., editors. *Drug stereochemistry. Analytical methods and pharmacology.* New York, Marcel Dekker, 245-70, (1988).
- Pranker, R.J., elsaabee, M. Thermal analysis of chiral drug mixtures: The DSC behavior of mixtures of ephedrine HCl and pseudoephedrine HCl enantiomers. *Thermochim. Acta.*, 248, 147-160, (1995).
- Li, Z.J., Grant, D.J. W. Thermal analysis as a method for characterizing racemic species. *Pharm. Res.* 13(9) suppl, 340, (1996).

- Rajewski, R.A., Stella, V.J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins and derivatives. 2. In vivo drug delivery. *J. Pharm. Sci.* (85), 1142-1169, (1996).
- Richards, R., Tattersfield, A.E. Bronchial β -adrenoceptor blockade following eyedrops of timolol and its isomer L-714, 465 in normal subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 20, 459-62, (1985).
- Romero, A.J., Rhodes, C.T. Stereochemical aspects of the molecular pharmaceutics of ibuprofen. *J. Pharm. Pharmacol.*, 45(4), 258-62, (1993).
- Sampaio, E.P.J. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated humane monocytes. *Exp. Med.*, 173, 699-703, (1991).
- Savolainen, J., Jarvinen, K., Taipale, H., Jarho, P., Loftsson, T., Jarvinen, T. Co-administration of a water-soluble polymer increases the usefulness of cyclodextrin in solid oral dosage forms. *Pharm. Res.* 15, 1696-1701, (1998).
- Scott, W.J., Fradkin, R., Wilson, J.G. Non-confirmation of thalidomide-induced teratogenesis in rats and mice. *Teratology*, 16, 333-6, (1977).
- Siepmann J, Kranz H, Bodmeier R, Peppas NA. HPMC-matrices for controlled drug delivery: a new model combining diffusion, swelling, and dissolution mechanisms and predicting the release kinetics. *Pharm. Res* 16(11), 1748-1756, (1999).
- Sinibaldi, M., Vinci, M., Federici, F., Flieger, M. Enantioselectivity properties of serum albumin immobilized on anion-exchangers based on polyvinylimidazole coated silica. Effect of protein loading on separation properties. *Biomed. Chromatogr.* 11, 307-310, (1997).
- Soliman, E.O.A., Kimura, K., Hirayama, F., Uekama, K., El-Sabbagh, H.M. Amorphous spirinolactone hydroxypropylated cyclodextrin complexes with superior dissolution and bioavailability. *Int. J. Pharm.* 149, 73-83, (1997).
- Solinis Aspiazú, M.A. Liberación de los enantiómeros de Salbutamol y Ketoprofeno a partir de matrices elaboradas con excipientes quirales. Tesis Doctoral. Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad del País Vasco. (2000).
- Solinis, M.A., de la Cruz, Y., Hernández, R.M., Gascón, A.R., Calvo, B., Pedraz, J.L. Release of ketoprofen enantiomers from HPMC K100M matrices—diffusion studies. *Int. J. Pharm.* (in press).
- Solinis, M.A., Lugará, S., Calvo, B., Hernández, R.M., Gascón, A.R., Pedraz, J.L. Release of salbutamol sulfate enantiomers from HPMC matrices. *Int. J. Pharm.*, 161, 37-43, (1998).
- Srichana, T., Suedee, R. Evaluation of stereoselective dissolution of racemic salbutamol matrices prepared with commonly used excipients and $^1\text{H-NMR}$ study. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27(5), 457-464, (2001).
- Suedee, R., Srichana, T., Rattananont, T. Enantioselective release of controlled delivery granules based on molecularly imprinted polymers. *Drug Deliv.*, 9(1), 19-30, (2002).
- Swarbrick, J. Advances in controlled drug delivery. *S.T.P. Pharm. Pract.*, 6:53-60, (1996).
- Szejtli, J. Cyclodextrin Technology, topics in inclusion science. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (1988).

Szejtli, J., Frömmling, K.H. Cyclodextrin in Pharmacy, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (1994).

Szejtli, J. The metabolism, toxicity and biological effects of cyclodextrins. Cyclodextrins and their industrial uses. D.Ducheme. (Ed). Editions de Santé, Paris, (1987).

Szente, L. Hydroxypropyl β cyclodextrin, preparation and physicochemical properties. New trends in cyclodextrins and derivatives. Pharm. Techn. Int., 2 (6), 21-29, (1991).

Taleb, N.B., Millot, M.C., Sebillé, B. Electrokinetic separation of enantiomers using a capillary coated with poly-tergute. J. Chromatogr. A. 776, 45-53, (1997).

Tanino T, Ogiso T, Iwaki M. Effect of sugar-modified beta-cyclodextrins on dissolution and absorption characteristics of phenytoin. Biol. Pharm. Bull. Mar;22(3), 298-304, (1999).

