



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"ENCAPSULACION MOLECULAR CON CICLODEXTRINAS"

TRABAJO MONOGRAFICO
DE ACTUALIZACION

Que para obtener el Título de
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

p r e s e n t a:

Mercedes Leticia Ortiz García



MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
FALSA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

I. INTRODUCCION	1
II. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LAS CICLODEXTRINAS	4
2.1 Desarrollo Histórico de las Ciclodextrinas.	4
2.2 Estructura de las Ciclodextrinas.	5
2.2.1 Características de la Cavidad.	7
2.2.1.1 Métodos de Estudio de la Cavidad.	9
2.3 Propiedades de las Ciclodextrinas.	10
2.3.1 Estructura Cristalina.	10
2.3.2 Solubilidad.	14
2.3.3 Hidrólisis.	17
2.4 Derivados de Ciclodextrinas.	18
2.4.1 Derivados de Ciclodextrinas solubles en agua.	19
2.4.2 Otros derivados.	20
III PRODUCCION DE CICLODEXTRINAS	21
3.1 Enzima Ciclodextrin-Glicosiltransferasa (CGT)	21
3.1.1 Origen y Características.	21
3.1.2 Métodos para medir la actividad de la CGT de <i>B. macerans</i> .	23
3.1.3 Substratos para la producción de Ciclodextrinas a través de la CGT de <i>Bacillus macerans</i> .	25
3.1.4 Mecanismo de Acción de la Ciclodextrin-Glicosiltransferasa.	26
3.2 Microorganismos que contienen la CGT.	30
3.3 Purificación de la Ciclodextrin-Glicosiltransferasa (CGT).	35
3.4 Proceso de Producción de Ciclodextrinas.	35
3.4.1 Condiciones para la Producción de Ciclodextrinas.	35
3.4.2 Producción basada s/el uso de CGT de <i>Bacillus macerans</i> .	36
3.4.3 Producción de Ciclodextrinas p/ CGT de <i>B. alcalófilos</i> .	38
3.4.4 Producción Continua de Ciclodextrinas.	39
3.4.5 Optimizando la Producción de Ciclodextrinas.	40
3.4.6 Producción Enzimática de Ciclodextrinas.	41
3.4.7 Síntesis Químicas de Ciclodextrinas.	42

IV. METABOLISMO Y TOXICIDAD DE CICLODEXTRINAS	43
4.1 Estudios de Metabolismo.	43
4.2 Estudios de Toxicidad.	51
V. METODOS DE SEPARACION Y ANALISIS DE CICLODEXTRINAS	59
5.1 Métodos Cromatográficos.	59
5.2 Métodos Espectofotométricos.	72
VI. PROCESO DE ENCAPSULACION	74
6.1 Complejos de Inclusión en Solución Acuosa.	76
6.2 Complejos de Inclusión en Estado Sólido.	79
6.2.1 Método de Coprecipitación.	79
6.2.2 Método de Freeze-Drying.	80
6.2.3 Método de Amasijo.	80
6.2.4 Método de Co-pulverizado	81
6.2.5 Método de Calentamiento en Envase Sellado.	82
6.2.6 Método de Ultrasonido.	82
6.2.7 Preparación c/Compuestos Organometálicos.	82
6.3 Proceso de Inclusión de los Complejos.	83
6.4 Estructura de los Complejos de Inclusión.	85
6.5 Fuerzas manejadas en la formación del complejo.	87
6.6 Métodos de Estudio de Complejos de Inclusión.	88
6.6.1 Método de Solubilidad	88
6.6.2 Métodos de Estudio de Complejos en Soln. Acuosa.	93
6.6.2.1 Espectroscopia Ultravioleta (U.V.)	93
6.6.2.2 Dicroísmo Circular.	94
6.6.2.3 Resonancia Magnética Nuclear.	94
6.6.2.4 Microcalorimetría	94
6.6.2.5 Potenciometría.	95
6.6.2.6 Polarografía.	95

6.6.3	Métodos de Estudio de Complejos en Estado Sólido.	95
6.6.3.1	Espectros de Infra-Rojo.	95
6.6.3.2	Difracción de Rayos X.	95
6.6.3.3	Métodos de Análisis Térmico.	96
6.6.3.4	Sistema Térmico Analítico.	96
6.6.3.5	Cromatografía de Capa Fina.	96
6.7	Mecanismo General para disociar el complejo.	96
VII. APLICACIONES DE CICLODEXTRINAS		98
7.1	Ciclodextrinas en el Area Farmacéutica.	98
7.1.1	Solubilización de Fármacos.	101
7.1.2	Velocidad de Disolución y Biodisponibilidad.	106
7.1.3	Estabilidad de Fármacos.	115
7.1.3.1	Reducción de Volatilidad.	115
7.1.3.2	Resistencia al Calor.	116
7.1.3.3	Resistencia a la Oxidación.	116
7.1.3.4	Resistencia a la Hidrólisis y Degradación.	117
7.1.4	Enmascarador de Sabor.	122
7.1.5	Desintegrante.	122
7.1.6	Reducción de la Toxicidad.	125
7.1.7	Otros Usos.	127
7.2	Ciclodextrinas en el Area de Alimentos.	129
7.2.1	Estabilización de Color y Sabor.	130
7.2.2	Mejorando el Sabor y Olor.	131
7.2.3	Aditivos de Polvo Seco.	131
7.3	Uso de Ciclodextrinas en Cosmetología.	133
7.4	Ciclodextrinas en Agroquímica.	137
7.5	Diversos Usos de Ciclodextrinas en la Industria Química.	139
7.5.1	Biotecnología	139
7.5.2	Cromatografía y Purificación.	139
7.5.3	Separación de Isómeros.	140
VIII DISCUSION Y CONCLUSIONES		141
IX BIBLIOGRAFIA.		147

I INTRODUCCION

Las ciclodextrinas que fueron descubiertas hace cerca de un siglo durante los últimos 30 años han despertado un considerable interés para numerosas industrias, incluyendo aquellas relacionadas con el campo Farmacéutico [21,42,74, 144,176,190,218].

Incrementado número de revisiones y patentes publicadas en diferentes países, idiomas y medios son dedicados a la aplicación industrial de ciclodextrinas y cuando menos la mitad de ellos dirigido hacia aplicaciones farmacéuticas [8,13, 31-34,46,83,84,179,219,225,226,246]. Los muchos usos y amplia disponibilidad de ciclodextrinas aunado a consideraciones económicas juega un papel decisivo en este desarrollado interés [225].

Al iniciar este trabajo, mi propósito es evidenciar a través de la recopilación bibliográfica, en forma coherente y concreta que las ciclodextrinas (alfa, beta y gama) por su capacidad para formar complejos de inclusión con moléculas orgánicas e inorgánicas involucran una genuina Encapsulación Molecular (la cual implica el entrapamiento espacial de una molécula huésped en la cavidad de una molécula anfitrión sin que algún enlace covalente sea formado) y confieren propiedades ventajosas sobre las moléculas originales [219,224,246].

He considerado pertinente iniciar con un capítulo en que se describe una síntesis de su evolución histórica, así como la estructura y propiedades (físicas, químicas y fisicoquímicas) de las ciclodextrinas.

En el subsecuente capítulo se aborda la producción de las mismas a través de enzimas obtenidas de cultivos bacterianos, así como características de los mismos considerando además métodos de síntesis total, producción enzimática así como producción continua de ciclodextrinas.

En seguida se abordan los métodos de estudio referentes a el Metabolismo y Toxicidad de las ciclodextrinas, los cuales son de gran importancia para un apropiado uso de las mismas.

En el siguiente capítulo se enuncian y describen los procedimientos adoptados para el análisis y separación de las ciclodextrinas.

La formación de los complejos de inclusión de ciclodextrinas con diversas moléculas (tanto en medio sólido como en solución acuosa), así como los diferentes métodos de estudio para detectar la presencia de dichos complejos, están cubiertos en el capítulo VI.

Posteriormente se hace alusión a sus funciones de inclusión, las cuales han sido aplicadas efectivamente a fármacos, alimentos, cosméticos, agroquímicos y otros.

Pueden incluir:

- a) conversión de un material líquido dentro de un producto sólido.
- b) enmascarando un sabor u olor desagradable de un producto o compuesto.
- c) supresión de una incompatibilidad de compuestos sin complejar con otros fármacos o excipientes en una formulación.
- d) estabilización de un compuesto que pudo de otra manera ser sensible a temperatura, hidrólisis, autooxidación, fotodegradación, etc.

- e) Incrementando la solubilidad en medio acuoso y facilitando la emulsificación de un compuesto de baja solubilidad.
- f) aumentando la absorción "in vivo" y por consiguiente la biodisponibilidad de un fármaco de baja solubilidad.
- g) reacciones específicas (como catálisis) pueden ser hechas más selectivamente por la inclusión de grupos funcionales específicos.
- h) alterando la ruta de formación de productos isoméricos [83,190,218,246].

También se incluye una sección de discusión de resultados y conclusiones, así como también la bibliografía consultada para la realización de este trabajo.

Finalmente espero que el resultado de esta recopilación bibliográfica pueda servir como una guía de estudio para el conocimiento de esta nueva forma farmacéutica

II

Estructura y Propiedades de las Ciclodextrinas.

2.1. Desarrollo Histórico de las Ciclodextrinas.

El primer reporte en la literatura del aislamiento de una sustancia reconocida como ciclodextrina fue hecho por A. Villiers (1891), a partir de digeridos de *Bacillus amylobacter* sobre almidón de papa. Villiers obtuvo una pequeña cantidad (3g de 1000 g de almidón) de un material cristalino al cual llamo "celulosine" debido a su semejanza en algunos aspectos a la celulosa [21,42].

La descripción de su preparación, aislamiento así como diversas características fueron hechas por Schardinger en los años de 1903-1911 [32]. En 1904, él los caracterizó como oligosacáridos cíclicos. Es por esta razón que las ciclodextrinas son reconocidas por algunos autores como "dextrinas Schardinger" [190]. Aunque también son conocidas como "cicloamilosas", "cicloglucanas" ó "ciclomaltoligosacáridos" [8,21].

A partir de 1935 durante un período de 15 años al cual French llamó "Período de Maduración" [89], las mayores contribuciones acerca de la química de las ciclodextrinas fueron desarrolladas por Freudenberg y colaboradores, quienes establecieron que las ciclodextrinas están constituidas de unidades de D-glucosa unidas por puentes glucosídicos α -{1 \rightarrow 4} [42].

El nombre de ciclodextrinas que ahora es comúnmente usado, fué sugerido por Cramer [21]. Una descripción detallada de su desarrollo histórico es dada por Clarke y col. [8,21].

2.2 Estructura de las Ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos, cristalinos, homogéneos, no higroscópicos [224] de característica forma cilíndrica, constituidos por un número variable de unidades de D-glucosa unidas por puentes glucosídicos α -(1 \rightarrow 4). De acuerdo al número de dichas unidades son asignadas por la literatura griega como: alfa-(α) con seis, beta-(β) con siete y gama-(γ) con ocho [8].

Sundararajan y Rao [207] demostraron que ciclodextrinas con menos de seis unidades de glucosa, no es posible que existan debido a el impedimento estérico.

Homólogos superiores (de nueve o más unidades de glucosa), han sido identificados. Sin embargo tienen como inconveniente que su producción es extremadamente pequeña, son difíciles de purificar y sus habilidades para formar complejos de inclusión no son significativas [8].

La fórmula estructural de las ciclodextrinas es $(C_6H_{10}O_5)_n$ [144], y su estructura química se ilustra en la fig. 1.

La forma particular de la molécula requiere un arreglo especial de los diferentes grupos funcionales [8,31]. De tal forma que los grupos hidroxilos secundarios (de los átomos de C-2 y C-3 de las unidades de glucosa) se localizan en el extremo más ancho del anillo, mientras que los hidroxilos primarios (sobre el átomo de C-6 de la unidad de glucosa) están en el lado angosto, como se observa en la fig. 2. Esto ha hecho que el exterior de las ciclodextrinas sea decididamente hidrofílico [8,33,246].

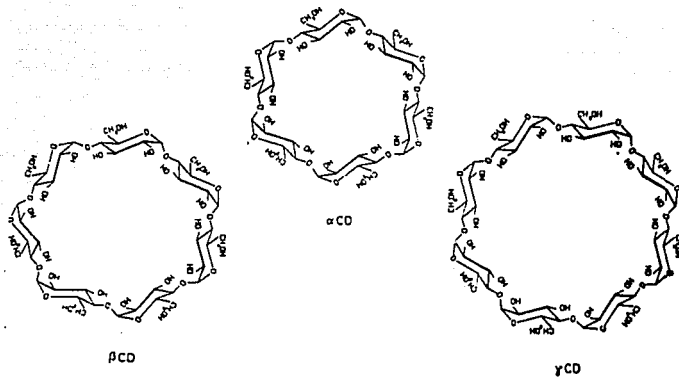


Fig. 1 Estructura de las ciclodextrinas.

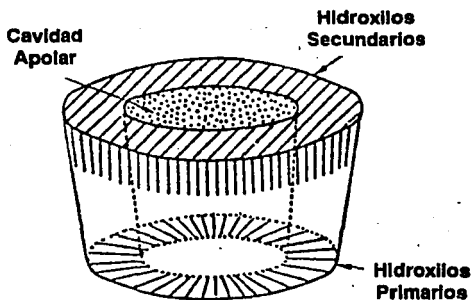


Fig.2. Esquema de la Estructura Funcional de Ciclodextrinas.

2.2.1. Características de la Cavidad.

En una representación plana de la molécula de ciclodextrinas, la cavidad está constituida por un anillo de grupos C(3)-H, un anillo de oxígenos glucosídicos y otro círculo de grupos C(5)-H [246], lo cual produce una elevada densidad electrónica por lo cual la cavidad actúa como una base de Lewis [34,89] y por ende es altamente apolar con respecto al agua [31].

La cavidad de las ciclodextrinas tienen una alta forma de cono, por lo cual los C-2 y C-3 están más abiertos que el C-6. Y los grupos C-H, que abarcan H-1, H-2 y H-6, están localizados sobre el exterior de la molécula [83].

La libre rotación de los hidroxilos primarios puede reducir el diámetro efectivo de la cavidad sobre el lado donde esto ocurre, mientras que los hidroxilos secundarios forman cadenas relativamente rígidas no pueden rotar [8].

La fig. 3. muestra las moléculas de α -, β - y γ -ciclodextrina conteniendo a la vez los grupos hidroxilos primarios y secundarios; vistos en un ángulo cercano a 45° relativos al plano del anillo [42,219].

Las dimensiones moleculares de α -, β - y γ -ciclodextrina se muestran en la fig.4 [179,219]. Por otra parte la Tabla I nos proporciona los valores de el volumen y dimensiones de la cavidad de las ciclodextrinas [32,179,224,246].

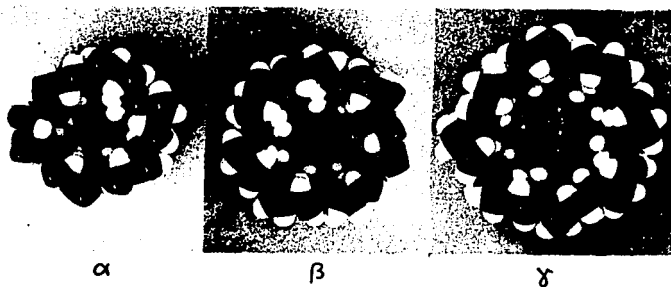


Fig.3. Moléculas de Ciclodextrinas vistas en un ángulo de 45°.

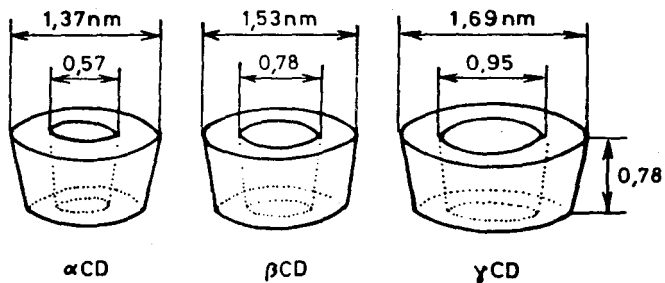


Fig.4. Dimensiones Moleculares de Ciclodextrinas.

Tabla I. Dimensiones de la Cavidad

	Alfa-CD	Beta-CD	Gama-CD
Profundidad (Å)	7.9-8.0	7.9 - 8.0	7.9 - 8.0
Diam.Interno(Å)	4.7-5.3	6.0 - 6.5	7.5 - 8.3
Diam.Externo(Å)	14.6+0.4	15.4 + 0.4	17.5 + 0.4
Volumen (Å)	174	262	472
ml p/mol de CD	104	157	256
mg p/1 g de CD	0.1	0.14	0.20

CD= ciclodextrina.

2.2.1.1 Métodos de estudio de la cavidad de ciclodextrinas.

El cálculo de la polaridad de la cavidad interna de ciclodextrinas es importante, ya que esto ayuda a predecir el tipo de compuestos que pueden ser incluidos en la molécula [69].

Street enuncia, que las cavidades de las ciclodextrinas tienen casi la misma polaridad que n-octanol para pireno, a través de datos de intensidad de fluorescencia [203].

En el caso específico de beta-ciclodextrina, Heredia y col. realizaron una correlación de las desviaciones espectrales mostradas por N-N-difenilamina en solventes específicos, encontrando que la polaridad de la cavidad interna de β -ciclodextrina es similar a etanol [69].

Por otra parte Rauch y Knoche informan que cuando ocurren cambios en la solvatación de la cavidad, efectos de relajación han sido observados en soluciones acuosas de α -, β - y γ -ciclodextrinas [185].

La cavidad de las ciclodextrinas sin embargo es una propiedad de el tamaño y forma de la molécula [21], la cual es estabilizada por puentes intramoleculares de hidrógeno entre el grupo C2-OH de una unidad de glucopiranososa y el grupo C3-OH de la unidad de glucopiranososa adyacente [207], lo cual vuelve a la molécula de ciclodextrina una estructura rígida [8] además de prevenir la hidratación con moléculas de agua [246].

La conformación de las ciclodextrinas en solución es casi idéntica a su conformación en el estado cristalino [224].

2.3 Propiedades de las Ciclodextrinas.

2.3.1. Estructura cristalina.

Una de las propiedades características de las ciclodextrinas, es que cristalizan bien en agua y en soluciones acuosas de alcoholes [42,74]. La fig. 5 ilustra la forma de los cristales de α -, β - y γ -ciclodextrina [224].



Fig.5 Cristales de Ciclodextrinas.

Las cavidades de ciclodextrinas cristalizadas en agua no están vacías, sino que son ocupadas por moléculas de agua [225], algunas de ellas están presentes como agua de coordinación y otras como agua estructural. Evans sugiere que esta última juega solo un papel sub-alterno, mientras que el agua de coordinación actúa principalmente sobre el arreglo de las moléculas de agua, lo cual determina la estructura cristalina [147].

La estructura del agua incluida en los hidratos cristalinos de ciclodextrinas ha sido investigada por Saenger y col. usando técnicas de rayos X mostraron que las moléculas de agua dentro de la cavidad están en un dinámico estado de desorden [189].

Rau y Knoch sugieren que la distribución de frecuencias de relajamiento, caracterizan el desorden de las moléculas de agua incluidas [185].

Por otra parte Harata hace referencia a la forma cristalina hidratada de γ -ciclodextrina conteniendo 13.3 moléculas de agua, en la cual el anillo está altamente distorsionado [59].

Sin embargo, las conocidas formas de hidratos estables para α -, β - y γ -ciclodextrinas contienen 6.0, 12.0 y 17.0 moléculas de agua respectivamente. Nakai y col. enuncian que la deshidratación de alfa-ciclodextrina es un proceso reversible rápido a 120° C, en el caso de β -ciclodextrina la forma hidratada es estable en un amplio rango de humedad relativa y cuando se presenta la deshidratación una baja cristalinidad es observada. Para γ -ciclodextrina consideraron que hay una forma intermedia (7 H₂O) durante la hidratación y deshidratación respectivamente [147].

Los hidratos cristalinos y formas anhidras amorfas de las tres ciclodextrinas pueden ser distinguidas bajo microscopio polarizado [85].

La técnica de difracción de rayos X es útil para investigar el proceso de transición entre las formas hidratadas y anhidras de las ciclodextrinas [147].

Los patrones de difracción de rayos X tanto para la forma anhidra como para hidratos cristalinos de ciclodextrinas se muestra en la fig. 6 [147,224].

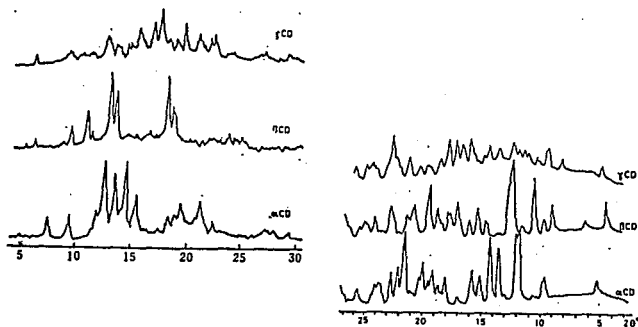


Fig.6 Patrones de Difracción de Rayos X de las Ciclodextrinas.

Cuando la forma de hidrato o anhidra de α - y β -ciclodextrinas son sometidos al efecto de molienda, a través de mallas vibracionales, pasan de su estado cristalino a un estado amorfo de acuerdo a lo manifestado por Nakai y col.; quienes también enuncian que la cristalinidad de dichas ciclodextrinas disminuyó casi un 8% por 3 min. del efecto de molienda [146].

Lin. y col. por su parte señalan que dicho efecto no solo causa cambios en el comportamiento molecular de las sustancias sujetas a ello, sino que también mejora la interacción molecular de las mismas. De tal forma que un descenso en la cristalinidad de las sustancias molidas causa un incremento en la solubilidad y por ende una mayor velocidad de disolución [118].

Las más importantes características físicoquímicas de las ciclodextrinas están puestas de manifiesto en la tabla. II.

Tabla II. Características de las Ciclodextrinas.

	Alfa	Beta	Gama
No. de unidades de glucosa.	6	7	8
Peso Molecular	972	1135	1297
Solubilidad (g/100ml) de agua a 25°	14.5	1.85	23.2
Rotación óptica (α) ^d en agua	150+0.5	162.5+0.5	177.4+0.5
Forma de los cristales	aguja	prisma	aguja
Punto de fusión	275 °C	280 °C	275 °C
No. de moléculas de agua en la cavidad	6	12	17
pKa a 25 °C por potenciometría	12,3312	12,202	12,081
% de contenido de agua.	10.2	13.2-14.5	16
t 1/2 para la apertura del anillo por hora ^a	6.2	5.4	3.0
Tensión superficial (mN/m) ^b	71	71	71

a: concentración de ciclodextrinas 0.1 M.

b: en HCl 1 N a 60°.

2.3.2 Solubilidad.

Como regla general la solubilidad de ciclodextrinas se incrementa con una elevación en la temperatura lo cual puede causar la deshidratación de moléculas de agua, siguiendo con una fácil recrystalización por enfriamiento [8,31,34,225,246]. La fig. 7 nos muestra una gráfica que corrobora lo anteriormente citado [144,154].

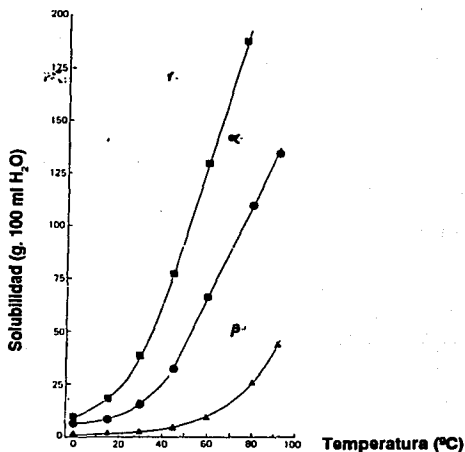


Fig.7 Solubilidad de Ciclodextrinas.

Lo más llamativo de la tabla II es la baja solubilidad de β-ciclodextrina en agua, la cual se atribuye a que la molécula tiene una alta densidad electrónica en el centro y muchos puentes de hidrógeno intramoleculares existen entre los grupos hidroxilos secundarios [8,176,219].

La solubilidad de las ciclodextrinas (α -, β - y γ -) como una función de la temperatura en agua es descrita por la ecuación:

$$2.303 \log_{10} m = (3.88 \pm 0.02) - (3583 \pm 18)/ T$$

donde m = fracción mol de la ciclodextrina anhidra y
 T = a la temperatura absoluta [257].

Cuando son comparadas a sacáridos acíclicos las bajas solubilidades de las ciclodextrinas, es una consecuencia de sus relativamente desfavorables entalpías de solución (ΔH°) parcialmente desplazado por entropías de solución más favorables. En el caso de β -ciclodextrina es menos soluble debido a una entalpía de solución (ΔH°) menos favorable (más positivo) y una entropía de solución (ΔS°) poco favorable (más negativo) [85].

Los parámetros termodinámicos de las ciclodextrinas son:

	ΔH° (kcal/mol)	ΔS° (u.e.)	ΔG° (kcal/mol)
alfa-CD	7.67	13.8	3.58
beta-CD	8.31	11.7	4.81
gama-CD	7.73	14.7	3.34

La solubilidad de la ciclodextrina frente a algunos solventes orgánicos se expone en la tabla III [144].

Tabla. III. Solubilidad en disolventes escogidos (%w/v) a 25°C.

agua/solv.	alfa-CD		beta-CD		gama-CD	
	50/50	0/100	50/50	0/100	50/50	0/100
Metanol	1.2	<0.1	0.3	<0.1	2.8	<0.1
Etanol	0.9	<0.1	1.3	<0.1	2.1	<0.1
Propanol	0.8	<0.1	1.1	<0.1	0.7	<0.1
Isopropanol	4.7	<0.1	2.5	<0.1	0.6	<0.1
Acetona	1.9	<0.1	0.3	<0.1	0.5	<0.1

El contenido de humedad en equilibrio de las ciclodextrinas (higroscopicidad) se pone de manifiesto en la fig. 8 [154].

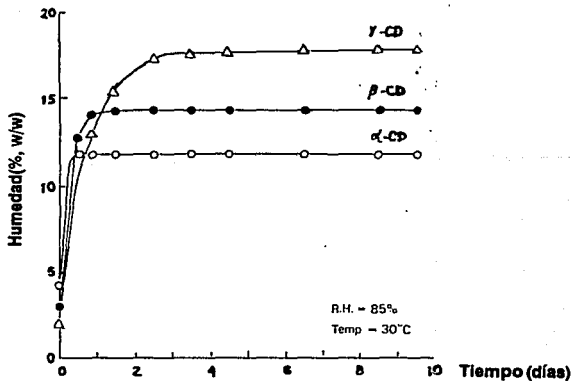


Fig.8 Higroscopicidad de las Ciclodextrinas.

2.3.3. Hidrólisis.

Como una consecuencia de el arreglo cíclico de las ciclodextrinas, no tienen un grupo final reducido ni tampoco un grupo final reductor. Por lo tanto no son descompuestos por álcalis acuosos calientes [74]. Su resistencia es similar a la celulosa en base alcalina.

Las ciclodextrinas son bastante estables en medio acuoso, sin embargo, son hidrolíticamente rotas por ácidos fuertes para dar oligosacáridos lineales (glucosa y maltosacáridos) dependiendo de el tamaño de la cavidad de la ciclodextrina [246].

Las ciclodextrinas son completamente resistentes a beta-amilasas puesto que ellas no pueden contener grupos finales susceptibles a el ataque de estas enzimas y son completamente resistentes a fermentaciones de levaduras [42]. Sin embargo, la alfa-amilasa es capaz de hidrolizar ciclodextrinas, aunque usualmente es a velocidades muy bajas [8,21,89].

Algunas enzimas microbianas también son capaces de hidrolizar las ciclodextrinas, como puede observarse en la tabla IV.

Tabla IV. **Enzimas que Hidrolizan Ciclodextrinas.**

alfa-ciclodextrina	Pseudomonas amyloclermosa α -amilasa Taka-amilasa A de Aspergillus oryzae. Ciclodextrin glicosil-transferasa de B. macerans.
beta-ciclodextrina	Pseudomonas amyloclermosa α -amilasa. Taka-amilasa A de Aspergillus oryzae. Bacillus subtilis licuefaccion tipo amilasa. Bacillus subtilis saccharifying α -amilasa.

Pseudomonas amylodermosa α -amilasa
 Taka-amilasa A de aspergillus oryzae.
 gama-ciclodextrina α -amilasa pancreática de cerdo.
 α -amilasa salivar.

Es conveniente señalar que los complejos de yodo-yoduro de las ciclodextrinas son semejantes con respecto a los complejos de almidón-yodo [42], así como también mencionar que las ciclodextrinas son espectrofotométricamente transparentes en la región del visible [133].

2.4 Derivados de las Ciclodextrinas.

En la síntesis de derivados de ciclodextrinas los grupos hidroxilo secundarios sobre C-2, C-3 y el grupo hidroxilo primario de C-6, han sido el blanco de atención de muchas sustituciones químicas, sin peligro de eliminar el "vacío central" de la molécula conduciendo al desarrollo y caracterización de derivados de interés farmacéutico [83,138].

Las ciclodextrinas son químicamente modificadas para muy diversos propósitos, por ejemplo, para disminuir la toxicidad en su uso parenteral ó para mejorar la baja solubilidad de β -ciclodextrina [8,246].

Afortunadamente el reemplazo de algún grupo funcional presenta un dramático incremento en la solubilidad; aún cuando el grupo reemplazante sea hidrofóbico [225,246].

Casi todos los derivados tienen la capacidad de la formación de complejos, sin embargo, la estabilidad del complejo es modificada con respecto a la ciclodextrina sin sustituir [179].

Un bajo grado de sustitución hace más extensivo el fenómeno de complejación, lo cual puede ser atribuido a el impedimento estérico en la cavidad de ciclodextrinas por los sustituyentes [138].

Modificaciones selectivas de α - y β -ciclodextrina para la obtención de derivados mediante un método indirecto y una sustitución directa muestran que este último es más eficiente para β -ciclodextrina que para α -ciclodextrina [11].

2.4.1 Derivados de Ciclodextrinas solubles en Agua.

a) Metil-ciclodextrinas: resultan de la metilación selectiva de grupos metilo sobre los hidroxilos de C-2, C-3 ó C-6 haciendo la conformación macrocíclica más flexible [8]. Su solubilidad en agua es mayor, sin embargo, desciende con un incremento en la temperatura; también son solubles en solventes orgánicos. A concentraciones relativamente altas induce cambios en la superficie celular [8,33,35].

b) Hidroxipropil-ciclodextrinas: no resultan de una sustitución selectiva, se obtienen como compuestos amorfos y han sido preparadas con el objeto de incrementar su solubilidad en agua tanto en su forma amorfa como cristalina [35]. Son altamente solubles en agua y no hay un descenso con un incremento en la temperatura, presentan una actividad hemolítica menor que la ciclodextrina original, dicha actividad disminuye aumentando el grado de sustitución. No son hidrolizadas por las amilasas del tracto gastrointestinal [36].

c) Hidroxi-etil-Ciclodextrinas: se obtienen por condensación de β -ciclodextrina en álcalis acuosos con cloruro de etileno. Son altamente solubles en agua

y tienen una baja actividad hemolítica, presentan una baja habilidad para formar complejos con fármacos lo cual puede atribuirse a su escasa capacidad para remover componentes de las biomembranas [35,36,225].

d) Ciclodextrinas ramificadas: todas las ciclodextrinas ramificadas son más solubles en agua que γ -ciclodextrina y han sido descritas como glucosil, maltosil y glucopiranosil. Son resistentes a la hidrólisis catalizada por α -amilasa y son menos hemolíticas que la ciclodextrina original [33,35].

2.4.2 Otros derivados.

- Etil-ciclodextrinas: la etilación de ciclodextrinas reduce su solubilidad en agua de acuerdo al grado de sustitución por lo cual han sido propuestos como agentes para disminuir la solubilidad de productos altamente solubles [33,36].

- Polímeros: son sustancias conteniendo al menos 2 ó más unidades de ciclodextrinas covalentemente unidas [8]. Un polímero soluble en agua consiste de 2 a 5 unidades de ciclodextrinas, mientras que aquellos con un peso molecular mayor de 10 000 en agua solo se hinchan y forman geles insolubles [35].

- Polímeros con alto peso molecular tienen excelentes propiedades desintegrantes y pueden ser usados como un excipiente en la compresión directa de tabletas [8].

III

PRODUCCION DE CICLODEXTRINAS

La producción de ciclodextrinas sobre una escala industrial ha sido objeto de diversas publicaciones al respecto [74,154]. Las ciclodextrinas se obtienen a través de una enzima tipo amilasa (ciclodextrin glicosiltransferasa (CGT)), procedente de cultivos bacterianos, la cual tiene la habilidad de degradar almidón para dar una mezcla de alfa, beta y gama-ciclodextrina [8,190].

Debido a la estructura helical de las moléculas de almidón, el producto inicial de el rompimiento por la acción de la enzima (CGT) lleva a una reacción intramolecular y productos cíclicos unidos en α -1,4 son formados [21].

3.1 Ciclodextrin Glicosiltransferasa (CGT).

3.1.1. Origen y Características

Las ciclodextrinas fueron producidas inicialmente por la acción de cultivos bacterianos sobre pastas de almidón, creando confusión con respecto a que si eran productos de degradación del almidón, productos de transformación o productos de metabolismo bacteriano [42]

Cuando Tilden y Hudson (1939) anunciaron el descubrimiento de una singular enzima en cultivos de *Bacillus macerans*, la cual tenía la habilidad de producir rápidamente ciclodextrinas a partir de almidón sin la producción de maltosa, glucosa, o algún otro azúcar reducido [234]; mucha controversia surgió en relación a si la enzima es una mezcla de dos (o mas) amilasas, en donde una

de ellas tiene actividad hidrolítica y la otra produce ciclodextrinas o bien si la actividad hidrolítica es una propiedad intrínseca de la enzima [42].

El descubrimiento de la ciclodextringlicosiltransferasa ha hecho posible estudiar el mecanismo de formación de las ciclodextrinas así como la relación entre su constitución y el almidón [21]. Con respecto a las características de la ciclodextringlicosiltransferasa de *Bacillus macerans* podemos señalar que los cristales de la misma tienen una forma de varilla (fig.9) [106] un peso molecular de 145000 g/mol, así como una temperatura y rango de pH óptimos de 50 °C y 5.0-5.7 respectivamente [9]. Kobayashi y col. afirman que la enzima de *Bacillus macerans* tiene actividad hidrolítica y por ende las ciclodextrinas no son productos del metabolismo sintético de los microorganismos [106,234].

La principal característica de la ciclodextringlicosiltransferasa es el no producir azúcares reducidos.



Fig.9 Microfotografía de CGT.

El método usual de laboratorio para obtener la CGT es un medio de papa cruda y carbonato de calcio sometido al auto-clave, enfriado e inoculado con unas pocas gotas de un cultivo de *Bacillus macerans*. El nuevo cultivo se deja desarrollar de 2 a 4 semanas, se filtra y el fluido del cultivo contiene la enzima (CGT); la cual puede ser almacenada como tal, liofilizada o concentrada por precipitación con acetona [89, 136].

3.1.2. Procedimientos para medir la Actividad de la enzima (CGT).

Para medir la actividad de la ciclodextrin glicosiltransferasa de *Bacillus macerans*, la cual se mide en unidades y se define como la cantidad de enzima que forma $1\mu\text{mol}$ (micromol) de ciclodextrina por minuto [21], han sido propuestos diversos métodos que se enuncian a continuación :

-Prueba de Microscopio: fue desarrollada por Tilden y Hudson, y consiste en hacer reaccionar una solución de yodo con unas gotas del fluido del cultivo. Una pequeña cantidad de dicha mezcla es vista al microscopio, en donde los complejos cristalinos de yodo con las ciclodextrinas se observan como una mezcla de prismas verdes y hexágonos azul oscuro característicos de alfa-ciclodextrina, junto con prismas café formados por beta-ciclodextrina. Dicha prueba se considera ser la mas útil directa y simple para medir la cantidad de la enzima [234].

Método Colorimétrico: fue publicado por Hale y Ramlius quienes con el conocimiento de que durante la acción de la enzima sobre almidón se presenta un substancial decremento en la viscosidad; llevan a cabo la lectura de una mezcla formada de un buffer de acetato de calcio-ácido cítrico, agua con la CGT y almidón, a la cual se adiciona una solución de yodo-yoduro de potasio y ácido

sulfúrico. Después de tres minutos se lee su luz de transmisión a 660 m μ . a intervalos de 5, 10 y 20 min.

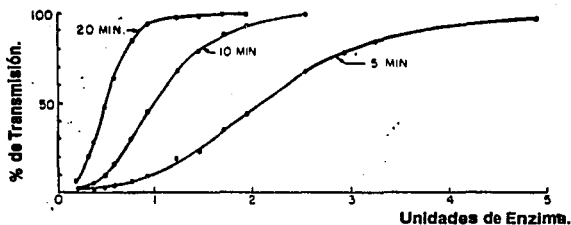


fig.10. % de transmisión vs. Enzima

Dicho método trataba de medir la actividad de la CGT en forma cuantitativa, basado sobre el descenso en la viscosidad del sustrato (almidón) durante la enzimólisis. Sin embargo carece de especificidad ya que otras amilasas también causan caída en la viscosidad.

En el método de Tricloroetileno la solución de la enzima es diluida sucesivamente para obtener diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:2ⁿ. Un mililitro de cada dilución de enzima se mezcla con solución de almidón soluble al 2% preparada en una solución buffer de Tris-HCl y después de 24 hrs. se adicionan 2.5 ml. de tricloroetileno y la suspensión resultante es conservada durante toda la noche a temperatura ambiente .

La actividad formadora de ciclodextrina es expresada por la dilución límite (1:2ⁿ) capaz de producir cantidades suficientes de complejos de ciclodextrina-tricloroetileno precipitantes [164].

La actividad de la enzima CGT puede ser medida por HPLC, método de glucoamilasa, espectrofotométrico o tricloro-etileno.

Park y Col [177] desarrollaron un simple y rápido método de selección por medio del cual la CGT puede ser detectada específicamente sobre un medio de agar conteniendo una mezcla de colorantes (fenoftaleína-anaranjado de metilo), el cual después de ser incubado durante 24 hrs. a 35 °C presentó la aparición de zonas claras de 1 a 2 cm. alrededor de las colonias de especies bacterianas. Cuando los diámetros de dichas zonas fueron comparadas con los resultados obtenidos a través de HPLC y precipitación con tricloroetileno una fuerte correlación fue observada, lo cual indica que el tamaño de la zona transparente es una buena medida para determinar específica y cuantitativamente la actividad de la CGT para bacterias productoras de β - y γ -ciclodextrinas.

3.1.3 Substratos para la producción de ciclodextrinas por la ciclo-dextringlicosiltransferasa de *Bacillus macerans*.

Se tiene conocimiento que diferentes substratos de almidón difieren en su comportamiento con la amilasa de *Bacillus macerans*, en cuanto a la producción total de ciclodextrinas así como a las proporciones relativas de α -, β - y γ -ciclodextrinas.

De tal forma que estudios comparativos de las fracciones de almidón dio mas altas producciones de ciclodextrinas que las obtenidas por la fracción de

amilopeptina; modificaciones al almidón o productos de degradación dieron producciones reducidas.

Por otra parte Cramer y Stenile emplearon una CGT de *Bacillus macerans* altamente purificada con amilosa y otros sustratos, encontrando que con amilosa muy diluida dió enteramente α -ciclodextrina al inicio de la acción y conforme procedía la enzimólisis β - y γ -ciclodextrina fueron producidas en cantidades progresivas, junto con pequeñas cantidades de oligosacáridos reducidos. [42]

En presencia de azúcares de bajo peso molecular en cantidades considerables, el almidón da cantidades fácilmente detectables de ciclodextrinas. [42]

Recientemente se ha reportado el uso de sustratos tales como cassava, tapioca etc. teniendo como único producto beta ciclodextrina [105,183].

Raja y col. enuncian que la producción de beta ciclodextrina a partir de cassava es aproximadamente 10% basado sobre el peso de almidón [183].

Se concluye que para producciones prácticas a gran escala de las ciclodextrinas, el mejor recurso es el almidón sin modificar [42].

3.1.4. Mecanismo de Acción de la Ciclodextringlicosiltransferasa.

Samec expresó sobre la acción de la CGT de *Bacillus macerans* que: "basándonos sobre observaciones podemos decir que las ciclodextrinas están formadas de productos de degradación de amilosa, cuyas moléculas no contienen

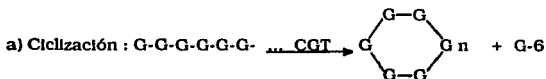
uniones anormales, se atribuye a *Bacillus macerans* y a su enzima una acción hidrolítica que permite cerrar el anillo*.

Más adelante Freudenberg expresó que la CGT puede separar una hélice de almidón (el cual tiene un arreglo en espiral) y unir los dos fragmentos finales para dar una molécula cíclica lo cual es reconocido como un caso de transglucosilación. [21]

Levine estudió la capacidad de la CGT de *Bacillus macerans* para efectuar el cierre del anillo con cadenas cortas de amilosa, encontrando que los puentes glucosídicos de las ciclodextrinas estuvieron formados solo a expensas de otros puentes de compuestos de cadena abiertas. Así como también que la CGT de *B. macerans* convertía α -ciclodextrina en β -ciclodextrina en presencia de un co-substrato (maltosa, sucrosa, etc.) [42]

En base a dichas observaciones se concluyó que la acción de la CGT de *B. macerans* es reversible además de compleja debido a que cataliza tres reacciones llamadas:

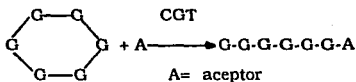
a) ciclización, b) acoplamiento y c) desproporción. [89,106,238]



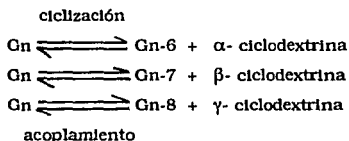
G=Glucosa

α, β, γ -CD (n=1,2,3)

b) Acoplamiento:

c) Desproporcionación: $\text{G}_m + \text{G}_n \xrightarrow{\text{CGT}} \text{G}_{m+x} + \text{G}_{n-x}$

La acción de la CGT de B. macerans [21] puede actuar de acuerdo a la siguiente ecuación:



La fig. 11 muestra la transferencia de un puente glucosídico por la CGT de B. macerans durante la formación reversible de ciclodextrinas, la reacción de transferencia es iniciada por el rompimiento de un puente glucosídico en una cadena de la CGT unida al sustrato [42]

Es conveniente señalar que las reacciones de acoplamiento fueron confirmadas por la separación de los productos acoplados y por numerosos experimentos cromatográficos. [21]

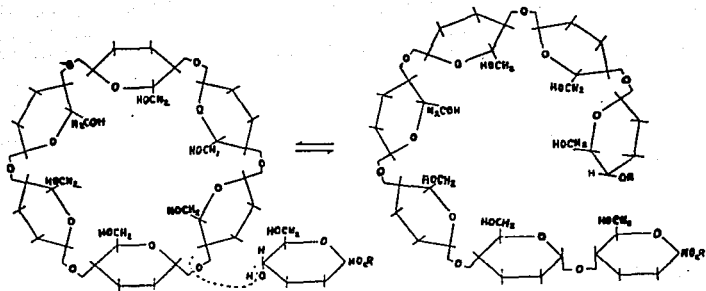


fig. 11 Acción reversible de la CGT de *B. macerans*, el grupo R puede ser alguno de una variedad de radicales azúcar o no azúcar.

Las reacciones de acoplamiento llevan a la formación de cadenas lineales que a su turno son convertidas a dextrinas cíclicas mas cadenas lineales de diferente longitud.

Es conveniente señalar que la formación de los productos a partir de la acción de la CGT de *B. macerans* termina cuando la enzima aparece al final de un sustrato de cadena recta o un punto ramificado.

Finalmente la adsorción de la enzima (CGT) de *Bacillus macerans* sobre intercambiador iónico débilmente básico, causa la inmovilización de dicha enzima, lo cual es útil en la producción continua de ciclodextrinas (remítirse a 3.4.4) [63,192].

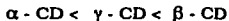
3.2. Microorganismos que contienen Ciclodextrín-glicosiltransferasa (CGT),

A fin de establecer un proceso de producción de las ciclodextrinas (α -, β - y γ -) altamente eficiente y seguro, se ha continuado en la búsqueda de una ciclodextrín glicosiltransferasa (CGT) que tenga ciertas características como son las siguientes: ser adecuada para uso industrial, altas producciones de ciclodextrinas y facilidad para obtenerla [61].

Es por ello que existen reportes de diversos microorganismos que tienen la capacidad de producir la CGT. Enseguida se hace referencia a las CGTasas que han sido examinadas con mas detalle.

Es importante recalcar que todas estas enzimas (CGT) presentan un mecanismo de acción semejante al descrito en el punto 3.1.3 para la CGT de *Bacillus macerans* [190].