Testa, B., Carrupt, P-A, Gal, J. The so-called "interconversion" of stereoisomeric drugs: an attempt at clarification. Chirality, 5, 105-11, (1993).

Theis DL, Lucisano LJ, Halstead GW. Use of stable isotopes for evaluation of drug delivery systems: comparison of ibuprofen release in vivo and in vitro from two biphasic release formulations utilizing different rate-controlling polymers. Pharm. Res. 11(8), 1069-1176, (1994).

Timwalla, A., Hoesterey, T., Xiam, T., Lim, K., Anderson, B. Solubilization of thiazobenzimidazole using a combination of pH adjustment and complexation with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin". Pharm. Res. 10, 1136-1143, (1993).

Tobert, J.A., Cirillo, V.J. Hitzenberger, G. et al. Enhancement of uricosuric properties of indacrinone by manipulation of the enantiomer ratio. Clin. Pharmacol. Ther. 29, 344-50, (1981).

Tomaszewski, J. Y Rumore, M.M., Stereoisomeric drugs: FDA's policy statement and the impact on drug development, Drug Dev. Ind. Pharm. 20, 119-139, 1994.

Triggle, D.J. On the other hand: the stereoselectivity of drug action at ion channels. Chirality, 6, 58-62, (1994).

Tucker, G.T., Lennard, M.S. Enantiomer specific pharmacokinetics. Pharmacol. Ther. 45, 309-29, (1990).

Uekama, K., Irie, T. Pharmaceutical applications of methylated cyclodextrin derivatives. Cyclodextrins and their industrial uses. D.Ducheme (Ed) Editions de Santé, Paris, (1987).

Uekama, K., Otagiri, M. Critical review in therapeutic carrier system. Cyclodextrins in drug carrier system. 1-40, (1987).

Uekama, M. Pharmaceutical applications of methylated cyclodextrins. Pharm. Int. 6, 61-65, (1985).

Uekama, K., Otagiri, M., Sakai, A., Irie, T., Matsuo, N., Matsuoka, Y.J. Improvements in the percutaneous absorption of beclomethasone dipropionate by γ -cyclodextrin complexation. Pharm. Pharmacol. 37(8), 532-5, (1985).

United States Pharmacopeia 24. The United States Pharmacopoeial convention. Inc; Rockville. M.D. (2000).

Upton, R.A., Buskin, J.N., Williams, R.L. et al. Negligible excretion of unchanged ketoprofen, naproxen and probenecid in urine. J. Pharm. Sci. 69:1254-1257, (1980).

Vázquez, M.J., Pérez-Marcos, B., Gómez-Amoza, J.L., Martínez-Pacheco, R., Souto, C., Concheiro, A. Influence of technological variables on release of drugs from hydrophilic matrices. *Drug Dev Ind. Pharm.* 18, 1355-1375, (1992).

Vila Jato, J.L., Delgado Charro, M.B. Matrices lipídicas como formas orales de liberación controlada. *Industria farmacéutica*, Sept-Oct. 85-95, (1992).

Vlasses, P.H., Irvin, J.D., Huber, P.D. et al. Pharmacology of the enantiomers and (-)-p-OH metabolite of indacrinona. *Clin. Pharmacol. Ther.* 29, 344-50, (1981).

Wade, A., Weller, P.J. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 123-125. Second Edition, American Pharmaceutical Association, Washington, (1994).

Wallach, O. Ueber gebromte Derivate der Carvonreihe. *Liebigs. Ann. Chem.* 286, 90-143, (1895).

Walle, T., Webb, J.G., Bagwell, E.E. et al. Stereoselective delivery and actions of beta receptor antagonists. *Biochem. Pharmacol.* 37, 115-24, (1988).

Wang, F., Khaledi, M.G. Capillary electrophoresis chiral separations of basic compounds using cationic cyclodextrins. *Electrophoresis*. 19, 2095-2100, (1998).

Wang, X., Wang, X.J., Ching, C.B. Solubility, metastable zone width, and racemic characterization of propranolol hydrochloride. *Chirality*, 14(4), 318-324, (2002).

White, P.F., Ham, J., Way, W.L. et al. Pharmacology of ketamine isomers in surgical patients. *Anaesthesiology*. 52, 231-9, (1980).

White, P.F., Schutter, J., Shafer, A. et al. Comparative pharmacology of the ketamine isomers. *Br. J. Anaesth.* 57, 197-203, (1985).

Yoshida, A., Yamamoto, M., Irie, T., Hirayama, F., Uekama, K. Some pharmaceutical properties of 3-hydroxypropyl and 2,3-hydroxypropyl- β -cyclodextrins and their solubilizing and stabilizing abilities. *Chem. Pharm. Bull.* 37, 1059-1063, (1989).