La ciclodextrín-glicosiltransferasa producida por *Klebsella pneumoniae* M5 [9], tiene un peso molecular de 68000 g/mol y un pH óptimo de 5.2. Cuando altas concentraciones de la enzima son usadas las ciclodextrinas resultan ser sustratos para la CGT y su capacidad para atacar decrece en el orden:



Nakamura y Horihoshi encontraron que *Bacillus alcalófilo* ATCC 21783 da una CGT en un medio con un pH altamente alcalino, dicha enzima muestra un PM de 88 000g/mol [153], un punto Isoeléctrico de 5.4 así como dos valores de pH óptimo que son 4.5-5.0 y de 7.5-8.5 en los cuales catalizó la formación de

las ciclodextrinas en un 70% (pH 4.7) y 75% (pH 8.5) [151].

Así mismo Nomoto y col. reportan que otra especie de *Bacillus alcalófilos* No. HA3-3-2 produce cantidades suficientes de CGT con un PM de 68 000 g/mol [163], además de una máxima actividad formadora de ciclodextrinas en un pH de 6.5 y 8.0. [164].

Por otra parte *Bacillus circulans* en un medio fermentativo conteniendo 2% de almidón como fuente de carbono dio origen a una CGT con una temperatura óptima de 55 °C y dos pH óptimos de 5.5-6.1 y 9.0 [249].

Bacillus sp. IT 25 es una bacteria aislada del suelo, forma una CGT termoestable con un PM de 72 000 g/mol y un pto. Isoeléctrico de 4.3. La termoestabilidad de la enzima puede atribuirse a los residuos de cistina presentes en su composición de aminoácidos [6].

Se ha reportado también que una CGT termoestable con un PM de 85 000 g/mol se obtiene a partir de *Bacillus alcalófilos* sp. 1-5; su pH óptimo fue de 6-8 y la temp. óptima de 50°-60°C, generalmente da β -ciclodextrina a partir de almidón [105].

Kato y col. reportan una nueva enzima (CGT) aislada de *Bacillus subtilis* No. 313 con un PM de 64 000 g/mol y un pto. Isoeléctrico de 7.1. La enzima es más activa a un pH de 8.0 y una temperatura de 65 °C; su principal característica es la producción de γ -ciclodextrina sin la presencia de α - y β -ciclodextrina en los hidrolizados enzimáticos [75,97].

También hay informes de que *Bacillus stearthermophilus* da lugar a una CGT resistente al calor, con un pH óptimo de 5.0-5.5 y una temperatura óptima de 75-80°C [77].

A través de una patente Allenza y Morrell reportan una nueva enzima extracelular (CGT) con amplios rangos de temperatura y pH, lo cual la hacen adecuada en aplicaciones comerciales dando como producto predominante β -ciclodextrina [2].

De las enzimas obtenidas de *Bacillus alcalófilus*, existe una que ha sido objeto de diversos reportes, la CGT de *B. alcalófilus* No. 38-2, la cual se obtiene en un medio con alto pH alcalino y es termoestable [74]. La CGT cruda es activa a un amplio rango de pH además de que produce más de 40% de ciclodextrinas de 15% (w/v) de almidón licuado (fig. 12) [74,154].

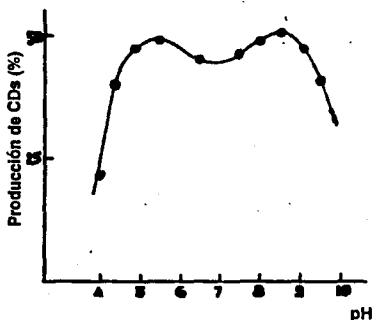


fig. 12. Efecto de pH sobre la formación de ciclodextrina.

Las ciclodextrinas fueron formadas en un rango de pH de 4.5 a 9.0 en rendimientos satisfactorios. La enzima es estable a temperaturas mayores de 70°C; estabilizada por la adición de calcio y producción preferentemente de beta-ciclodextrinas [154,190].

Yu, Aoki y Misawa publicaron que una nueva bacteria aislada de *Bacillus amiloliquefaciens* AL 35 produjo altos rendimientos de una CGT cuando se desarrollo en un cultivo sumergido. La estabilidad de la CGT a altas temperaturas y pH alcalino (70°C, pH 8-10) puede convertir sustratos de almidón a alfa-ciclodextrinas predominantemente [262].

Es oportuno citar que existen patentes de una nueva ciclodextrin-glicosiltransferasa de *Micrococcus* sp.[144].

Finalmente, en la tabla V se resumen las propiedades de diversos microorganismos que producen la enzima responsable de la producción de ciclodextrinas.

Tabla V. PROPIEDADES DE ENZIMAS CGT DE DIVERSOS MICROORGANISMOS

MICROORGANISMO	PESO MOLECULAR	pH OPTIMO	pH ESTABLE	TEMPE RATURA OPTIMA	TERMOES TABILIDAD		PUNTO ISO ELECTRICO	% CD ₉	REFEREN CIAS
					+Ca ²⁺	-Ca ²⁺			
.....
Bacillus macerans	145,000 g/mol	5-5.7	8.0-10.0	50°C	60	—	4.6	20-30	74,80,152
Klebsella pneumoniae	68,000 g/mol	5.2	6.0-7.5	—	—	45	—	50	89
Bacillus megaterium	66,000 g/mol	5-5.7	7.0-10.0	55°C	55	—	6.07-6.8	62	74,80,224
Bacillus stearthermophilus	—	5-5.5	5.5-8.8	70-75°C	65	70	—	62	77,80,224
Bacillus circulans	—	6-6.5	7.5-9.0	55°C	50	—	—	60	80,224,249
Bacillus coagulans	—	6.5	—	60°C	—	—	—	—	92
Bacillus subtilis 313	64,000g/mol	8.0	—	65°C	—	—	7.1	—	97
Bacillus ATCC 21873	88,000 g/mol	4.5-5.0 7.5-8.0	—	65°C	—	—	5.4	70	151,152
Bacillus HA 3-3-2	66,000 g/mol	6.5-8.0	6.0-11.0	55°C	—	—	—	—	103,104
Bacillus sp. IT 25	72,000 g/mol	—	6.0-9.5	65-70°C	—	—	4.3	—	6,7
Bacillus sp. 1-5	85,000 g/mol	6.0-8.0	—	50-60°C	—	—	—	—	105
Bacillus sp. 38-2	85-88,000 g/m	4.5-9	6-10.0	45-50°C	65	65	5.4	65	74,80,224
Bacillus amyloliquefaciens	—	—	8.0-10.0	70°C	—	—	—	95	7
Micrococcus varians M-849	—	6.0	—	50-60°C	—	—	—	—	224
.....

CD's: ciclodextrinas.

—=valor no reportado.

3.3. Purificación de la Enzima (CGT).

La enzima ha sido efectivamente purificada mediante adsorción de almidón, de acuerdo a lo reportado por Kobayashi y col. quienes también llevan a cabo una cromatografía en columna obteniendo una gran cantidad de enzima purificada [106].

Por otra parte, Nakamura y Horihoshi mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y ultracentrifugación purifican la ciclodextrin glicosiltransferasa [153].

3.4 Proceso de Producción de Ciclodextrinas.

La producción de ciclodextrinas a grosso modo puede ser dividida en las siguientes fases principales:

- cultivo de un microorganismo productor de la enzima ciclodextrin-glicosiltransferasa.
- separación de la enzima del medio, concentrarla y purificarla.
- conversión enzimática de almidón prehidrolizado para dar una mezcla de dextrinas lineares y cíclicas.
- separación de ciclodextrinas de la mezcla de conversión, su purificación y cristalización [224].

3.4.1. Condiciones para la preparación de ciclodextrinas.

La producción de ciclodextrinas a partir de almidón de papa por la acción de la ciclodextrin-glicosiltransferasa está más afectada por la concentración de almidón que por la cantidad de enzima, de tal forma que una baja concentración de almidón favorece altas producciones de ciclodextrinas [62].

De los factores que deben de tenerse en cuenta en un proceso industrial de ciclodextrinas, están la concentración de azúcares reducidos debido a que si hay un incremento en su concentración, se inhibe la formación de las mismas. Y la temperatura, la cual puede aumentar la formación de ciclodextrinas si después de la desnaturalización de la enzima se origina un ascenso de ésta [260].

Una máxima producción de ciclodextrinas depende del sustrato, así como también de la especificidad de la enzima y de ajustes en el tiempo de reacción; puesto que el tiempo de incubación óptimo para lograr una alta producción de cierta ciclodextrina no puede ser igual al tiempo requerido para la obtención de ciclodextrinas totales (α -, β -, γ -CD) [82]. Debido a que muchas enzimas (CGT) inicialmente forman alfa-ciclodextrina, mientras que la formación de ciclodextrinas superiores (β - y γ -) es más lenta [224].

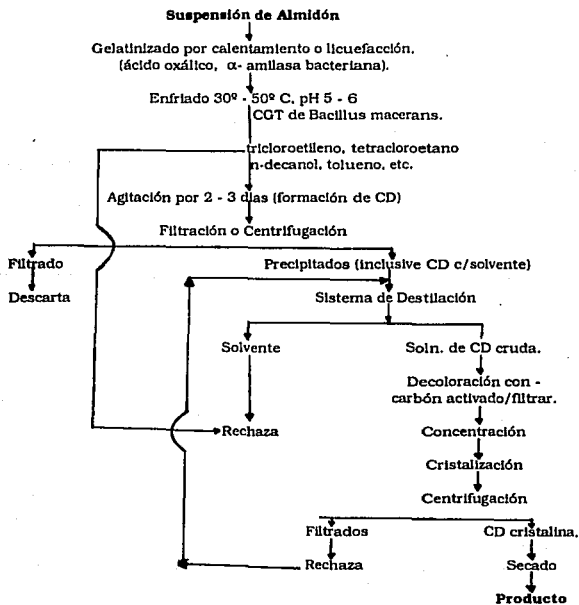
Como resultado de un reciente estudio cinético sobre la producción de ciclodextrinas, se reveló que la glucosa no solo ejerce un efecto inhibitorio similar a los azúcares reducidos, sino que se combina con la enzima (CGT) para destruir la ciclodextrina producida. De tal forma que el uso de almidón es preferido debido a una menor producción de glucosa durante la reacción. [24]

3.4.2 Producción basada sobre el uso de CGT de *B. macerans*.

La principal característica en la producción de ciclodextrinas por el uso de CGT de *Bacillus macerans* es la necesidad de emplear algún precipitante orgánico para mejorar la producción, debido a las características de la enzima con respecto a pH y temperatura. [89]

Un proceso de producción convencional para β -ciclodextrina, se muestra en el figura 13, en el caso de α -ciclodextrina dicho método se realiza en ausencia del precipitante al igual que para γ -ciclodextrina la diferencia es que la enzimólisis necesita ser más extensa y precipitar con acetona [42, 154].

fig. 13 Proceso de Producción Convencional para β -ciclodextrina.



Mediante este esquema se obtiene una mezcla de ciclodextrinas (α -, β - y γ -) junto con una serie de dextrinas lineares las cuales se convierten rápidamente a glucosa por el uso de glucoamilasa.

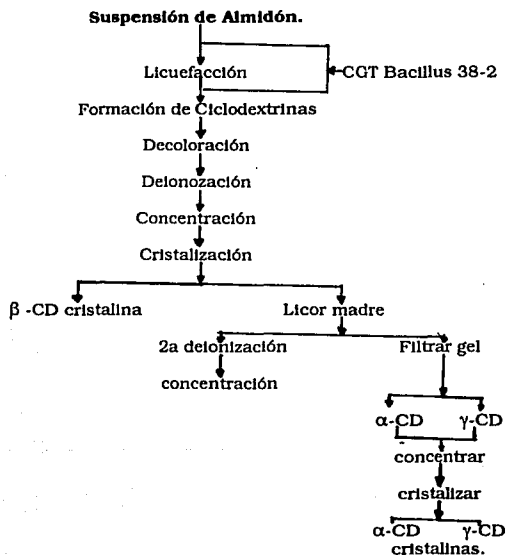
Bajo condiciones técnicas bien establecidas, una alta producción y bajos costos pueden ser logrados para la conversión enzimática controlada.

3.4.3. Producción de Ciclodextrinas por CGT de B. alcalófilos.

La preparación de ciclodextrinas a escala industrial por el uso de la CGT de *Bacillus macerans* fué intentado en el pasado por Corporación de Productos de Maíz Int. y una compañía en Japón, pero ellos tuvieron muchos problemas en la producción, ya que la CGT de *B. macerans* no es muy conveniente para uso industrial debido a la dificultad de producirla, así como el no ser termoestable. [154]

Por otra parte el uso de disolventes (tolueno, tricloroetileno, etc) para precipitar ciclodextrinas presentan el inconveniente de ser caro además de prohibitivo para su empleo en alimentos.

La enzima de *Bacillus 38-2* forma muy altas cantidades de ciclodextrina a partir de almidón, el cual por ser un material crudo barato tiene ventajas económicas para minimizar el volumen de reacción y como consecuencia facilitar la concentración del hidrolizado. La principal característica de CGT de *Bacillus 38-2* es la ausencia de disolventes orgánicos (a diferencia de la CGT de *Bacillus macerans*) para la formación de ciclodextrinas obtenidas por este método, como puede apreciarse en la fig. 14 [154].

fig.14 Producción de CD's α /CGT de *Bacillus alcalófilus* sp.

CD: ciclodextrina.

3.4.4 Producción Continua de Ciclodextrinas.

Hashimoto y col. reportan un proceso de producción continua de ciclodextrinas empleando ultrafiltración con un sistema de membrana equipado con nodulos. Así, una mezcla de ciclodextrinas producidas por la acción de CGT

de *B. macerans* es introducida al reactor para separar las ciclodextrinas, teniendo que la producción total de ciclodextrinas fué de 65.5% [65].

Otro método de producción continua en columna hace uso de una CGT inmovilizada sobre una resina de Intercambio Iónico débilmente básica o fuertemente ácida. Examinando la relación de la velocidad de formación de ciclodextrinas a la cantidad de enzima inmovilizada y la velocidad de flujo; se encontro que la formación de ciclodextrinas puede ser controlada al grado de incrementar o disminuir el valor de la velocidad de flujo. Si la cantidad de CGT inmovilizada es mayor, la producción de ciclodextrinas decrece. Este proceso requiere de aproximadamente 21 días para inmovilizar la enzima [63].

La producción continua de ciclodextrinas también puede lograrse por el empleo de enzimas glucoamilasa y α -amilasa específicas inmovilizadas y combinadas con CGT inmovilizada de acuerdo a lo reportado por Su y Young [204], obteniendo que un 70% de producción puede ser lograda a partir de almidón al 1%.

3.4.5 Optimizando la Producción de Ciclodextrinas.

La producción de ciclodextrinas es mejorada por la adición de compuestos alifáticos alcalino (1-8 carbonos), ésteres, éteres y cetonas (de 2-4 carbonos) [237]. La incorporación de solutos orgánicos, así como la adición de C1-6 alcalinos, aumento la producción de β -ciclodextrina de 18.6 a 35.8 % en peso [188].

También puede ser promovida por el uso de más de dos especies de CGTasas obtenidas de diferentes microorganismos, en este caso el % de ciclodextrinas fué de 30.8% contra 25 ó 23.8% usando solo una enzima [8].

Hay reportes de que almidón o derivados de almidón tratados con la CGT de B. macerans en la presencia de ácido butírico o sus sales da origen a una mayor producción de alfa-ciclodextrina principalmente [61].

La adición de lauril sulfato de sodio (STS) incremento la producción de ciclodextrinas de un 51 a un 60%, sin modificar el modelo de reacción de la enzima CGT [27,89].

Si la conversión enzimática de almidón es llevada a cabo en la presencia de un terpenolde tetra o pentacíclico se presenta un aumento en la producción de β -ciclodextrina principalmente con un 99% de pureza de acuerdo a lo informado por Sato y col.[195].

3.4.6 Síntesis Enzimáticas de Ciclodextrinas.

Síntesis enzimáticas de ciclodextrinas se han dado por el uso de una enzima ciclodextrin-glicosiltransferasa Inmovilizada que convierte 3-glucopiranosil fluoruro en altas producciones de α -CD, β -CD y oligómeros de maltosa [233].

De tal forma que una cantidad determinada del sustrato (α -glucopiranosil fluoruro) y enzima Inmovilizada son incubados durante 20 min. a 45°C en un buffer de acetato de sodio a un pH de 6.0. Las producciones fueron 30% de α -CD, 38% de β -CD y 32% de maltoologosacáridos.

Recientemente, Lee y Kim llevan a cabo la producción enzimática de ciclodextrinas a partir de almidón de maíz sin licuar en un biorreactor de fricción, en el cual ocurren simultáneamente bajo condiciones optimizadas la hidrólisis

de almidón y síntesis de ciclodextrinas. Ellos hicieron uso de *Bacillus* sp BE101 para obtener una enzima CGT la cual dio respectivamente las siguientes proporciones para α -, β - y γ -ciclodextrinas 1.7 : 6.6 : 1.7 [116]. Dicho método presenta las ventajas de no producir azúcares reducidos a partir de almidón sin licuar en el biorreactor, además de que las ciclodextrinas pueden ser producidas aún a altas concentraciones de almidón.

3.4.7 Síntesis Química de Ciclodextrinas.

Ogawa y Takahashi logran una síntesis total controlada de α -ciclodextrina mediante el uso de 3-glucosil-fluoruro con un paso intermedio para la ciclización intramolecular y una producción de 0.3% [166].

Asimismo Takahashi y Ogawa describen recientemente la primera síntesis total de γ -ciclodextrina en 21 pasos a partir de maltosa con una producción total de 0.02% [227].

Finalmente Takahashi y Ogawa recientemente reportan una síntesis total de ciclodextrinas por el uso de fluoruros malto-oligosil protegidos para la síntesis sucesiva de α -, β - y γ -ciclodextrinas [228].

IV

METABOLISMO Y TOXICIDAD

Estudios de Metabolismo y Toxicidad detallados son necesarios para aquellos compuestos que se pretende utilizar en industrias farmacéuticas y alimenticia como es al caso de ciclodextrinas [179], las cuales no son hidrolizadas por enzimas del tipo "exo", que atacan grupos terminales, pero están sometidas a la descomposición por amilasas del tipo "endo", (éstas causan hidrólisis casual) [89, 144].

4.1 Estudios de Metabolismo.

Von Hoesslin y Pringshelm (1923) fueron de los primeros en publicar sobre el metabolismo de ciclodextrinas. Ellos reportaron que glucógeno no pudo ser detectado en los hígados de conejo y cuyos ó cobayos, tres horas después de ser alimentados con ciclodextrinas [4].

Por otra parte, French (1957) reportó que un grupo de ratas alimentadas con β -ciclodextrina purificada murieron una semana después de estar sometidos a dicha dieta [42].

Sin embargo, estos experimentos estuvieron limitados en cuanto el número de animales o el tiempo de duración de las pruebas, para producir datos significativos concernientes a el empleo de las ciclodextrinas en animales [4].

Los estudios comparativos reportados hasta ahora fueron emprendidos para clarificar el metabolismo de las ciclodextrinas y han sido evaluados empleando sustratos radioactivos.

Andersen y col. (1963) alimentaron ratas de la especie Wistar tanto con almidón como con ciclodextrinas marcadas con carbono 14 (^{14}C) y midieron la radioactividad del dióxido de carbono ($^{14}\text{CO}_2$) exhalado como una función del tiempo [4].

Con un margen de 17 a 23 horas después de la administración oral, la radioactividad exhalada fue de 58 a 62% con α -ciclodextrina, 49 a 69% con β -ciclodextrina y de 59 a 64% en el caso de almidón.

El dióxido de carbono ($^{14}\text{CO}_2$) total exhalado fue aproximadamente el mismo para los tres compuestos, pero existieron diferencias significativas en la distribución de esta cantidad como una función del tiempo.

Con almidón, el máximo de dióxido de carbono radioactivo ($^{14}\text{CO}_2$) exhalado, se presentó una hora después de la administración; mientras que con β -ciclodextrina dicho máximo fue alcanzado entre 8 y 9 horas después de la administración como se muestra en la fig. 15.

Los resultados muestran que las ciclodextrinas son metabolizadas de manera similar al almidón, pero a velocidades lentas. Sin embargo, después de 24 horas la cantidad metabolizada total es casi igual [4].

Por otra parte Szejtli y col. alimentaron ratas con glucosa y β -ciclodextrina uniformemente marcadas con ^{14}C y midieron los niveles de radioactividad en sangre [217].

En el caso de glucosa cerca del 20% de la radioactividad administrada, afín a 10 ml de sangre fue encontrada y se manifestó en los 10 minutos siguientes a su administración oral.

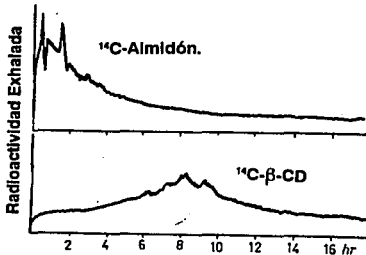


Fig. 15 Radioactividad exhalada siguiendo la administración de almidón y β -ciclodextrina marcados con ^{14}C por ratas.

En el caso de β -ciclodextrina un máximo de 5% de la actividad administrada puede ser encontrada en sangre entre la 4a y la 10a hora siguientes a la administración (fig. 16).

Sobre la administración de ciclodextrinas marcadas, la meseta en el nivel radioactivo de sangre es cercano sólo a 1/4 parte del que pudo ser obtenido con glucosa.

Después de 96 horas la misma radioactividad residual fue encontrada en sangre, tanto en glucosa como en β -ciclodextrina. Debido a esto se pudo obtener la conclusión de que también las ciclodextrinas son metabolizadas en forma de glucosa [217].

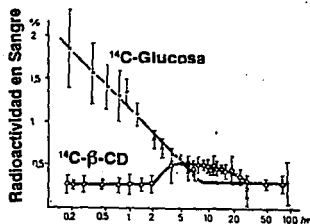


Fig. 16 Radioactividad en sangre siguiendo la administración de glucosa y β -ciclodextrina marcadas.

Otros resultados obtenidos del uso de oxígeno por el homogeneizado intestinal de rata, empleando aparatos de Warburg, revelaron que el sustrato que se metaboliza más rápidamente es la glucosa mientras que con maltosa y almidón es menor y en el caso de β -ciclodextrina, ésta es completamente resistente (fig. 17) [179,219]

Con respecto a la absorción de ciclodextrinas intactas, los experimentos llevan a la hipótesis de que ésta no puede tener lugar en el estómago o intestino, lo cual frecuentemente se observa en ensayos "in vitro", empleando sacos intestinales de rata [217,219].

Se estableció que en caso de utilizar sustratos radioactivos, la fuente de dicha radioactividad puede surgir de los metabolitos de glucosa presumiblemente formados a partir de las ciclodextrinas por la acción en parte de las propias amilasas intestinales de la rata y en parte por amilasas producidas por la flora bacterial del colon [44,219,246].

Sin embargo, existen discrepancias concernientes a la absorción intestinal de ciclodextrinas ya que recientes estudios fueron realizados por Szabó y col. (1983) quienes demostraron que fueron lentamente absorbidas por difusión pasiva a través de las membranas intestinales [210].

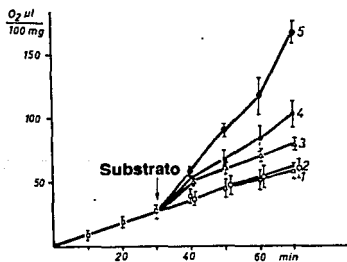


Fig. 17 Consumo de O₂ (1: control, 2: β-ciclodextrina, 3: almidón, 4: maltosa y 5: glucosa).

Por otra parte Irie y col. (1988) encontraron que las ciclodextrinas son significativamente absorbidas en los intestinos de rata en la presencia de bilis, usando una técnica de perfusión "in situ" para α-ciclodextrina [78].

En dicha técnica se mide el tiempo de desaparición de α -ciclodextrina a una concentración determinada en intestino de rata, cuando el conducto biliar está ligado e intacto; en el primer caso se observó que la absorción de α -ciclodextrina fue insignificante y fue significativamente absorbida en la presencia de bilis (fig. 18).

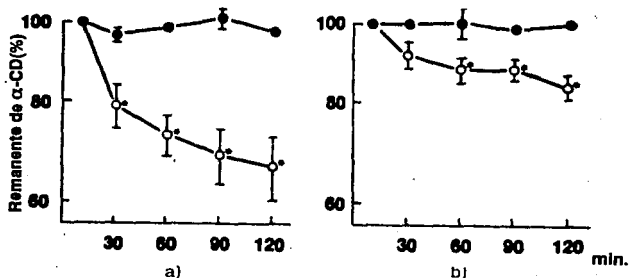


Fig. 18. a) (●) c/ligadura y (o) s/ligadura α -CD=0.1mM
b) (●) c/ligadura y (o) s/ligadura α -CD= 10mM.

La absorción de α -ciclodextrina bajo las condiciones del conducto biliar ligado, fue promovida por la presencia de una sal biliar (colato de sodio) así como también por etilendiaminotetracetato disódico (EDTA 2 Na); y sus efectos fueron totalmente inhibidos por la adición de cloruro de calcio (tabla VI)

Los resultados indican que la α -ciclodextrina puede ser absorbida en el intestino de rata en la presencia de promotores endógenos de la absorción

como son las sales biliares; y que ésta se ve afectada por cambios en la concentración de iones (Ca^{2+}) [78].

Tabla VI. Efecto de algunos aditivos sobre la absorción de α -ciclodextrina en intestino de rata con ligadura del conducto biliar.

Aditivos	% absorbido en 110 min.	
	0.1 mM de α -CD	10 mM de α -CD.
Ninguno	3.12 ± 1.70	0.89 ± 2.45
0.1 mM Colato de Na.	19.28 ± 3.43	15.55 ± 6.34
0.1 mM EDTA 2 Na.	24.31 ± 3.57	16.57 ± 5.08
0.1 mM Colato de Na con CaCl_2 (0.1 M)	0.07 ± 2.95	

Nakanishi y col. a través de datos obtenidos de un estudio en lumen del intestino delgado de rata con el complejo de fármaco- β -ciclodextrina, aseveran que las sales biliares actúan como un agente competitivo en el tracto gastrointestinal con lo cual se observa un realce en la biodisponibilidad. De tal forma que la interacción del complejo de β -ciclodextrina con sales biliares en el lumen intestinal juega un papel importante en la absorción de fármacos [78,157].

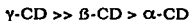
Se ha visto que α - y β -ciclodextrina pueden ser absorbidas, pero solo escasamente en el intestino delgado [44].

Nakanishi y col. al investigar el efecto de ciclodextrinas sobre la absorción de un fármaco no-absorbible en intestino delgado y recto de rata empleando una

técnica de perfusión in-situ, encontraron que la β -ciclodextrina mejoró la absorción del fármaco después de un pretratamiento con adyuvantes como son deoxycolato de sodio y lauril sulfato de sodio [158].

Ahora bien, se sabe que las amilasas pancreáticas microbianas de alguna especie alojadas naturalmente en la boca y salivales son asimismo capaces de hidrolizar las ciclodextrinas, en donde se observa una gran tendencia al ataque de uniones glucosídicas internas, así como la extensión en el tamaño de la cavidad de las ciclodextrinas [246].

La velocidad de hidrólisis por dichas amilasas [46, 126] es en el orden que se muestra a continuación:



En un estudio hecho por Marshall y col. (1981) se encontró que γ -ciclodextrina es hidrolizada a velocidades apreciables por α -amilasas de saliva humana y páncreas, a un pH óptimo para ambas de 5.0 (fig.19)[126].

La distribución de maltodextrinas producidas por la acción de α -amilasa pancreática sobre γ -ciclodextrina fue dependiente de la concentración de sustrato, mientras que para α -amilasa salival fué independiente.

Las ciclodextrinas son metabolizadas por glucanotransferasa de *Klebsella pneumoniae*, ciclodextrinas de Taka diastasa y por amilasas de *Aspergillus niger* y *oryzae* así como de *Bacillus polymyxa* [126, 144].

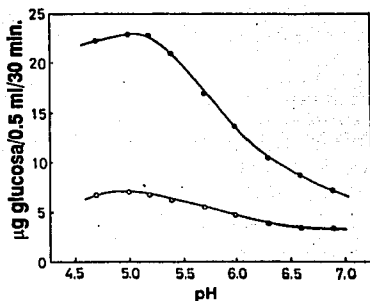


Fig. 19 Efecto de pH sobre la actividad de α -amilasas salivar (o) y pancreática (●).

4.2 Estudios de Toxicidad.

Los primeros reportes sobre la toxicidad de ciclodextrinas reflejaron la escasa pureza de las preparaciones originales, que probablemente estuvieron contaminadas con disolventes orgánicos [219].

En todos los estudios posteriores en los cuales las preparaciones usadas fueron puras, los efectos de toxicidad de las ciclodextrinas fueron muy bajos.

De acuerdo a reportes de la FAO: Nutrition Meeting Report, Series NO. 46 A WHO/FOOD AD/ 70.36, en el caso de almidones modificados - esto incluye a las ciclodextrinas-no son necesarias pruebas toxicológicas [83, 176].

Todos los estudios de toxicidad han mostrado que las ciclodextrinas administradas oralmente son inofensivas [190].

Thoma y col. al igual que French y col.[74], emplearon ratas albinas de la clase Sprone-Dawely con un rango en peso de 150 a 200 grs. para determinar la toxicidad aguda de β -ciclodextrina siendo sus resultados los siguientes:

Dosis letal 1/2 (LD_{50})
 \pm Desviación Standar (g/Kg).

Oral	18.1 \pm 1.0
Subcutánea	3.7 \pm 0.2
Intraperitoneal	0.7 \pm 0.1

Estudios semejantes fueron realizados por Nifune [190] sobre ratas y ratones para establecer un valor de LD_{50} con β -ciclodextrina.

	Valor de LD_{50} (g / Kg).	
	Ratón (σ y φ)	Rata (σ y φ).
Oral	> 12.5	> 12.0
Subcutánea	> 0.9	> 1.5
Intraperitoneal	> 0.9	> 1.2

Szjetli publicó los subsecuentes resultados para β -ciclodextrina [176].

Toxicidad Intravenosa	LD_{50} 0.788 g/Kg (ratas).
Toxicidad Intraperitoneal	LD_{50} 0.438 g/Kg (ratas).
Toxicidad Subcutánea	LD_{50} 0.535 g/Kg (ratas).
Toxicidad Per os	LD_{50} 12.5 g/Kg (ratones)
	LD_{50} 12.0 g/Kg (ratas).
	LD_{50} 5.0 g/Kg (perros).

Matsuda y col. [129] llevaron a cabo pruebas para determinar la toxicidad aguda (LD50) de ciclodextrinas sobre ratas y ratones; obteniendo valores muy altos en varias vías de administración [129,246], como puede verse en la tabla VII.

Tabla VII. Resultados de Prueba de Toxicidad Aguda de Ciclodextrinas (LD50)

Vía de Administración		α -Ciclodextrina		β -Ciclodextrina		γ -Ciclodextrina	
		Rata	Ratón	Rata	Ratón	Rata	Ratón
Oral	Hembra	>10,000 mg/kg.	8,032.4 mg/kg.	>10,000 mg/kg.	>10,000 mg/kg.	>8,000 mg/kg.	>16,000 mg/kg.
	Macho	>10,000 mg/Kg	9,235.1 mg/Kg	>10,000 mg/Kg	>10,000 mg/Kg	>8,000 mg/Kg	>16,000 mg/Kg
Intravenosa	Hembra	842 mg/Kg	921.2 mg/Kg	453.3 mg/Kg	215.8 mg/Kg	>2,400 mg/Kg	>4,000 mg/Kg
	Macho	1470 mg/Kg	1,014.8 mg/Kg	499.5 mg/Kg	279.4 mg/Kg	>2,400 mg/Kg	>4,000 mg/Kg
Subcutánea	Hembra	—	—	—	—	>2,400 mg/Kg	>4,000 mg/Kg
	Macho	—	—	—	—	>2,400 mg/Kg	>4,000 mg/Kg

— Valor no reportado

El efecto de α - y β -ciclodextrina en la dieta de animales por largos períodos de tiempo fue evaluada, indicando que ratas alimentadas durante tres meses con una dieta conteniendo 1% de α - y β -ciclodextrina mostraron curvas de crecimiento y eficiencia en la alimentación igual a la dieta control no conteniendo ciclodextrinas [4].

Se ha reportado que β -ciclodextrina dada a ratas en dosis de 0.1, 0.4 y 1.6 g/Kg diariamente durante seis meses no tuvo efectos adversos sobre el peso del cuerpo y los componentes en sangre y orina [125].

Susuki al estudiar el efecto de ciclodextrinas sobre el peso de cuerpo y órganos de ratas, reemplazo almidón pregelatinizado en la dieta por un jarabe conteniendo 30% de α -, 15% de β -, 5% de γ -ciclodextrinas y 50% de almidón hidrolizado. Concluyó que no hubo efectos significativos sobre el desarrollo de órganos y tejidos en ratas con la diaria administración de ciclodextrinas [89].

Gergely y col. realizaron un estudio de toxicidad crónica de β -ciclodextrina durante 6 meses, reportando que efectos tóxicos no fueron observados así como los siguientes valores de LD_{50} [53].

β -ciclodextrina	ratas	ratones
oral	>5000 mg/Kg	> 3000
subcutánea	>1000	~ 415
intraperitoneal	~ 365	~ 350

Durante 6 meses fue estudiada la toxicidad oral crónica de β -ciclodextrina en forma cristalina o como una mezcla (38% de β -CD, 28% de α -CD y el resto de almidón parcialmente descompuesto) con dosis diarias cercanas a 1.6 g/Kg de peso en ratas [125], y cerca de 0.6 g/Kg de peso en perro [216].

Efectos tóxicos no fueron observados con respecto al incremento en peso, consumo de comida o valores bioquímicos de significado clínico.

Investigaciones patológicas e histopatológicas siguiendo los 6 meses de tratamiento no revelaron algún signo de toxicidad en los órganos digestivos, sistema nervioso central, sistema cardiovascular o en algún otro órgano probado; β -ciclodextrina fue además carente de efectos embriotóxicos y teratogénicos [83,179,219].

Pruebas cromosomales llevadas a cabo en ratas tratadas durante 6 meses no pudieron revelar incremento en la incidencia de aberración espontánea y/o mutación de gene [83].

Ciclodextrinas administradas subcutáneamente, intraperitoneal o intravenosamente en altas dosis (> 300mg/Kg) puede inducir daño renal en rata [41].

La aplicación parenteral de α -ciclodextrina tuvo como consecuencia daño renal a dosis altas, pero a bajas dosis múltiples (100mg/Kg inyectadas diariamente por cerca de 7 días), se encontró que es segura al no presentar efectos nocivos [179].

La administración parenteral de β -ciclodextrina produce una serie de cambios en la apariencia vacuolar de los túbulos próximos del riñón, las cuales están asociadas con degeneración mitocondrial y nefrosis [41].

Ciclodextrinas intactas pueden ser acumuladas en el riñón y debido a que no son hidrolizadas fácilmente, eventualmente sobrecargan el sistema a el punto de toxicidad renal [246].

Frijlink y col. observaron un incremento en las cantidades de colesterol en ratas inyectadas con β -ciclodextrina. Cuando son administradas intravenosamente las ciclodextrinas forman complejos con colesterol en el torrente sanguíneo. Los relativamente pequeños complejos de colesterol-ciclodextrina después de abandonar el torrente sanguíneo mediante la vía capilar de poros y disociación del complejo en el compartimiento extravascular finalmente causa redistribución del colesterol desde sangre hacia tejidos [43].

Es por ello que los efectos observados de ciclodextrinas sobre niveles de colesterol en plasma puede consecuentemente ser descrito como un fenómeno de redistribución, en el cual las ciclodextrinas actúan como un acarreador de colesterol [43].

Se considera que las ciclodextrinas son más eficientes acarreadores de fármacos hacia membranas que las proteínas, por lo que la concentración en tejidos puede incrementarse generalmente. Es por ello que el impacto de la complejación de ciclodextrinas con ciertos fármacos consecuentemente puede depender tanto de su relativa afinidad hacia proteínas de plasma así como su afinidad de tejido [44].

También se sabe que ciclodextrinas a concentraciones suficientemente altas, causan hemólisis y cambios en la forma de eritrocitos humanos en el orden de: β -> α -> γ -ciclodextrina en solución isotónica (fig.20) [8].

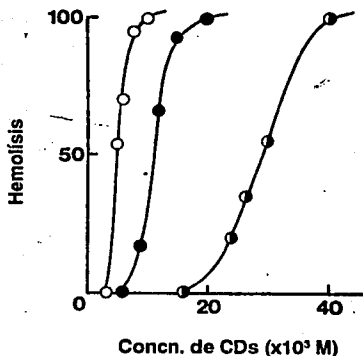


Fig.20 Efectos Hemolíticos de Ciclodextrinas sobre eritrocitos humanos (0.25%) en un buffer de fosfato isotónico a pH 7.4 y 37°C. ●, α-CD, ○, β-CD y ◐, γ-CD.

La hemólisis inducida por ciclodextrinas es probablemente un resultado secundario, del rompimiento de la membrana de los eritrocitos. (Posible alteración de la estructura mesofásica de la membrana del eritrocito (absorción poros rompimiento)) [246].

Ohtani y col.[169] informaron que las ciclodextrinas tienen diferentes efectos sobre los eritrocitos humanos de tal forma que:

- a) en la inducción de cambio de forma de discito a esfercito la potencia observada fué de $\alpha > \gamma$; pero con β -ciclodextrina la hemólisis ocurrió antes de que el cambio fuera completo.

b) en el aumento en la intensidad de fluorescencia de un colorante en membranas con ciclodextrinas pretratadas, la potencia observada fue:

$$\beta >> \gamma > \alpha .$$

c) en la liberación de potasio y hemoglobina, la potencia fue:

$$\beta > \alpha > \gamma .$$

La potencia de ciclodextrinas para solubilizar varios componentes de eritrocitos fueron:

d) para fosfolípidos $\alpha > \beta > \gamma$ -ciclodextrina.

e) para proteínas $\beta >> \gamma > \alpha$.

Por lo tanto desde un punto de vista seguro, de acuerdo a los estudios expuestos con anterioridad se puede concluir que las ciclodextrinas son toxicológicamente inofensivas si se administran en forma oral [190] Y en caso de adoptar otra vía, debe tenerse un mayor cuidado y control en la cantidad dosificada.

Si la vía es cualquier otra que no sea la oral, el fármaco para formar el complejo de inclusión deberá ser potente, cuya actividad farmacológica sea manifiesta a una muy baja concentración, como son las prostaglandinas y la nitroglicerina por ejemplo [83].

V

SEPARACION Y ANALISIS DE CICLODEXTRINAS.

En vista de que las ciclodextrinas son cada vez más empleadas para mejorar la calidad, estabilidad y propiedades funcionales de productos farmacéuticos, alimenticios, agrícolas, etc., métodos de separación y análisis con una metodología actual son necesarios.

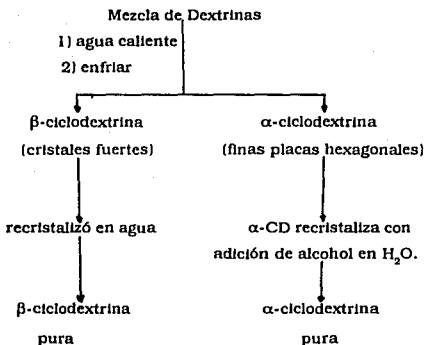
Es por ello que en este capítulo se hace referencia a los procedimientos más frecuentemente empleados.

5.1 Métodos Cromatográficos.

Schardinger reportó el primer método de separación de ciclodextrinas, el cual dependió de la baja solubilidad y fácil cristalización de β -ciclodextrina en agua; así como el tratamiento de las aguas madres con alcohol para obtener β -ciclodextrina (ver esquema 1) [42].

Por otra parte, Freudenberg y Jacobi desarrollaron un método para obtener α - y β -ciclodextrinas puras, y en el proceso también aislaron otra dextrina cristalina, a la cual ellos llamaron gama-dextrina. [21]

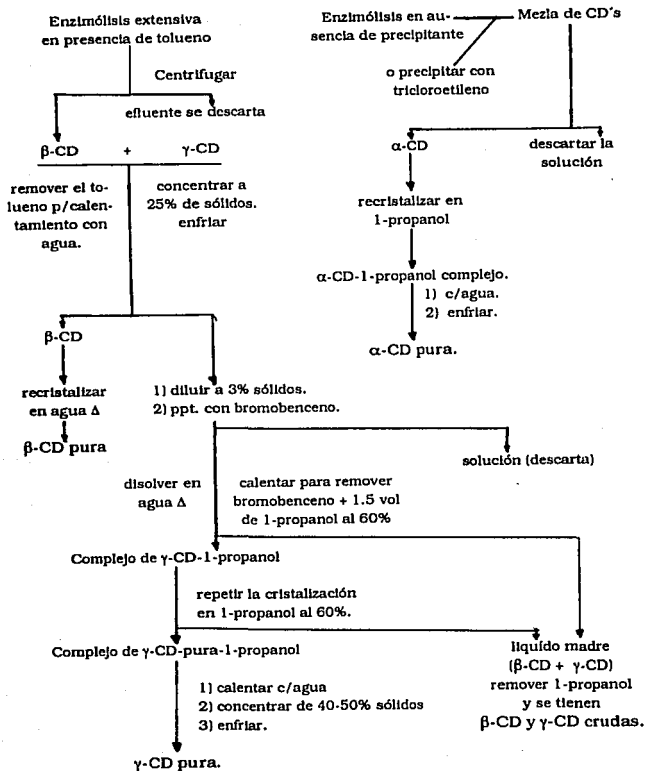
Esquema 1. Separación de Schardinger.



Ahora bien Freudenberg, Levine, Pazur y Norberg, llevaron a cabo la separación sin acetilación de las ciclodextrinas (aminorando la complejidad de procesos anteriores) basando ésto en que la enzimólisis puede ser ajustada dependiendo del tipo de ciclodextrina deseada.

De tal forma que si la enzimólisis se realiza en la presencia de un precipitante (vgr: tolueno o tricloroetanol) se obtiene α-ciclodextrina. En el caso de γ-ciclodextrina, dicha enzimólisis necesita ser más extensiva y en ausencia del precipitante (Esquema 2) [42].

Esquema 2. Fraccionación de Ciclodextrinas hecha por Freudenberg.



CD=ciclodextrina, Δ=caliente

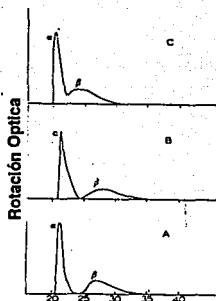
Puley y French desarrollaron un método de fraccionación para la separación de homólogos superiores de ciclodextrinas después de la digestión extensiva de β -amilasa hasta maltooligosacáridos [89].

Las ciclodextrinas han sido también separadas por medio de columnas de celulosa, dando buenos resultados. Sin embargo, no siempre se encontraron condiciones de separación adecuadas a pesar de las debidas medidas de protección.

Posteriormente se encontró que resultados reproducibles para α - y β -ciclodextrina pueden ser obtenidos usando un gradiente de elución con 1-butanol (1-BuOH) sobre una columna empacada con carbón vegetal, (el cual es liberado previamente de pequeñas partículas) la cual puede ser usada varias veces si es regenerada después de cada separación con agua hasta quedar libre del 1-BuOH [115].

Experimentos iniciales con carbón sin estar libre de partículas no fueron reproducibles cuando se efectuaron con la misma columna (regenerada); ya que gradualmente la separación fué peor y la velocidad de flujo se incrementó (como puede apreciarse en la fig.21), lo cual se atribuye a que las pequeñas partículas son conducidas a lo largo de la fase móvil.

Si carbón exento de partículas es usado la velocidad de flujo es casi constante y eluciones reproducibles se pueden lograr. La fig.22 muestra una marcada separación de glucosa, maltosa, α -ciclodextrina y β -ciclodextrina [115].



C=columna usada 20 veces, con
velocidad de flujo de 47ml/h

B=columna usada once veces,
la velocidad de flujo de 42ml/h.

A=columna fresca con una
velocidad de flujo de 40ml/h

Fig. 21 Separación de α - y β -ciclodextrinas.

Una correcta regeneración de la columna es importante ya que si I-BuOH está aún presente la completa absorción de ciclodextrinas no puede realizarse. Dicho método se empleó como un criterio de pureza para α - y β -ciclodextrina con respecto a ellas mismas, así mismo para determinar la composición de mezclas de ciclodextrinas.

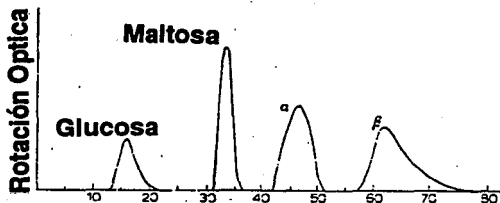


Fig.22 Separación de Glucosa, Maltosa y α - y β -ciclodextrina con una velocidad de flujo de 132ml/h.

Por otra parte, Zsardon y col. aislaron α -, β - y γ -ciclodextrina sobre columnas conteniendo un gel de dextran denominada Molselect como fase estacionaria y empleando agua para la elución.[265]

La secuencia fué idéntica a la solubilidad por lo que gama-ciclodextrina estuvo seguida de α - y de β -ciclodextrina. En contraste a γ -CD, la retención de α - y β -CD., dependió significativamente de la temperatura.

Así mismo, Szilassi y col. efectuaron una cromatografía en un gel dextran Sephadex G15-G25 para una mezcla de ciclodextrinas obteniendo tres picos diferentes. También realizaron cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) sobre columnas de M Bondapak-carbohidrato (M= sílica con un grupo funcional amino) a 25°C con una mezcla de disolventes de acetonitrilo:agua, separando rápidamente muestras conteniendo α -, β - y γ -ciclodextrina, además de glucosa y maltosa.[227]

De igual forma, Kitahata y col. separaron y determinaron ciclodextrinas mediante HPLC con las condiciones anteriormente citadas. En este caso se reportó que el límite de detección fué de 5mg con un error de 10%. [104]

Zsardon y col.[266] publicaron un método de HPLC tanto para la separación como análisis de α -, β - y γ -ciclodextrinas, en el cual también emplean una columna empacada de manera similar a las anteriores; la muestra problema conteniendo α -, β - y γ -CD (cada 10mg/ml) y glucosa como un estándar interno (5mg/ml) en agua destilada. Mezcla de acetonitrilo: agua (25-35% vol. agua) fueron usados para la elución. Qian y col. determinaron las ciclodextrinas(70:30) con el uso de glucosa como estándar interno y el empleo de MeCN:H₂O(70:30)[182].

La fig.23 muestra un cromatograma de alta resolución y rápida separación de ciclodextrinas y glucosa. Los cromatogramas pueden ser evaluados cuantitativamente en base a el área de los picos [266].

La selectividad puede ser alterada (incrementada o reducida) cambiando la composición del eluyente acetonitrilo-agua.

La aplicación de HPLC facilita el análisis de cerca de 10 muestras por día y son útiles para la cuantificación de ciclodextrinas.

No obstante Hokse manifestó que el método de HPLC referido antes de ahora, no puede ser muy adecuado para el análisis directo de ciclodextrinas procedentes de la conversión enzimática de almidón, ya que la baja solubilidad del mismo en el eluyente (acetonitrilo:agua) puede causar problemas durante el corrimiento de la cromatografía [72].

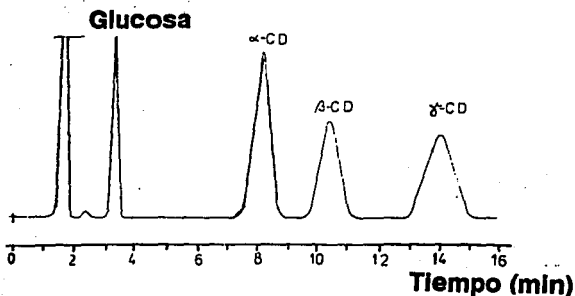


Fig.23 Cromatografía de la Separación de CD's y Glucosa mediante HPLC.

Hokse realizó la separación y análisis de ciclodextrinas sobre columnas empacadas con resinas de Intercambio catiónico (Aminex 50w-X4 (Ca²⁺)) a elevadas temperaturas con agua como eluente, encontrando que α -, β - y γ -ciclodextrina estuvieron más tiempo retenidos en la columna que sus análogos lineares como puede apreciarse en la fig.24 [72].

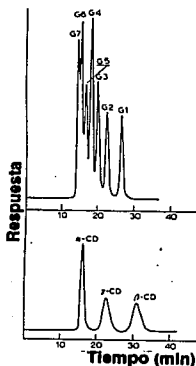


Fig.24 Separación Cromatográfica de Gluco-oligosacáridos lineares y ciclodextrinas.

Aquí se reconoce claramente que las interacciones de las ciclodextrinas con la resina de intercambio catiónico es diferente a los gluco-oligosacáridos lineares, lo cual se atribuye a la formación de complejos entre los iones calcio de la resina y los grupos hidroxilo de las moléculas de glucosa que constituyen a las ciclodextrinas.

El sistema cromatográfico descrito proporciona un método para el análisis de ciclodextrinas en la presencia de muchos otros gluco-oligosacáridos y puede ser usado cuantitativamente, por la relación entre el pico del área y la concentración de ciclodextrinas (fig.25) [72].

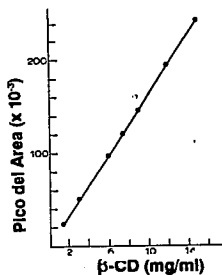


Fig 25. Relación del pico del área vs concentración de β -CD.

Sin embargo, con el conocimiento de que agua pura a elevadas temperaturas es altamente corrosivo en su uso como fase móvil en resinas de intercambio catiónico y frecuentemente modifica la eficiencia de la columna por contaminación con trazas de metales provenientes de parte del equipo de HPLC.

Brunt realizó una separación de ciclodextrinas sobre dichas resinas empleando una solución diluida (50 p.p.m) de etilendiamonitetracetato de calcio (CaEDTA) como fase móvil para eliminar la interferencia de metales.[17]

La adición de una pequeña cantidad de CaEDTA es ventajosa por que reduce el tiempo de separación de una mezcla de ciclodextrinas de 36 min.

(cuando se recurre a agua como fase móvil, de acuerdo a lo citado por Hokse) a 23min.(fig.26).

Así como la desaparición de trazas de metales pesados, que tienden a formar óxidos insolubles ocasionando una pérdida en la separación; además de que el CaEDTA y las trazas de iones calcio libres en la fase móvil continuamente regenera la resina, manteniendo la columna en óptimas condiciones logrando con ello una mejoría en la forma del pico de la muestra y un alto incremento en la sensibilidad del sistema [17].

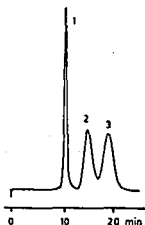


Fig.26 Cromatograma de una mezcla de CD's eluidas con CaEDTA, Picos: 1= α -CD, 2= γ -CD y 3= β -CD

Hashimoto y col. reportan una separación cromatográfica de α -ciclodextrina y glucosa, empleando resina de intercambio catiónico fuertemente ácida en la forma sódica (Amberlite HFS-471X) comprimida con divinilbenceno; encontraron que es adecuado para la separación de los solutos sobre una escala preparativa [66].

Ciclodextrinas fueron sucesivamente separadas y purificadas empleando una resina similar a la anteriormente descrita pero en forma de Bario (Ba^{2+}) de acuerdo a lo reportado por Fujita y col. [49].

Entre los procedimientos de separación reportados, la cromatografía sobre geles de poliácridamida han sido aplicados para ciclodextrinas.

Kainuma y col. [88] obtuvieron una clara desunión de ciclodextrinas mediante una columna empacada con Bio-Gel P-2 (gel de poliácridamida) fig. 27. Junto con un gran pico debido a la glucosa formada por la acción de la glucosamilasa.

La separación de sustancias sobre columnas de Bio-Gel se considera que está basada sobre el Principio de Exclusión, en donde solo pequeñas moléculas pueden difundirse dentro del gel [88].

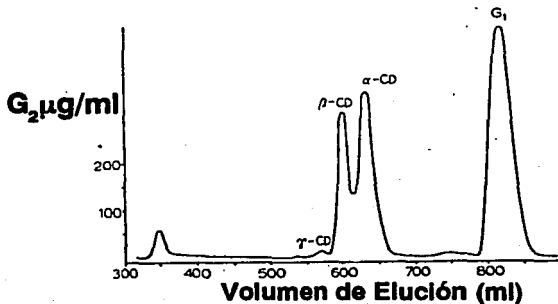


Fig.27 Perfil de la Elución de CD's y Glucosa.

Khanolbar y Hosagandi optimizaron un método sobre gel de poliacrilamida, permitiendo una estimación semi-cuantitativa de las ciclodextrinas individuales en los hidrolizados de almidón; además de comparar el efecto de inclusión de huéspedes sobre la movilidad de las ciclodextrinas [103].

Por otra parte Mattson y col.[134] describen un procedimiento específico para la cuantificación de ciclodextrinas individuales, basado en un mecanismo de afinidad cromatográfica empleando un gel previamente benzoilado (Bio-Gel P-6); dicho gel puede ser utilizado para el análisis de ciclodextrinas sin una preparación especial de la muestra.

Un sistema de afinidad bio-específica de ciclodextrinas involucrando ácido naftoixacético unido a Bio-Gel P-6 aminado o a celulosa es descrito por Mäkelä y col.[122] La separación completa de ciclodextrinas fué lograda sobre Bio-Gel P-6 naftil derivado, el cual fué óptimo para la máxima absorción de ciclodextrinas, a diferencia de la celulosa debido a su microcristalinidad.

Por otra parte un estudio sobre adsorbentes específicos en la separación y purificación de ciclodextrinas mostró que cada una de ellas puede ser separada más o menos específicamente sobre ciertos soportes sintetizados de tal forma que:

- a) α -ciclodextrina fué adsorbida específicamente sobre soportes derivatizados con funciones alquilo,
- b) β -ciclodextrina sobre soportes con funciones fenil o fenil substituídas y sobre funciones naftil unidas através de la posición 2 y
- c) γ -ciclodextrina fué específicamente adsorbida sobre un gel derivado de un compuesto naftil [124]

A pesar de ello, el uso de geles no es muy adecuado para su aplicación a escala industrial debido a que son relativamente costosos.

Hashimoto y col. reportan la fraccionación de ciclodextrinas obtenidas de digeridos de almidón, a través de la ultrafiltración de membrana encontrando que la recuperación de ciclodextrina fué de 93.3% [64]

La penetración a través de fibras huecas hechas de una membrana tipo Nafion, mostró ser un camino efectivo para separar α -CD de β -CD y de γ -CD. De tal forma que α -CD con una pureza de 95% fué obtenida después de que una solución equimolar de 0.02M de las tres ciclodextrinas fué hecha pasar a través de las fibras huecas de Nafion. A elevadas temperaturas se aumenta la velocidad de penetración pero se disminuye la selectividad [10]

De entre los métodos más sencillos recientemente publicados esta el elaborado por Dou Yongze y col. quienes realizan una cromatografía en papel y localización de manchas para calcular el contenido de ciclodextrinas. En el caso particular de β -ciclodextrina ésta fué localizada sobre papel Whatman y desarrollada con una mezcla de n-butanol-etanol-agua(4:3:3), secada y posteriormente rociada con yoduro de potasio. Este método es simple, rápido y confiable [30].

Un método conveniente para la determinación de ciclodextrinas por cromatografía de capa fina [224] puede ser como sigue: una solución de 5-10 μ l conteniendo de 30-70 μ g de ciclodextrinas es aplicado sobre una placa de sílica gel y secada. El cromatograma es desarrollado durante 3.5-4 hr., hasta una altura de 15-18 cm. con una mezcla de n-butanol-etanol-agua(4:3:3). Después

de secada la placa es expuesta a vapor de Iodo durante 1 a 2 min. obteniéndose los siguientes resultados:

Ciclodextrina	Rf	Color de Reacción.
alfa	0.35	Amarillo-naranja
beta	0.39	Verde-amarillento
gama	.5-.7	Café

5.2 Métodos Espectofotométricos.

Es importante señalar que las ciclodextrinas han sido analizadas en forma directa por complejación con colores específicos, como lo reporta Kondo y col. [109] quienes realizan el análisis de mezclas de ciclodextrinas empleando colorantes fluorescentes tales como 2-p-toluidininaftaleno-G-sulfonato (TNS) y o-anisaldehído. Encontraron que la adición de ciclodextrinas causa un cambio en la intensidad de fluorescencia de los colorantes.

En el caso de TNS se registra un incremento a diferencia de o-anisaldehído que registra un decremento apreciable a su fluorescencia, siendo éste proporcional a la concentración de ciclodextrinas.

Dicho método es adecuado para aplicaciones de rutina en donde la composición de la muestra se mantiene relativamente constante.

Por otra parte Mäkelä y col.[123] reportan que los ensayos realizados con anaranjado de metilo, verde de bromocresol y fenoftaleína fueron especialmente útiles en el análisis de ciclodextrinas.

La complejación de anaranjado de metilo con CD's se caracteriza por un cambio de color estable a pH neutro durante varias horas, lo cual evidentemente contribuye a una alta reproducibilidad del análisis además de estar relativamente libre de interferencias; en el caso de fenoftaleína está fué relativamente específica para β -ciclodextrina.

Un método para la separación de ciclodextrinas por electroforesis capilar de zona con detección indirecta es descrito por Nardi y col. [160]. Puesto que las ciclodextrinas son compuestos neutros, su electromigración es medida por la formación de complejos de inclusión con ácido benzóico, el cual sirve como un componente que absorbe en U.V. de el electrólito de fondo. La detección indirecta en UV de ciclodextrinas es posible probablemente debido a la desviación de el espectro de absorbancia de las especies complejadas.

El método de electroforesis capilar de zona es para una rápida y eficiente separación tanto de componentes iónicos y no iónicos en la química farmacéutica experimental [160].

VI PROCESO DE ENCAPSULACION.

Freudenberg y Cramer fueron los primeros en reconocer una de las propiedades más relevantes de las Ciclodextrinas: su habilidad para formar complejos de inclusión con una extensa variedad de moléculas, tanto en medio sólido como líquido [8,83,246], así como con algunos gases raros [22].

Generalmente la formación del complejo de inclusión involucra el entrapamiento de una molécula huésped en la cavidad de una molécula anfitrión (representada por ciclodextrinas), sin tener lugar algún enlace covalente entre ambos. Esta es la esencia de la llamada "Encapsulación Molecular" [21,190,225,246], primordial objetivo de esta recopilación bibliográfica.

La proporción molar de la molécula huésped incluida en la ciclodextrina es equimolar en muchos casos, aunque frecuentemente varía con el tamaño molecular, forma y tipo de ciclodextrina [21,144,219].

Los complejos de inclusión con ciclodextrinas actúan como si fuera una sola molécula, por lo cual tanto la fisicoquímica como las propiedades biológicas de la molécula huésped se ven alteradas [32].

El compuesto huésped puede ser aislado de la inclusión cuando es necesario, dicha propiedad difiere de los adsorbentes de sílica y la microencapsulación que han sido usados por varios años [144].

La microencapsulación es un método similar a la Encapsulación Molecular ya que en algunos casos se obtienen los mismos efectos [219]. Sin embargo, existen diferencias esenciales entre ambas, las cuales se enuncian en la tabla VIII.

La encapsulación con ciclodextrinas se considera un procedimiento simple, barato y de gran valor en la tecnología.

Tabla VIII. Comparación entre Microencapsulación y Encapsulación Molecular.

	<u>Microencapsulación</u>	<u>Encapsulación Molecular.</u>
Aplicación Industrial	Desde 1960	Después de 1982.
Esencia de la Tecnología.	Aplicación de una cubierta a la superficie externa de los granulos o gotas de la subst. a ser encapsulada (Proc. Físico)	Formación de complejos de inclusión cristalinos basado sobre interacciones de inclusión (Proc. Químico)
Material de la Capsula.	Polimeros.	Ciclodextrinas.
% de la Subst. Encapsulada.	50-95%	5-25%
No. de Moléculas en la Capsula	10^{10} - 10^{13}	0.5-2.0 (generalmente 1)
Sensitividad a presión.	Microcapsulas conteniendo liquido son frágiles.	No Sensitivo.
Interacción entre la pared de la capsula y la substancia encapsulada.	Insignificante	La ciclodextrina en estado cristalino inhibe la descomposición de la substancia.
Efecto de la disolución de la substancia encapsulada.	Disolución Retardada.	La velocidad de disolución y la solubilidad son incrementadas.
Liberación de la Substancia Encapsulada.	Por difusión, disolución, degradación enzimática o rompimiento de la pared.	En medio acuoso el equilibrio de disociación es establecido de inmediato.
Acción Fármaco-cinética.	Efectos colaterales son reducidos, la absorción es retardada y puede ser programada	La absorción es usualmente mejorada debido a el disperso estado molecular.

6.1 Complejos de Inclusión en Solución Acuosa.

Los complejos de inclusión son preparados usualmente en un medio líquido, los métodos dependen esencialmente de las propiedades de la molécula huésped [31,219].

En general, moléculas hidrofóbicas o residuos hidrofílicos tienen una alta afinidad por la cavidad de ciclodextrinas en presencia de agua, debido a que ésta proporciona una matriz microheterogénea semejante a un disolvente polar [31,246].

En solución acuosa, la cavidad altamente apolar de la ciclodextrina es ocupada por moléculas de agua que están en un estado energéticamente desfavorable (repulsión polar-apolar) y son por consiguiente rápidamente substituídas por moléculas "huésped" menos polares que el agua generando una alta entalpía del sistema (fig.28) [21,225].

Los complejos en solución no son especies estáticas, por el contrario, continuamente se intercambian con las moléculas de sustrato libre generando un equilibrio termodinámico y cinético; son relativamente estables ya que son fácilmente separables de la solución en forma cristalina a temperatura ambiente [31,246].

En solución acuosa la molécula "huésped" se encuentra dentro de la cavidad de la ciclodextrina, por lo cual el complejo es rodeado completamente por una multicapa de moléculas de agua [83,179].

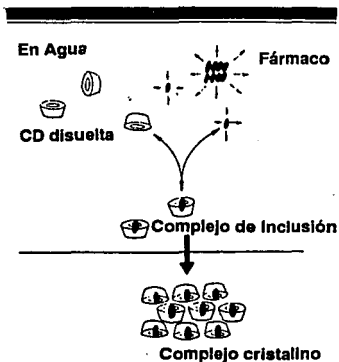


Fig.28 Ilustración esquemática del Proceso de Complejación de ciclodextrina y huésped por asociación reversible.

La proporción molar de las moléculas anfitrión y huésped son usualmente 1:1 en complejos de inclusión formados en solución acuosa, excepto para complejos con moléculas huésped de larga cadena o bifuncionales (anaranjado de metilo, ácido cinámico, etc) en donde las moléculas de ciclodextrina se unen a una molécula del sustrato [70].

Si existe en solución otro componente huésped con mayor capacidad de inclusión que el compuesto deseado, la inclusión se lleva a cabo con el primero; debido a que la ciclodextrina presenta un comportamiento similar a una enzima. Es decir, se basa en afinidades polares, formas y tamaños [144].

La solubilidad de la molécula huésped usualmente se incrementa incrementando la concentración de ciclodextrina (fig.29) [219].

La interacción entre una molécula huésped y ciclodextrina en solución puede ser estudiada completamente por numerosos métodos fisicoquímicos (remítrse a 6.6.2) [179].

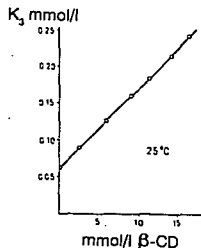


Fig.29 Solubilidad de Menadiona (vit. K3) como una función de la concentración de β -CD.

Ahora bien la relación espacial entre huésped y anfitrión es esencial en la complejación; debido a que diferentes comportamientos pueden presentarse con c/u de las ciclodextrinas, como lo informan Uekama y col.[240] al realizar un estudio con complejos en solución acuosa de tolbutamida en donde la orientación del sustrato es distinta con α - y β -ciclodextrina.

Aboutaleb y col. afirman que la adición de ciertos acarreadores solubles en agua (polietilenglicol, propilenglicol) en una concentración de 5% (w/v) reducen la concentración de ciclodextrina usada en la formulación de clorafenicol en solución.[1]

6.2 Complejos de Inclusión en Estado Sólido.

En ciertos casos la formación del complejo en fase sólida es termodinámicamente espontáneo, sin embargo, no todas las sustancias y no todas las condiciones son adecuadas para la formación de un complejo de inclusión [31]. Además de que la existencia de un complejo de inclusión en solución acuosa no garantiza la existencia del mismo en estado sólido [219].

Desde un punto de vista farmacéutico, si un complejo de inclusión es logrado en forma sólida o polvo, este puede ser más extensamente usado siendo especialmente conveniente para administración oral [113].

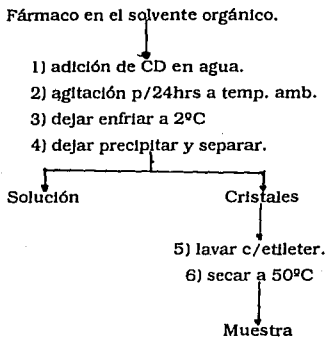
El método más frecuente para la preparación de complejos en estado sólido es por agitación de la solución acuosa (fría o caliente, neutra o ácida) de la ciclodextrina con la molécula huésped. Cuando se ha logrado el equilibrio, el agua es eliminada y el producto es separado en forma sólida [31,219]. No obstante, este método no es adecuado para la obtención a escala industrial, ya que presenta el inconveniente de un alto consumo de agua y tiempo [144].

Para preparación a gran escala es recomendable usar otros procedimientos, los cuales se enuncian a continuación.

6.2.1. Método de Coprecipitación:

Se caracteriza por que la ciclodextrina en agua y un fármaco en un disolvente orgánico (etil eter, cloroformo, benceno) son mezclados con una proporción molar de 1:1 (como se muestra en el esquema 3) es importante señalar que el tipo de disolvente puede afectar la formación del complejo de inclusión [34, 113, 148, 190].

Esquema 3. Método de Coprecipitación.



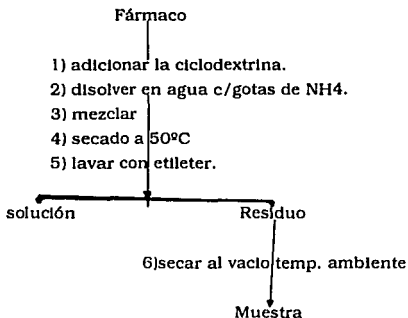
6.2.2 Método de Secado por Congelamiento (Freeze-drying):

Es útil para fármacos solubles en agua, ya que tanto la ciclodextrina como el sustrato pueden ser disueltos en agua. Los complejos de inclusión obtenidos son amorfos generalmente, siendo por ello muy solubles y presentando una alta biodisponibilidad (esquema 4) [8.48, 113].

6.2.3 Método de Amasado:

Se caracteriza por que el compuesto huésped es adicionado a una mezcla lechosa de ciclodextrinas y de 2 a 5 veces más cantidad de agua. Es amasado en un mezclador de forma total para obtener una pasta que posteriormente es secada. El sólido así obtenido es lavado con una pequeña cantidad de disolvente como éter ó etanol, para remover los compuestos huésped libres adsorbidos en el complejo. [8.33,34, 144, 190]

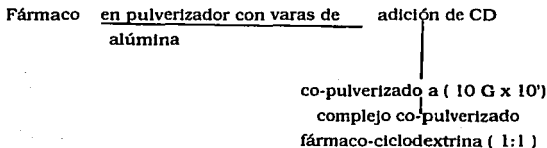
Esquema 4. Método de Secado por Congelamiento.



6.2.4 Método de Co-pulverizado:

Dicho procedimiento es puesto de manifiesto por Fujjoka y col. y consiste en someter al fármaco a una pulverización con alumina y adicionar ciclodextrina para obtener un complejo de fármaco-ciclodextrina co-pulverizado. Los resultados de solubilidad son muy similares a los que se obtienen con el de secado por congelamiento. La formación del complejo es reversible [48].

Esquema 5. Método de Co-pulverizado



6.2.5 Calentamiento en un Envase Sellado:

Uno de los métodos más recientemente publicados para la preparación de complejos de inclusión sólidos, es el expuesto por Nakai y col.[148] quienes intentan obtener los complejos por calentamiento de mezclas de ciclodextrinas y un fármaco, sin que se requiera de algún proceso de disolución.[34,148]

A grosso modo, dicho procedimiento consiste en que una mezcla física del fármaco y ciclodextrina es sellada en un contenedor después de absorber una cantidad definida de vapor de agua. Después es calentada a una temperatura que va desde 43° a 142°C.

El compuesto de inclusión cristalino es producido cuando el contenedor es calentado por arriba de 70°C. La proporción molar de combinación es mayor que la obtenida por el método de coprecipitación.[148]

6.2.6 Preparación con Ultrasonido:

Este procedimiento es expuesto por Nippon, y consiste en que una mezcla de ciclodextrina y un compuesto son agitados mecánicamente y sujeto a ultrasonido para producir el complejo de inclusión. Una cantidad específica de ciclodextrina en agua es calentada a 40°C y sujeta a ultrasonido, mientras es agitada se adiciona el compuesto huésped deseado en forma gradual para formar el complejo de inclusión. La producción fué de 60.7% comparada con 51.3% cuando el complejo es obtenido por el método convencional [161].

6.2.7 Preparación de Complejos con Compuestos Organometálicos.

Harada y takahashi reportan la formación de complejos de inclusión sólidos de compuestos organometálicos y ciclodextrinas, ellos encuentran que

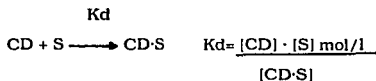
la adición directa de finos cristales de ferrocianuro a una solución acuosa de ciclodextrinas a 60°C da altas producciones de complejos de inclusión con α -, β - y γ -ciclodextrina en proporciones molares diferentes, ya que en el caso de β - y γ -ciclodextrina el complejo presenta una relación 1:1 a diferencia de α -ciclodextrina que es de 2:1 [58].

Durante la síntesis de complejos de inclusión con ciclodextrina el componente huésped puede ser encerrado dentro de la cavidad o simplemente agregarse a la molécula de ciclodextrina [190].

Los complejos cristalinos prácticamente nunca son de una composición estrictamente estequiométrica. Sin embargo, son estables si las cavidades del anillo de ciclodextrina son sólo parcialmente saturadas por moléculas huésped apolares [219].

6.3 Proceso de Inclusión de los Complejos.

La formación de complejos entre ciclodextrinas y sus moléculas huésped es descrito de acuerdo a la ecuación:



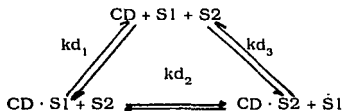
y puede ser cuantitativamente descrito por la constante de disociación (Kd) [187,190]. Dependiendo de la naturaleza del sustrato Kd puede ser determinada por el empleo de un sustrato que compita con la ciclodextrina, generalmente

Kd es obtenida utilizando la gráfica de cambio de absorción del sustrato contra la concentración de ciclodextrina [190].

En el caso de la formación de un complejo de inclusión 2:1 el esquema sería:



y es característico para anaranjado de metilo en solución acuosa[23]. Ahora bien, si dos diferentes moléculas de sustrato S1 y S2 son simultáneamente presentadas a la ciclodextrina, ellas cumplen y presentan el siguiente esquema:



el cual es útil para obtener una constante de equilibrio que no puede ser obtenida directamente, la unión preferencial de uno de los componentes es determinada por las constantes de disociación [23, 142].

Es importante citar que no existe una correlación obvia entre las propiedades químicas (grupos funcionales) de las moléculas huésped y las constantes de disociación.[190] De tal forma que la inclusión no puede considerarse que depende primariamente del carácter del "huésped".

Con respecto a los parámetros termodinámicos como son Entalpía (ΔH) y Entropía (ΔS) pueden ser obtenidos de la dependencia de la temperatura de la constante de disociación. ΔH siempre es negativa y ΔS puede ser negativa o

positiva dependiendo de la molécula huésped; lo que indica que el proceso es más estable en el estado final que el inicial [190].

Valores muy exactos de entalpía y entropía pueden ser obtenidos de mediciones calorimétricas [109].

Finalmente la formación del complejo puede ser subdividida en varios pasos [8,23]:

- a) aproximación del sustrato y ciclodextrina.
- b) eliminación de moléculas de agua de la cavidad de ciclodextrina y la vecindad inmediata de los grupos hidroxil-fenilo.
- c) asimilación de estas moléculas de agua por el agua circundante (ganancia en entropía).
- d) interacción de ciclodextrina-sustrato.
- e) posible formación de puentes de hidrógeno entre ciclodextrina y huésped.
- f) reconstitución de la estructura hidratada alrededor del complejo terminado.

6.4 Estructura de los Complejos de Inclusión.

La estructura de complejos de ciclodextrina cristalinos no es necesariamente idéntica con la estructura de los complejos en solución [79].

Dependiendo de el tamaño y carácter iónico ó molecular del sustrato en el estado cristalino las moléculas anfitrión son envueltas dentro de un enrejado cristalino que puede ser de dos tipos: a) de jaula y enrejado y b) de canal (fig.30) [190,246].

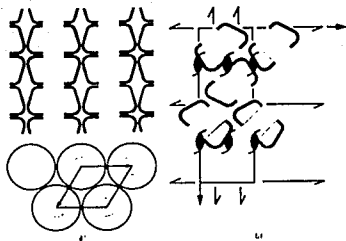


Fig.30 Representación del arreglo de ciclodextrinas en cristales.
Las cavidades están sombreadas.

En la estructura de jaula la cavidad de ciclodextrina es encerrada en ambos lados por moléculas de ciclodextrina adyacentes para formar pequeñas cavidades aisladas, este tipo de estructura para moléculas huésped pequeñas tal como agua y metanol.

En la estructura de canal, las moléculas de ciclodextrina son coaxialmente amontonadas formando un canal continuo de la cavidad de ciclodextrina, dentro de las cuales moléculas relativamente grandes o compuestos iónicos pueden ser incluidos.

En pocos casos las moléculas huésped son incorporadas dentro de los intersticios externos entre las moléculas de ciclodextrina como inclusiones enrejadas.

Cuando los complejos de ciclodextrina son cristalizados fuera de soluciones acuosas, muchas moléculas de agua son acomodadas dentro del enrejado como hidratos cristalinos.[246]

6.5 Fuerzas manejadas p/la formación del Complejo de Inclusión.

Los complejos de inclusión son estabilizados por diversas fuerzas intermoleculares aunque el mecanismo de unión es aún materia de controversia, y han sido discutidos en términos de interacciones hidrofóbicas, fuerzas de dispersión van der Waals o London y uniones de hidrógeno. Es decir, siempre son enlaces débiles, lo que permite la formación del complejo en forma reversible. En el caso de sustratos polares las interacciones de Van der Waals y puentes de hidrógeno, supuestamente tienen lugar entre los grupos hidroxilo de las moléculas anfitrión y huésped[56].

Generalmente, la formación de los complejos de inclusión de ciclodextrina están asociados con un cambio de entalpía favorable y un desfavorable cambio de entropía, por lo tanto, no puede atribuirse a interacciones de solvatación clásica.[219]

Si ΔH° es graficada vs ΔS° , una relación lineal es observada en la cual ΔH° y ΔS° están compensados. La pendiente de la gráfica es llamada la "temperatura de compensación" ó "temperatura de iso-equilibrio" y es denotada por T_c . [21]

Menard y col. asumen que la entropía esta probablemente más relacionada a la participación del disolvente en el fenómeno de complejación.[140]

Es por ello que las siguientes explicaciones han sido propuestas para explicar dicho cambio:

- a) Interacciones electrostáticas de van der Waals entre huésped y ciclodextrina. Las fuerzas de Van der Waals incluyen fuerza de dispersión de London e interacciones dipolo-dipolo permanente.
- b) puentes de hidrógeno entre huésped y anfitrión.
- c) liberación de alta energía de moléculas de agua en la formación del complejo.
- d) liberación de energía en el anillo macromolecular de la ciclodextrina.

Todos estos factores pueden estar involucrados, pero las relativas contribuciones de cada uno pueden variar de acuerdo a las circunstancias [83,201].

Varios intentos se han hecho para determinar el alcance de la contribución de cada fenómeno de los 4 tipos de intersección en la formación del complejo pero a pesar de muchos esfuerzos, no hay un acuerdo general en cuanto a la fuerza principal que estabiliza el complejo. [8]

6.6 Métodos de Estudio para detectar la Formación de Complejos y la Constante de Estabilidad del Complejo.

6.6.1 Estudios de Solubilidad.

El método de análisis de solubilidad de Higuchi y Connors es una técnica de gran valor, en el campo farmacéutico para valorar la estabilización y la capacidad de solubilización de las ciclodextrinas [246]. Este procedimiento

revela que la complejación no es un simple fenómeno de inclusión ya que involucra fuerzas intermoleculares [83].

El método de estudio consiste en adicionar cantidades en exceso de la molécula huésped a una solución acuosa de ciclodextrina a varias concentraciones, agitando a temperatura constante. Después de que el equilibrio es alcanzado se evalúan los cambios en la solubilidad de la molécula huésped, los cuales son graficados como una función de la concentración de ciclodextrina [34].

Si la solubilidad de un huésped potencial se incrementa, aumentando la concentración de ciclodextrinas, la formación del complejo en solución es indicada [8].

Los diagramas de solubilidad de fase así obtenidos son generalmente clasificados en los tipos: A (complejo de inclusión soluble es formado) y B (complejo con una limitada y definida solubilidad es formado) como lo muestra la fig. 31.

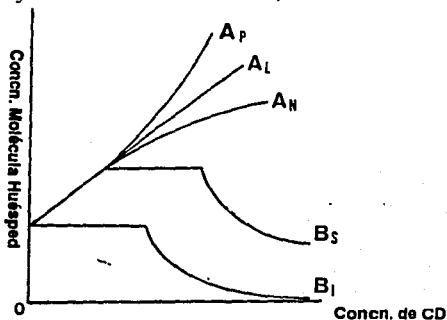


Fig.31 Diagrama de Solubilidad de Fases.

En tipo A varias posibilidades pueden ser observadas, el tipo AL es el más simple ya que el compuesto de inclusión es soluble y presenta una estequiometría 1:1. El tipo Ap es característico de la formación de compuestos de inclusión de alto grado, y el tipo An es observado en el caso de soluto/solvente o interacción soluto/soluto [34].

En tipo B existen dos posibilidades: Bs y B1, para el primero todo el huésped sólido es consumido y el huésped en solución es convertido a el compuesto de inclusión sólido por la adición posterior de ciclodextrinas. Y en el tipo B1 el compuesto es prácticamente insoluble [32,34].

A partir de dicho diagrama puede obtenerse la constante de estabilidad que se define como el estado de equilibrio entre la molécula huésped y la ciclodextrina en agua. El cálculo sería a partir de la inclinación e intersección de la línea recta inicial del diagrama de solubilidad de fases (fig.32) [31,144,246].

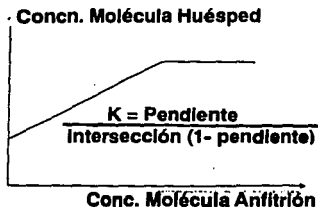


Fig. 32

La constante de estabilidad puede ser descrita por la ecuación 1, donde X es la concentración molar del complejo, a y b son las concentraciones molares iniciales de la ciclodextrina y la molécula huésped respectivamente y m, n son el número de moléculas unidas de ciclodextrina y huésped en el complejo.

$$K = \frac{(X)}{(a-mx)^m \cdot (b-nx)^n} \quad \text{eq. 1}$$

Dichos parámetros son significativamente afectados por condiciones ambientales como son temperatura, pH, polaridad del disolvente, concentración por lo cual es importante controlarlos, ya que cuando esto es logrado, el comportamiento del sistema es cuantitativamente reproducible [137,140].

La estabilidad del complejo y también las fuerzas manejadas en la complejación están influenciadas por el tamaño molecular del huésped y el tamaño de la cavidad de la ciclodextrina [34,150].

Esto proporciona una ventaja adicional para usar la complejación con ciclodextrinas en el campo farmacéutico. Lo cual ha sido reportado por Uekama [240] empleando hormonas esteroidales. Este método también ha sido aplicado por Cohen y Lach [83], Hedge [68], por Mazzi y col. [135] empleando un fármaco anti-inflamatorio no esteroideal. Aboutaleb y col. [1] en la formación de complejos con clorafenicol, así como también por Mura y col. [143], Erden y Celebi [38] para el estudio de complejos de Naproxen, Menard [139] y Deponti [28] solo por citar algunos.

Para determinar la constante de estabilidad se han propuesto varios métodos, entre ellos el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) sugerido por Uekama y col. [242] quienes afirman que es adecuado para sustancias químicamente inestables y para sistemas que van acompañados de cambios espectrales.

Cambios en el tiempo de retención como una función de la concentración de ciclodextrina fueron cuantitativamente tratados para conseguir la constante de estabilidad.

Pendergast y Connors hacen uso de una técnica experimental denominada "Indicador Competitivo", la cual se caracteriza por que un equilibrio es establecido entre la ciclodextrina y un indicador cuyo espectro de absorción difiere significativamente en su forma complejada y sin complejar.

Dicho equilibrio es perturbado por la acción de una molécula huésped que compete por la ciclodextrina y puede ser aplicable a sustratos altamente solubles así como en medio alcalino. La constante de estabilidad se obtiene midiendo el cambio espectral producido por la alteración con la molécula huésped [178].

Así mismo Hersey y col. hacen uso de métodos de competición para investigar la inclusión de tres clases de sustratos de diferente tamaño, tipo de carga e hidrofobicidad.[70]

De lo más reciente para el cálculo de la constante es lo publicado por Susuki y col., quienes hacen uso del método osmótico, el cual examina la

aplicabilidad de la medida de la presión osmótica en términos de descenso del punto de congelamiento. De tal forma que cuando el complejo fué formado en solución acuosa se presentó un descenso en la presión osmótica [209].

6.6.2 Detección de Complejos de Inclusión en Solución.

La interacción entre una molécula huésped y ciclodextrina puede ser estudiada por varios métodos, siendo los más comunes los que se citan a continuación [21].

La prueba más simple de la formación del complejo es la cristalización inmediata de el complejo de inclusión en adición de una sustancia huésped a una solución de ciclodextrina acuosa. Este procedimiento tan simple puede ser estandarizado: la sustancia huésped es agregada a una solución caliente de ciclodextrina de concentración elegida apropiada y su luz de transmitancia es continuamente medida y registrada con una agitación constante a una velocidad de enfriado constante. Bajo condiciones estandarizadas tales curvas de estandarización son muy reproducibles, y c/u es característica de la sustancia huésped.

6.6.2.1 Espectroscopía Ultravioleta (U.V)

Cambios espectrales han sido observados y usados para investigar cuantitativamente la formación de complejos de β -ciclodextrina con bencilano [150], colorantes[201], fenitoin [137], fenotiazidas [173] con un agente inmunomodulador sintético [28]. Generalmente dichos cambios espectrales son similares a los efectos causados por cambios en el disolvente. Estos cambios pueden ser debidos a una perturbación de los niveles electronicos de energía del huésped, causados ya sea por interacción directa con la ciclodextrina, o por la

exclusión de moléculas de agua de solvatación o por una combinación de estos dos efectos [21].

6.6.2.2 Dicroísmo Circular (DSC)

Este método consiste en que uno de los componentes de un haz polarizado en un plano se absorbe más intensamente que otro. Da pruebas concluyentes de la formación del complejo a concentraciones muy bajas. Este método ha sido empleado por Uekama, Nakajima, Fujioka, Mazzl, etc. [48,135,150,240].

6.6.2.3 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Ha contribuido grandemente a el entendimiento de las interacciones atómicas entre huésped y ciclodextrina, ya que permite identificar una molécula por la posición de sus protones y muestra la evidencia más directa de la inclusión de un huésped dentro de la cavidad apolar de la ciclodextrina en solución [21,31,83].

6.6.2.4 Microcalorimetría.

Este método ha sido empleado por Hardee y col. y se basa en medir directamente las propiedades termodinámicas de la formación del complejo como son entalpía y entropía. Para pequeñas constantes de unión, dicha técnica puede ser más segura que los espectrofotométricos [60,83].

Giordano y col. confirman tanto la interacción como la estequiometría del complejo de inclusión entre paracetamol y β -ciclodextrina por microcalorimetría [55].

6.6.2.5 Potenciometría

Moléculas huésped ácidas o básicas frecuentemente muestran aparentes cambios en su acidez o basicidad con la inclusión; cambios en pKa son observados. Dependiendo de la molécula huésped estos cambios pueden ser monitoreados potenciométricamente. Es aplicable a los sistemas involucrados en el equilibrio ácido-base en la complejación.[21]

6.6.2.6 Polarografía

El uso de polarografía para determinar la constante de estabilidad de complejos de β -ciclodextrina ha sido reportado por De Ponti y col. [28] al estudiar los cambios polarográficos de un agente inmunomodulador sintético y β -ciclodextrina. El método fué especialmente útil debido a la poca cantidad de β -ciclodextrina adicionada para lograr el equilibrio.

6.6.3 Estudios de Complejos de Inclusión en Estado Sólido.

6.6.3.1 Espectros de Infra-Rojo (IR)

La formación de complejos puede ser probada en algunos casos por estudios de infrarojo, pero este método es de uso limitado; debido a que las bandas de ciclodextrina que representan la mayoría del complejo es difícilmente influenciada [83, 113, 135].

Nakai y col. tienen reportado sobre el espectro de infrarojo de medicamentos en grandes mezclas [149].

6.6.3.2 Difracción de Rayos X.

Es el mejor método para detectar la formación del complejo, además de las precisas relaciones geométricas entre la molécula huésped y ciclodextrina

pueden ser establecidas y las interacciones pueden ser identificadas [31,83]. Si el patrón de difracción no puede corresponder a el de los componentes puros, se considera que la formación del complejo está asegurada.

6.6.3.3 Métodos de Análisis Térmico (TAS)

Son los medios preferidos para asegurar la formación del complejo como también para estudiar la estabilidad del complejo en estado cristalino [31].

6.6.3.4 Sistema Térmico Analítico

Es un método bueno para aceites volátiles que pueden formar complejos de inclusión con ciclodextrina. Asegura que las moléculas huésped a complejadas no puede aparecer en la atmósfera hasta que una temperatura de 160°C es establecida [83].

6.6.3.5 Cromatografía de Capa Fina.

Puede ser empleada si un disolvente puede ser encontrado en un complejo siendo suficientemente estable. El valor de R_f que presenta el complejo es menor que el exhibido por el componente huésped [83].

6.7 Procedimiento General para disociar el Complejo.

La inclusión es muy usada prácticamente, pero si se desea dejar libre al componente huésped hay varias formas [74,144].

- 1) **Calentamiento:** muchos complejos son disociados cuando la solución es enfriada. Complejantes volátiles son removidos por evaporación o sistema de destilación.

- 2) Extracción:** los complejantes pueden ser removidos por extracción con solventes adecuados como son metil alcohol a altas temperaturas. Para análisis por cromatografía líquida dimetil sulfoxido puede ser empleado para disolver el complejo.
- 3) Hidrólisis ácida:** descomposición de ciclodextrina por varios ácidos pueden liberar la molécula huésped.
- 4) Hidrólisis enzimática:** la ciclodextrina es hidrollizada por enzimas microbianas, permitiendo la liberación de la molécula huésped (remitirse al Cap. 2).

VII

APLICACIONES DE CICLODEXTRINAS

La aplicación práctica de ciclodextrinas se ha acrecentado durante los últimos años debido a que la encapsulación molecular ha sido introducida en industrias que manufacturan formas farmacéuticas, productos alimenticios, artículos de tocador, agroquímicos y otros [8].

Estudios extensivos han mostrado que pueden emplearse como catalizadores, en reacciones de fotocontrol, separación de isómeros o producción selectiva, así como en electrónica molecular [190].

7.1 Ciclodextrinas en el Area Farmacéutica.

Freudenberg, Cramery y Plieninger (1953) fueron los primeros en describir a través de una patente, los efectos específicos que pueden lograrse en la complejación inclusiva de fármacos con ciclodextrinas [219,224,225].

El uso de ciclodextrinas para mejorar propiedades de fármacos, ha sido ampliamente analizado y la primera aplicación comercial registrada fué la prostaglandina E2 complejada con β -ciclodextrina bajo el nombre de Prostramon en el mercado japonés [32,179] y en Hungría los complejos de ciclodextrinas-saborizantes para alimentos [5,224]

La Bundesgesundheitsamt alemana considera a β -ciclodextrina como una sustancia auxiliar no tóxica en formulaciones de fármacos, pero demandó que cada formulación en la cual se haga uso de β -ciclodextrina, el efecto y papel de la misma dentro de dicha formulación debe estar documentada.

La tabla IX ilustra algunos de los productos farmacéuticos conteniendo complejos con ciclodextrina que ya se encuentran en el mercado [226].

TABLA IX
FORMAS FARMACEUTICAS CON COMPLEJOS FARMACO-CICLODEXTRINA

Complejo	Nombre Comercial	Forma Farmacéutica	Indicación	Compañía	País
PGE1- α -CD	Prostavasin.	Infusión Arterial	Vasodilatador	Ono Schwartz	Japón Alemania
PGE2- β -CD.	Prostarmon-E.	Tableta sublingual	Iniciación de Labor	Ono	Japón
Piroxicam- β -CD	Brexin Cicladol	Tabletas y Supositorios	Análgico-Antiinflamatorio	Chiesi Master-Pharma	Italia Italia
Aceite Gálico- β -CD	Xund. Allidex.	Chochos	Anti-ateroesclerótico	Biopharm Gyogyszert	Alemania Hungria
Benexato- β -CD.	Ulgut. Lonmiel	Cápsula	Antiulcerante	Teikoku Shionogi.	Japón Japón
Iodo- β -CD.	Menagargle.	Solución Antiséptica Bucofaríngea	Auxiliar en amolestias de la garganta	Kyushin	Japón

Diversos beneficios en las diferentes formas farmacéuticas pueden obtenerse por el empleo de las ciclodextrinas [8,84,219,224,246].

Preparaciones Sólidas.

- . la biodisponibilidad de fármacos escasamente solubles en agua puede ser incrementada por el aumento de la velocidad de disolución.
- . la uniformidad de contenido de una pequeña cantidad de un fármaco en diluentes voluminosos puede ser asegurada por el incremento en la dispersión y fluidéz.
- . fármacos incompatibles pueden ser mezclados juntos cuando uno de ellos está protegido por ciclodextrinas.
- . la volatilidad del fármaco es disminuída a pérdida mínima a través de la evaporación.
- . un fármaco líquido puede ser transformado en forma de polvo que es muy adecuada para manejo y manufactura.
- . incremento de estabilidad por menor interacción con el oxígeno atmosférico en muchos casos (oxidación atenuada).

Preparaciones Líquidas.

- . la solubilidad y estabilidad de algunos fármacos en agua puede ser mejorada.
- . sabores y olores desagradables pueden ser enmascarados.
- . fármacos y excipientes incompatibles pueden ser mezclados.

Suspensiones y Emulsiones.

- . fases de transición (cremado y poleado) pueden ser disminuídas por la cubierta protectora de las ciclodextrinas.
- . naturaleza trixotrópica de suspensiones puede ser controlada.
- . la estabilidad física del sistema dispersado puede ser mejorada.

Preparaciones Semisólidas.

- . las propiedades reológicas, como son la consistencia de un ungüento puede ser modificada.
- . la biodisponibilidad tópica puede ser mejorada por modificación en la liberación de un fármaco en ungüento o base de supositorios.
- . la capacidad de absorción de agua de oleaginosas y bases tipo agua en aceite pueden ser mejoradas por ciclodextrinas hidrofílicas.
- . propiedades de hidratación fuerte y sinéresis de geles pueden ser modificadas.

Preparaciones Inyectables.

- . hemólisis y daño de tejido muscular provocado por un fármaco pueden ser reducidos.
- . productos fácilmente solubles pueden ser preparados como un complejo.
- . suspensiones para uso parenteral pueden ser preparadas por reducción del fármaco a un fino polvo de complejo con ciclodextrina.
- . incremento en el tiempo de circulación sanguínea, disminución del tiempo de bio-transformación.

Entre estas aplicaciones comprobadas, algunas de las más importantes propiedades de fármacos que pueden ser modificadas por la complejación con ciclodextrinas se citan a continuación.

7.1.1 Solubilización de Fármacos.

El problema de una escasa solubilidad es bien conocido en la práctica farmacéutica, a pesar de que una rápida solubilidad ciertamente no siempre es requerido, en algunos casos esto es necesario.

La solubilidad puede ser incrementada por modificaciones físicas o químicas de el fármaco alternativamente (vgr: sales, formas amorfas/ metaestables). Otra posibilidad es el cambiar las características del solvente por la adición de agentes solubilizantes o complejantes.

Hoy en día, el uso de ciclodextrinas para mejorar la solubilidad de fármacos escasamente solubles recibe toda la atención en la literatura y practica farmacéutica [254].

Usualmente la solubilidad de un fármaco se incrementa con la cantidad de ciclodextrina adicionada, aunque en algunos casos con un incremento en la concentración inicial de ciclodextrina, la solubilidad inicial se eleva y después disminuye (fig.33) [190,246].

El incremento de la solubilidad de un fármaco se ha visto que esta relacionada con la solubilidad intrínseca y la habilidad de inclusión de la ciclodextrina en agua [246].

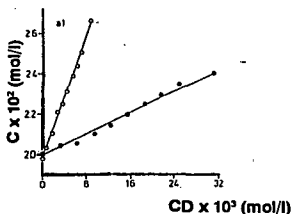


Fig. 33 Incremento en la Solubilidad de Aspirina con α -(●) y β -ciclodextrina(o) a 30°C.

Los complejos en forma de polvo no solo se disuelven más fácilmente sino además más rápidamente que el componente huésped, lo cual se atribuye a un incremento de la solubilidad o el descenso en la cristalinidad del fármaco [84, 190].

Hay muchos ejemplos para demostrar el efecto de las ciclodextrinas sobre la solubilidad de sustancias escasamente solubles en agua.

Como son los esteroides [179], fármacos anti-inflamatorios no esteroidales [172], menadiona [47], ácido retinoico [3], carbamezapina [15], tolbutamida [100], furosemida [96], benzodiazepinas y diazepam [101] solo por citar algunos.

Para moléculas como morfina, tetraciclina y esteroides que son grandes para ser incluidos en la cavidad de ciclodextrinas, puentes de hidrógeno son probablemente la mayor interacción en la solubilización [84].

Tabla X. Efecto de β -ciclodextrina sobre la solubilidad de barbituratos en 0.1N de HCl a 37°C (1:1)

Fármaco	Solubilidad (M . 10 ²)	
	Libre	Complejado
Fenobarbital	0.8	7.0
Pentobarbital	0.7	5.4
Amobarbital	0.4	1.4
Alobarbital	1.2	1.9
Barbital	5.3	9.5

Aboutaleb y col. enuncian que la solubilidad de clorafenicol se incrementó por la complejación con β -ciclodextrina [1].

Ichimuro reporta que oryzanol, útil como antioxidante y fármaco, forma un compuesto de inclusión con α -ciclodextrina, siendo con esto más soluble en agua [76].

KatayKedvessy señalan las características de incremento en la solubilidad de furosemida y espranolactona en la presencia de β -ciclodextrina [94].

Pitha y col.[180] encuentran un efecto similar de incremento en la solubilidad en el complejo de testosterona- γ -ciclodextrina.

Vikmon y col. manifiestan que amfotericina B forma un complejo de inclusión soluble con γ -ciclodextrina y la solubilidad puede ser mejorada casi 200 veces más [250]

Antioxidantes son también solubilizados con β -ciclodextrina de acuerdo a lo informado por Enmanji y col.[39].

Entre las diferentes ciclodextrinas usadas, γ -ciclodextrina incrementó la solubilidad de griseofulvin a el más alto grado [95].

La escasa solubilidad en agua de alfaxalone (<5g/ml) un útil agente anestésico esteroideal, fue considerablemente incrementada por complejación con ciclodextrinas, con lo cual se obtienen importantes ventajas en nuevas formulaciones [14].

De igual forma la solubilidad de clobazam, ampliamente usado como agente antiansiedad, mostró un incremento con la adición de ciclodextrina de acuerdo a lo manifestado por Nakai y col.[149].

Erden y Celebi en un estudio de la complejación de Naproxen con β -ciclodextrina, reportan que la solubilidad del fármaco se incrementa como una función de la concentración de ciclodextrina (fig. 34) [38].

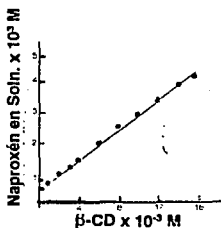


Fig.34 Solubilidad de Naproxen como una función de la concentración de β -ciclodextrina

Martini y col. hacen uso de β -ciclodextrina deshidratada para mejorar la solubilidad. De tal forma que cuando se empleo β -ciclodextrina hidratada el valor de disolución fué de 28.91% y cuando fué deshidratada su valor cambió a 32.19% [127].

En ocasiones los compuestos de inclusión de ciclodextrinas son débilmente solubles. Sato y col. sugieren que con la adición de sales de sodio de ácidos grasos saturados o insaturados, así como laurilsulfato de sodio o benzoato de sodio la solubilidad de dichos complejos puede ser incrementada [196].

7.1.2 Velocidad de Disolución y Biodisponibilidad.

La velocidad de disolución de fármacos complejados con ciclodextrinas, por regla es mucho mayor que la que presenta el fármaco sin complejar [8,179,246].

El límite de disolución de complejos fármaco-ciclodextrina es usualmente alcanzado dentro de un límite de 5 minutos, en contraste con la disolución de sustancias débilmente solubles que usualmente requieren más de 1 hora.

La constante de velocidad de disolución de pseudo-1er-orden por encapsulación molecular se encontró que en casos específicos es incrementada de 7 a 60 veces [179,219].

Hamada y col.[57] encontraron que la presencia de β -ciclodextrina en agua incrementó la velocidad de disolución en el caso de indometacina, mientras que con glucosa no tuvo efecto (fig.35).

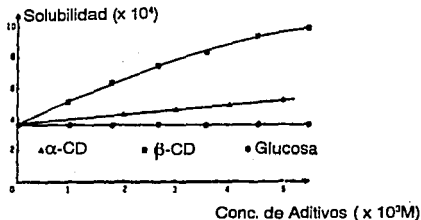


Fig.35 Efectos de α - y β -ciclodextrina en la solubilidad de indometacina a 35°C.

El perfil de disolución de un complejo frecuentemente muestra una curvatura negativa con el tiempo, debido a que éste se disocia casi totalmente después de la disolución.

El efecto de la temperatura es importante en la disolución de los complejos ya que de ésta depende la constante de estabilidad y la solubilidad siendo diferente en cada caso [246].

Uekama y col. [245] reportan la formación de un complejo de prostaglandina E1- γ -ciclodextrina en forma sólida en donde la velocidad de disolución del complejo fue extremadamente mayor comparada con la prostaglandina sola (10 veces), el complejo es menos cristalino que la molécula original y presenta buenas propiedades de almacenaje (fig.36).

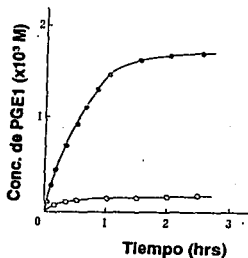


Fig.36 Perfiles de Disolución de PGE1 y su complejo con γ -ciclodextrina en agua a 25°C. PGE1 (o) y PGE1- γ -CD (●)

Celebi y Nagal reportan que las propiedades de disolución de ácido salicílico son mejoradas por la mezcla con γ -ciclodextrina [20]. Mura y col. [143] hacen lo propio con respecto a picotamida (fig. 37).

El uso de ciclodextrinas realza la velocidad de disolución de ácido salicílico, fenobarbital, prednisona e ibuprofen, no solo como resultado de una solubilidad incrementada sino que también fenómenos como humedad, incremento en la superficie de área, el carácter de la dispersión molecular etc., tienen que ser considerados [254].

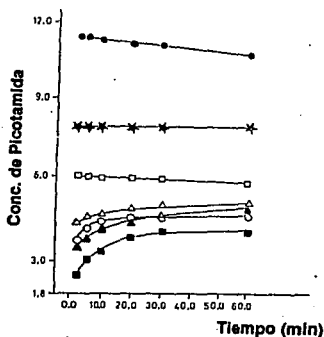


Fig.37 Perfiles de Disolución de Picotamida y sus complejos con ciclodextrinas en agua a 37°C (■)picotamida, (△) P- γ -CD, (*) P- α -CD y (●)P- β -CD.

La velocidad de disolución y permeación de clorafentocol fueron significativamente incrementadas por la formación del complejo de inclusión con β -ciclodextrina [184].

Un incremento en la velocidad de disolución puede deberse a el incremento en la solubilidad y disminución en la cristalinidad del fármaco [19,52].

En el caso del ácido piromídico (un congénere del ácido nalidíxico), la velocidad de disolución de los complejos con ciclodextrinas modificadas fue más rápida que la presentada por el ácido intacto [19].

La disolución de tolbutamida en un buffer con pH 1.2 fué significativamente mejorada por la formación del complejo de inclusión con β -ciclodextrina, el % de fármaco liberado después de 20 min. fue 12 y 93 para el fármaco solo y el complejo respectivamente (fig.38) [52].

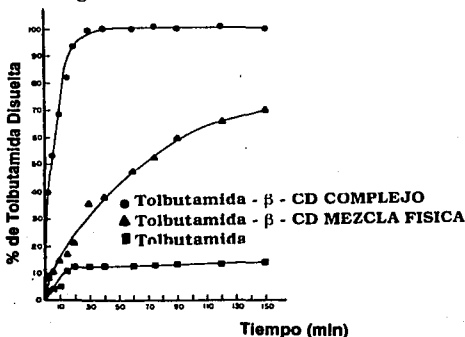
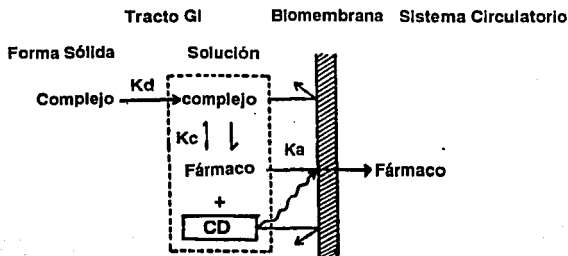


Fig.38 Disolución de Tolbutamida y β -CD.

La complejación con ciclodextrinas mejora la absorción de fármacos, por lo cual las dosis requeridas de ingredientes activos frecuentemente disminuye. Con fármacos de alto peso molecular su contenido en un complejo es aproximadamente de 15-25%, con moléculas de bajo peso molecular es alrededor de 15% y en algunos casos menos del 5% [219].

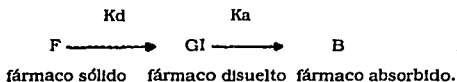
Cuando los complejos son administrados oralmente presentan una rápida disolución y pueden disociarse después de la absorción, ya que solo la forma libre del fármaco puede atravesar la barrera de lípidos de el tracto gastrointestinal. Por otra parte la ciclodextrina y el complejo pueden difundirse a través de la barrera lipídica con una considerable dificultad por el tamaño de el complejo polar [33].

Sin embargo, si el efecto de complejación sobre la absorción de fármacos es en gran parte dependiente de el valor de la constante de estabilidad, así como también de la velocidad de disolución del complejo, este proceso puede ser ilustrado por el esquema 6 [246].



Esquema.6. Absorción de Fármacos.

El proceso de disolución-absorción puede ser expresado por el siguiente modelo cinético:



F= fármaco en la dosis oralmente administrada.

GI= concentración del fármaco disuelto en el tracto gastrointestinal.

B= concentración del fármaco en sangre.

Kd= constante de la velocidad de disolución.

Ka= constante de la velocidad de absorción.

Si $K_d > K_a$ (cuando el fármaco es muy soluble), entonces la absorción es el paso limitante de la velocidad. En tales casos la complejación con ciclodextrina no puede promover la absorción y puede aun decrecer la concentración del fármaco total en el jugo gastrointestinal.

Esto puede ocurrir con fármacos cristalinos o líquidos que son fácilmente dispersados y solubles en agua: con fármacos que forman complejos muy fuertes con las ciclodextrinas o en casos en donde un gran exceso de ciclodextrina es administrada junto con el fármaco sin complejar.

Cuando $K_d < K_a$ (fármaco es escasamente soluble en agua), entonces la velocidad de disolución es el paso determinante en la absorción del fármaco. En tales casos K_d puede ser incrementada ventajosamente por la complejación con ciclodextrinas. Si K_a permanece constante la concentración del nivel sanguíneo del fármaco tiende a incrementarse. Siguiendo la aplicación oral, sólo el fármaco es absorbido y no la ciclodextrina [8,226].

Las reacciones de asociación-disociación de complejos en solución son muy rápidas y el equilibrio del fármaco libre y complejo es establecido inmediatamente [225].

Orientey col. al realizar un estudio sobre la difusión de naproxen en presencia de β -ciclodextrina, encuentran que ésta última aparece como un positivo agente auxiliar, siguiendo una rápida y continua liberación de el fármaco disponible para absorción y transporte en el tracto gastrointestinal intacto [171].

Szezaki y col. indican que es importante incrementar la absorción selectiva de un fármaco a fin de hacerlo más efectivo así como disminuir sus efectos colaterales. Ambas cosas se logran debido a que el fármaco complejo al ser más soluble, requiere de una dosis menor [246].

Con respecto a la biodisponibilidad diremos que ésta puede definirse como el alcance de la velocidad de absorción de un fármaco dosificado dentro del sistema circulatorio [246].

Hay varios factores fisicoquímicos que afectan la biodisponibilidad de un fármaco incluyendo solubilidad, estabilidad, tamaño de partícula, pKa, polaridad, puentes de hidrógeno, polimorfismo, coeficiente de partición, etc.[8].

El mejoramiento de la biodisponibilidad por medio de la complejación con ciclodextrinas está generalmente basada sobre el incremento en la velocidad de disolución de el fármaco el cual esta finamente dispersado en los fluidos gastrointestinales. El primer estudio de absorción IN VITRO fue demostrado por Frömring y Weyerman [224].

La biodisponibilidad de naproxén administrado como complejo de inclusión con β -ciclodextrina (1:1) fué evaluada usando un método de HPLC, a fin de determinar el fármaco y su conjugado glucoronido en orina. La absorción de naproxén administrado oralmente se inicia en el estómago, pero ocurre principalmente en el intestino delgado [175].

Nakanishi, indica que la absorción de fármacos anti-inflamatorios para la elaboración de supositorios es promovida por ciclodextrinas [156]. Nara y col. aseveran que las ciclodextrinas realzan la biodisponibilidad [159]

El efecto de ciclodextrinas sobre la liberación de fármacos en supositorios fue investigada por Frijlinky col., quienes encuentran una alta liberación a partir de los complejos fármaco-ciclodextrina, además de señalar un mecanismo para dicha liberación, la cual esta influenciada por la velocidad de disolución de los complejos [45]

Vila-Jato y col.[252] describen la preparación de un complejo de espironolactona- β -ciclodextrina y realizan un estudio de biodisponibilidad (12 voluntarios). Encuentran que la cantidad media de un metabolito (canrenona) excretado después de 48 horas fue mayor que la espironolactona sola con lo cual es posible usar una dosis baja con pocos efectos colaterales en la terapia del fármaco (fig. 39).

Tokumura y col.[235] exponen un método concerniente a un incremento en la concentración de fármaco libre (cinarizina) de un complejo en el tracto gastrointestinal por administración simultánea de un agente competitivo (DL-fenilalanina) como un medio útil de incrementar la biodisponibilidad de fármaco

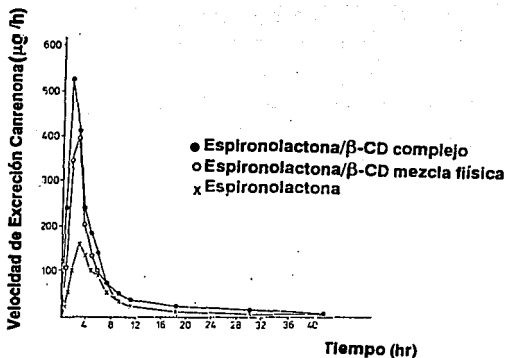


Fig.39 Curvas de Excreción Media Urinaria de Canrenona.

y obtener niveles sanguíneos elevados (fig.40). El uso del agente competitivo puede aplicarse no solo a una administración oral de complejos de ciclodextrinas, sino que puede ser usado como una metodología avanzada para estudiar la liberación controlada de un fármaco.

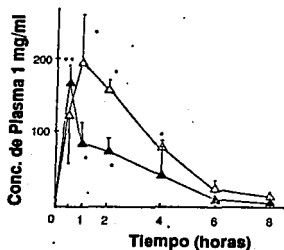


Fig.40 Concentración de Cinarizina en Plasma.

Loftson y col. encontraron que las soluciones acuosas de ciclodextrinas son efectivos vehículos para la liberación transdérmica de fármacos. A pesar de que la concentración del fármaco en el vehículo fue baja, las moléculas del fármaco dentro del complejo están en un rápido equilibrio con las moléculas libres del fármaco en solución dando como resultado una efectiva liberación de fármaco hacia la superficie de la piel [119].

Uekama y col. Informan que una mejoría en la biodisponibilidad oral de glicósidos digitálicos es obtenida por la complejación con ciclodextrinas [244]

7.1.3 Estabilidad de Fármacos.

La inclusión del centro químicamente reactivo de la molécula de un fármaco lábil en la cavidad de ciclodextrinas ofrece estabilidad al mismo. Dependiendo del tamaño de la cavidad se ha observado que tienen diferente grado estabilizador [84].

El mejoramiento de la estabilidad puede tener cuatro objetivos esenciales: estabilidad al calor, estabilidad a la radiación UV, resistencia a la oxidación y resistencia a la hidrólisis (ó estabilidad en solución acuosa) [34].

7.1.3.1 Reducción de Volatilidad

La reducción de la volatilidad puede ser demostrado por una elevación en el punto de ebullición o condiciones de evaporación de los líquidos o de sublimación para sólidos [34].

El valor de estas inclusiones es para permitir un mejoramiento en la calidad de las formas farmacéuticas en las que son incorporadas, especialmente

supositorios en los cuales su punto de fusión y dureza frecuentemente bajan por adición de sustancias volátiles, que sometidas a la inclusión disminuyen estas desventajas [32].

La reducción de volatilidad puede ser examinada por análisis térmico diferencial o por termogravimetría.

7.1.3.2 Resistencia al Calor.

La inclusión con ciclodextrinas puede elevar también el punto de fusión y temperatura de sublimación de un fármaco, lo cual fue observado para prostaglandina F₂ [34].

En el caso de la esencia de mejorana, por ejemplo, compuestos volátiles son liberados arriba de 100°C y pueden identificarse mediante cromatografía de capa fina.

Si el complejo de inclusión es formado, las sustancias volátiles solo aparecen arriba de 160°C y su descomposición tiene lugar arriba de 300°C [32].

7.1.3.3 Resistencia a la Oxidación.

Uno de los mayores intereses de la inclusión es la posibilidad de mejorar la resistencia a la oxidación [33].

Compuestos insaturados sensibles al oxígeno, tales como ácidos grasos, vitaminas, aldehídos, etc. pueden ser protegidos contra el oxígeno atmosférico casi perfectamente por complejación con ciclodextrinas. Esto es importante ya

que algunos de estos compuestos son difíciles para procesarse dentro de una preparación farmacéutica [219].

Vitaminas solubles en grasas forman complejos sólidos con ciclodextrinas, con lo cual sus componentes son estabilizados contra la acción de oxígeno, luz, sales minerales, etc. [179].

La vitamina D3 (colecalfiferol) extremadamente lábil forma un complejo con β -ciclodextrina cuya estabilidad térmica es considerablemente mayor que la sustancia sola (fig.41) [34].

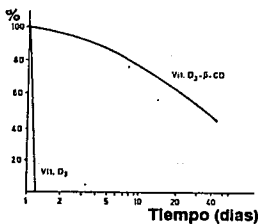


Fig.41 Descomposición de Vit.D3 a 80°C en forma libre y complejada.

7.1.3.4 Resistencia a la Hidrólisis y Degradación.

Muchas moléculas han sido investigadas con respecto a la estabilidad impartida por la inclusión con ciclodextrinas, encontrando que los resultados varían considerablemente dependiendo del tipo de molécula huésped y el tipo de ciclodextrina empleada [33].

Aspartame, un endulzante artificial empleado como aditivo en algunas formulaciones farmacéuticas, es estabilizado por ciclodextrinas en solución acuosa, incrementando su tiempo de vida media de un 13 a casi 50% [16].

Low y col. [120] informan la preparación de un complejo de isosorbide-2, 5-dinitrato ciclodextrina con actividad de vasodilatador coronario estable.

Glicósidos cardíacos como son digoxina y digitoxina son susceptibles a hidrólisis en un medio ácido con lo cual puede presentarse un descenso en la eficiencia terapéutica, así como también su biodisponibilidad oral. La formación de complejos de inclusión de digitoxina y β -ciclodextrina retardó la velocidad de hidrólisis de la digitoxina así como la aparición de digitoxigenina, un producto final de la hidrólisis fue casi inhibido completamente [260].

Salto y col. estabilizan prostaglandinas por la inclusión con ciclodextrinas y obtienen una preparación antishock para el tratamiento de hemorragias, envenenamiento y desórdenes en la circulación sanguínea [191]. Lin. enuncia que la degradación de acetaminofen fué de pseudo-1er-orden en la presencia y ausencia de α - y β -ciclodextrina. Incrementando la concentración de ciclodextrina disminuyó la degradación del acetaminofen en medio alcalino [117].

Formulaciones farmacéuticas acuosas, tales como gotas para los ojos son estabilizadas por la presencia de ciclodextrinas [80,91].

Takahoshi y col. mencionan que la desintegración de supositorios empleados en el tratamiento de la inflamación es prevenida por el entrapamiento con β -ciclodextrina [230].

La formación de un compuesto de inclusión de β -linolein- β -ciclodextrina previene la conversión de β -monolinolein a α -monolinolein inactivo, ya que este compuesto es útil en el tratamiento de hipercolesteronemia [121].

Szeman y col. realizaron un estudio para mejorar la estabilidad de Metil éster de Prostaciclina, un potente inhibidor de agregación de plaquetas y vasodilatador, ya que su extremada inestabilidad reduce su potencial terapéutico. La descomposición del fármaco fue seguida por HPLC, la inclusión con β -ciclodextrina estabiliza al fármaco en estado sólido y un efecto de hidrólisis disminuido con β -ciclodextrina puede observarse en solución acuosa [211].

El efecto estabilizador de β -ciclodextrina es más pronunciado a valores de pH bajos (fig.42). Szeman también reporta el estudio de furosemida en forma sólida y en solución acuosa, así como también en forma libre y complejada. La degradación (hidrólisis inducida por luz) fue determinada por HPLC y el efecto estabilizador de β -ciclodextrina sobre el fármaco fue establecido [210].

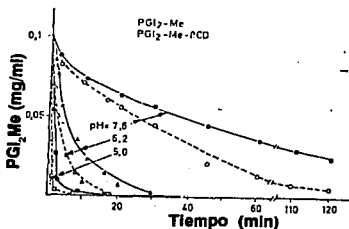


Fig.42 Descomposición de PGI₂Me en la ausencia (----) y presencia (—) de β -ciclodextrina.

Hibino y col. logran la estabilización del ácido gama-linoleico, un compuesto importante para preparaciones farmacéuticas, por la formación del compuesto de inclusión con β -ciclodextrina en forma de polvo, el cual permaneció intacto en un 75% después de ser almacenado a 40°C durante 1 mes.[71]

Ahora bien, la degradación de carmofur en el estado sólido fué significativamente acelerado por la complejación con β -ciclodextrina. Sin embargo, ácidos orgánicos teniendo un bajo valor de pKa y alta solubilidad son particularmente útiles para prevenir la hidrólisis del carmofur. [247]

Algunas sustancias naturales activas como aceite de camomila y própolis son un ejemplo de la formación de extractos naturales que complejados con β -ciclodextrina obtienen un incremento en su estabilidad.[214]

Vinceri y col. reportan un original sistema de estabilización de los principales activos de tinturas por medio de ciclodextrinas, puesto que la estabilidad es uno de los requisitos importantes para la homogeneidad y certeza de su respuesta terapéutica. En el caso particular de la tintura hecha de oenanthe aquatica que se emplea en el tratamiento de la dispepsia, bronquitis y asma.[253]

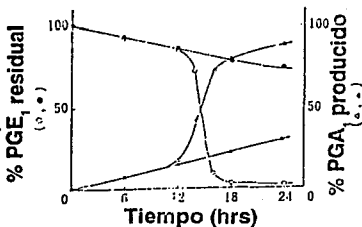
Vikmon y col.[251] enuncian la estabilización de Mydenton una sustancia líquida que se descompone fácilmente, por la formación de un complejo sólido con β -ciclodextrina (tabla XI).

Tabla XI. Estabilidad al calor del complejo de Mydenton- β -CD

	% de Contenido de Mydenton Restante.				
	1(d)	2(d)	7(d)	14(d)	21(d)
Complejo de mydenton- β -CD	100	98	96.8	95.3	92.1
Mezcla de sacarosa-mydenton	27	3	----	----	----

El mydenton es un suave relajante muscular que al ser complejoado con β -ciclodextrina y almacenado a temperatura ambiente durante más de dos años en contenedores cerrados no mostró pérdida del contenido o cambios organolépticos importantes [251].

Uekama [245] mostró que la deshidratación de prostaglandina E1 a prostaglandina A1 fué significativamente retardada por la formación del complejo con γ -ciclodextrina aún después de 12 horas presentando buenas propiedades de almacenaje (fig. 43).

**Fig.43 Degradación de PGE1 y Producción de PGA1 a 90°C.**

7.1.4 Enmascarador de Sabor.

El sabor u olor desagradable de algunos fármacos puede ser reducido o casi perfectamente disimulado por la formación de complejos de inclusión. Estos productos son fácilmente aceptados como tabletas.

Kagawa y Shinoda [87] a través de una patente indican que β -ciclodextrina es efectiva enmascarando el sabor amargo de plantas o extractos de hongos.

7.1.5. Desintegrante

Miseta y col. estudiaron el efecto de excipientes y tecnología sobre el tableteado de fármacos con dificultad de compresión, empleando fenilbutazona y tres desintegrantes, encontrando que cerca del 15% de ciclodextrina proporcionó un tiempo de desintegración adecuado y 8% dió una buena liberación del fármaco [141].

Sekulovic y Zajic Informan que tabletas conteniendo ciclodextrina como desintegrante mostraron un tiempo de desintegración mayor respecto a prunogel [197].

Fenyvesi y col. manifiestan que un polímero de ciclodextrina, un desintegrante recientemente descubierto, es directamente compresible en forma pura para obtener tabletas con una dureza mayor de 5 Kg. y una baja friabilidad. Dicho polímero de ciclodextrina puede ser considerado un desintegrante cinco veces más efectivo que almidón de papa y diez veces más que lactosa (fig. 44) [40].

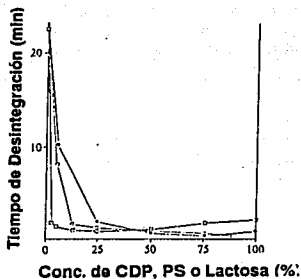


Fig. 44 Tiempo de desintegración de Tabletas c/ (o) almidón de papa, (●) lactosa y polímero de ciclodextrina (■)

Además presenta la ventaja de disminuir altamente la friabilidad de tabletas de celulosa microcristalina mientras que almidón de papa y especialmente lactosa incrementan la friabilidad. Así como también acelerar la velocidad de disolución de fármacos escasamente solubles (fig. 45).

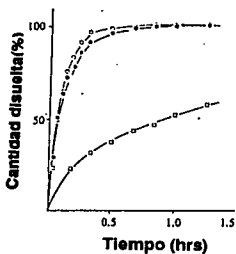


Fig. 45 Perfil de Disolución de Tablet de Furosemida sin desintegrante. (○) c/2.5% del polímero de ciclodextrina (●) y 12.5% de almidón de papa (■)

Estudios para evaluar la aplicación de β -ciclodextrina como excipiente en forma farmacéuticas orales, así como realizar una comparación con el uso de excipientes no complejantes como maltosa, han sido realizados por Bootsma y col. [12] y cuyos resultados mostraron una mayor velocidad de disolución de diazepam de la cápsula conteniendo el complejo fármaco- β -ciclodextrina que aquélla conteniendo diazepam-lactosa.

También Gala y col. llevaron a cabo un estudio para caracterizar las propiedades esenciales de β -ciclodextrina para la manufactura de formas farmacéuticas principalmente tabletas, encontrando que una formulación de compresión directa de progesterona con β -ciclodextrina como excipiente, exhibió una disolución más rápida que una conteniendo celulosa microcristalina o fosfato dicálcico [51].

La evaluación de β -ciclodextrina como un vehículo de compresión directa ya sea individualmente en mezcla con otro excipiente (lactosa), para la preparación de tabletas conteniendo fármacos altamente solubles (fenobarbital, diazepam, prednisona o espirolactona) fué realizado por ElShaboury [37].

Las propiedades valoradas en tabletas fueron: uniformidad de contenido, dureza, friabilidad, tiempo de desintegración y disolución.

Los resultados mostraron que tabletas conteniendo cerca de 60% de β -ciclodextrina, cumplieron con los requerimientos farmacopeicos de tal forma que un buen grado de uniformidad de peso y contenido fueron logrados para todas las formulaciones.

Además de que la velocidad de disolución de los fármacos seleccionados fué mejorada alrededor de 6-10 veces por la presencia de β -ciclodextrina en las formulaciones.

Tales resultados indican que β -ciclodextrina puede ser un útil vehículo de compresión directa para preparar tabletas con buenas características de disolución, lo cual a su vez puede mejorar la biodisponibilidad y estabilidad de fármacos [37].

Es importante señalar que de acuerdo a lo reportado por Nakai y col. la cristalinidad es un parámetro importante que contribuye a las características de una tableta que incluye ciclodextrinas [145]. Así como también el proceso de secado el cual es un paso crítico en la compresión directa de tabletas con β -ciclodextrina.[54]

7.1.6 Reducción de la Toxicidad.

La encapsulación molecular de un fármaco dentro de la cavidad hidrofóbica de las ciclodextrinas puede llevar a el descenso de la penetración de agentes dañinos a componentes, con lo cual se puede lograr un descenso en la toxicidad de un fármaco.

Afortunadamente la complejación con ciclodextrinas actúa como un acarreador de dispositivo para disminuir la toxicidad de un fármaco sin pérdidas drásticas de sus beneficios terapéuticos. Lo cual es principalmente atribuido a la disociación del complejo antes o después de alcanzar el sitio de acción [246].

Uekama y col. reportan que las ciclodextrinas también protegen los eritrocitos de los cambios morfológicos y subsecuentemente hemólisis inducida por varios fármacos perturbadores de membrana, dependiendo de la magnitud de la constante estabilidad del complejo (que depende de las constantes de disociación del complejo fármaco-ciclodextrina y eritrocitos-fármaco).

Se encontró que las ciclodextrinas inhiben la hemólisis causada por la clorpromazina y ácido flufenámico en el orden de β - γ - α -ciclodextrina, lo cual se atribuye a un descenso efectivo en la concentración del fármaco, antes de que alguna acción directa de las ciclodextrinas se presente sobre la membrana de eritrocitos [243].

Szejtli y col. afirman que polvos conteniendo ciclodextrinas como vehículos son muy estables, de tal forma que pueden ser empleados para el tratamiento de la irritación de la piel [224].

Está bien establecido que las ciclodextrinas reducen la potencia ulcerogénica de varios fármacos anti-inflamatorios ácidos. La ulceración en el estómago puede ser causada por una lenta disolución de los fármacos, lo cual proporciona altas concentraciones locales del fármaco; originando daño en la mucosa gástrica [38].

Para investigar el efecto de inclusión de β -ciclodextrina sobre la irritación en el estómago causada por Naproxen, el fármaco y su complejo (freeze-drying) fueron administrados a tres grupos de ocho ratas, en donde uno de los cuales permaneció como control. Al evaluar los daños macroscópicamente una significativa disminución en la toxicidad local de naproxén a nivel de tracto gastrointestinal fué observada [174].

7.1.7 Otros Usos.

Sunami reporta una formulación transdérmica de un gel con propiedades analgésicas incluyendo β -ciclodextrina [206].

Antitusivos y expectorantes conteniendo citrato de tipedina incluyen β -ciclodextrina en su formulación [112]. Kamikawa y col. reportan la formación de un compuesto de inclusión de vitamina K2 [90].

Pitha y col. informan con respecto a la formación de un complejo de testosterona- γ -ciclodextrina que permite la preparación de una forma farmacéutica adecuada para la administración sublingual de hormonas a humanos [181].

La intensidad de la fluorescencia de ácido α -naftiloxiacético en solución acuosa es altamente mejorada por la adición de γ -ciclodextrina, pero marcadamente realzada en la presencia de γ -ciclodextrina y ciclohexanol, mostrando a este último como un regulador de espacio con lo cual se reduce la cavidad de ciclodextrina para permitir la inclusión de fluoróforo [248].

Kawachi hace alusión a la formación de un complejo de inclusión con β -ciclodextrina y α -halocinamaldehídos como un microbicida en acción controlada. El producto limitó el desarrollo de *Staphylococcus aureus* sobre un medio de agar nutritivo.[98]

Las propiedades expuestas con anterioridad varían con el tipo de ciclodextrina y componente huésped y muy pocas de todas las funciones son impartidas al mismo tiempo, como se puede observar en la tabla XII.

TABLA XII. EJEMPLOS DE LOS EFECTOS DE LA COMPLEJACION DE FARMACOS POR CICLODEXTRINAS

FARMACO	INCREMENTO DE LA SOLUBILIDAD	REALCE DE LA DISOLUCION Y BIODISPONIBILIDAD	ESTABILIDAD	REDUCCION DE LA TOXICIDAD	REFERENCIA
Tolbutamida.	+	+			52,100
Menadiona.	+				47
Barbituratos.	+				84
Clorafencol.	+	+			184
Furosemida	+	+	+		94,96,210
Espirinolactona.	+	+			94,252,263
Testosterona.	+				180
Anfotericina-B.	+	+			250
Clobazam.	+				149
Naproxen.	+	+		+	38,171,175
Indometacina	+	+	+	+	57
Prostaglandina E1 y E2.	+	+	+		245,191
Acido Nalidixico.		+			20
Picotamida.		+			143
Ac. Salicilico.	+	+			254
Fenobarbital	+	+			254
Prednisona.	+	+			254
Ibuprofen.	+	+			254
Digoxina.		+	+		244,260
Digitoxina.		+	+		244,261
Acidos Grasos.			+		219
Aldehdos.			+		219
Vitamina D3.			+		34,219
Acetoaminofén.			+		117
Mydenton.			+		251
Grisseofulvin.	+				95
Benzodiazepinas.	+		+		101
Vitamina A.	+				93
Prostaciclín.	+				211,212
Ciclosporin.			+		91
Hidroclorotiazida.			+		84
Acido γ -Linoleico.			+		71
Acido Retinoico.			+		3
Iprilavon.	+				256

7.2 Ciclodextrinas en el Area de Alimentos.

Los elementos básicos de alimentos y bebidas son gusto, color, olor y textura. Recientemente sin embargo, la conservación, diversificación, conveniencia y tipo han sido observados como importantes debido a los cambios de condiciones y problemas de distribución para su consumo.

Los efectos positivos que se encuentra de las ciclodextrinas dentro de la industria alimentaria son: enmascaramiento de olores y sabores indeseables, higroscopicidad, para controlar la estabilidad de los aromas, en reacciones de separación de sustancias y en reacciones de bioconversión y fermentación [5].

Las funciones de ciclodextrinas son efectivas para el mejoramiento de estos factores. Cerca del 90% de las ciclodextrinas en Japón son consumidas en alimentos procesados durante los últimos diez años [5]. En Hungría está permitido su uso en alimentos. La Secretaría de Salud y Asistencia Pública en Japón se refiere a β -ciclodextrina como un aditivo natural de alimentos [176].

En 1986, el gobierno holandés, aprobó el uso de la β -ciclodextrina en cualquier producto alimenticio en el que los almidones modificados estén permitidos. El ejemplo holandés fué rápidamente seguido por bastantes países europeos y otros están en este momento considerando aplicaciones similares [5]. Los proyectos para la aprobación por la FDA están progresando, la tabla XIII nos muestra en que países está ya autorizado el uso de las ciclodextrinas en alimentos.

Tabla XIII. Uso Alimentario de las Ciclodextrinas.

País	Alimento (β -CD)
Japón	Aditivo natural
Hungría	Permitidas
Holanda	Almidón modificado
Bélgica	Almidón modificado
Luxemburgo	Almidón modificado
Franca	Permitidas
RFA	Almidón modificado
España	Permitidas
Gran Bretaña	Aplicación
Italia	Permitidas

7.2.1 Estabilización de Color y Sabor.

Muchas especies pueden ser incluidas fácilmente en ciclodextrinas para estabilizarse. Reineccius encapsula saborizantes artificiales con β -ciclodextrina, encontrando que la retención del saborizante se incrementa [186]. Por otra parte Zhang y col. muestran que β -ciclodextrina reduce la higroscopicidad de dulces [264].

Ahora bien existen informes de Juhaz y col. [86] con respecto a que la adición de ciclodextrinas mejoran las características de productos de carne, tales como adherencia, flexibilidad y mejoramiento del sabor de tal forma que una preparación de ciclodextrinas al 1% es adecuada.

La estabilización de materiales saborizantes por compuestos de inclusión ha sido evaluada con respecto a la volatilización por calentamiento, aceleración y estabilidad del tiempo de almacenaje, oxidación, estabilidad a la luz e higroscopicidad, de acuerdo a lo reportado por Szente y col. [215].

Por otra parte, vitaminas encapsuladas con ciclodextrinas son estables contra el tratamiento de calor y procesos de fermentación, siendo admisibles como aditivos de alimentos [114]. A través de una patente Ofuji [165] mostró que un material de arroz mezclado con ciclodextrinas, aceites, ácidos grasos y lecitina es gelatinizado incrementando marcadamente las cualidades organolépticas del arroz para la producción de galletas y otros alimentos basados en arroz.

Dentro de las aplicaciones reportadas, la expuesta por Susuki con respecto a alimentos conteniendo ciclodextrinas como antiolesterémicos nos pueden dar una idea del empleo que pueden tener las ciclodextrinas en el futuro [208].

7.2.2 Mejorando el Sabor y Olor.

Se ha visto que las ciclodextrinas son efectivas para reducir la amargura de ciertos alimentos, realzando el sabor de las mismas.

Yagi y col. [259] informan que ciclodextrinas controla el olor desagradable de algas marinas durante el procesado en alimentos, sin alterar su sabor natural. Sauraku, enuncia que el sabor amargo de endulzantes estenosidos es controlado por la formación de complejo de inclusión con γ -ciclodextrina [193]. Kasori afirma que las características de sabor y endulzante de glicirrina son marcadamente incrementadas con ciclodextrinas [99].

7.2.3 Aditivos de Polvo DSeco.

Las ciclodextrinas no solo incluyen varias especies de sabores y olores, sino también son adecuadas como un aditivo en polvo debido a su baja higroscopicidad.

En polvos como té y extractos de café es posible prevenir la evaporación de pequeñas cantidades de componentes de alta calidad, logrando con ello mejorar las propiedades e importancia de los productos [144].

Kotani enuncia que granulos de té instantáneo con una baja higroscopicidad y alta solubilidad son obtenidos al mezclar de 18-58% de ciclodextrina con extracto de té [110].

Al realizar la aromatización de té con saborizantes complejados con β -ciclodextrina (hierbabuena, jazmín y cinamón) mostraron que el empleo de dichos saborizantes mejoraron la estabilidad, tiempo de almacenado y valor sensitivo [215].

Ahora bien, el sabor de té empacado en pequeñas bolsas es enriquecido, si el material envolvente está impregnado con complejos de inclusión de ciclodextrina-saborizante [73].

Saborizantes de café sintético y natural fueron estabilizados con β -ciclodextrina. En contacto con agua el complejo con sustancias aromatizantes unidas fueron liberadas inmediatamente. La complejación con β -ciclodextrina de café tiene como ventajas: una formulación no higroscópica, reducción en la volatilidad y un largo tiempo de almacenaje con una insignificante pérdida de compuesto volátiles [213].

7.3 Uso de Ciclodextrinas en Cosmetología.

Un rápido desarrollo es esperado en el uso de ciclodextrinas en la manufactura de cosméticos y productos de tocador, para desarrollar funciones de emulsificación, aromatización y estabilidad.

La tabla XIV da algunos ejemplos, este campo muestra una versatilidad ilimitada sin alguna limitación toxicológica [218].

**Tabla XIV. Ejemplos de el Empleo de Ciclodextrinas en
Cosméticos y Artículos de Tocador.**

En Preparaciones Cosméticas.	Dentríficos Desodorantes Antisépticos. Bases Emulsificantes. Estabilización de J.Real. Tratamiento de Acné.
En Lavandería	Complejos o Fragancias en polvo Spray de Almidón.
Artículos de Tocador	En incienso Perfumes Sólidos. Preparaciones de Baño. En velas aromatizadas

El principal uso de ciclodextrinas en cosméticos es para la encapsulación molecular de fragancias, considerando que las ciclodextrinas no son higroscópicas y por ende pueden mejorar el aroma de las sustancias puras [224].

Fragancias y otros complejos de β -ciclodextrina pueden liberar su ingrediente activo en la presencia de agua caliente [176]. Chikahisa y col. [26] hacen alusión a que fragancias más duraderas son obtenidas por la formación de complejos con ciclodextrinas.

Un compuesto de inclusión perfume- β -ciclodextrina en forma de polvo es obtenido por el mezclado de perfume y ciclodextrina en la presencia de agua, surfactante y subsecuente secado de la mezcla, con lo cual se logra conservarlo por un largo período de tiempo [67].

El análisis de termogravimetría diferencial (DTA) es útil para mostrar los perfiles de fragancias complejadas con β -ciclodextrina (18), exhibiendo pronunciadas diferencias al compararse con mezclas físicas del mismo perfume y ciclodextrina.

La mayoría de los polvos especialmente en cosméticos contienen perfumes (tabla XV). La volatilidad y escasa estabilidad de las fragancias cuando son adicionadas a los polvos puede dar como resultado un tiempo de vida media limitado.

Cosméticos comercialmente adecuados en forma de polvo para liberar sus fragancias en un rango de temperatura de 60° a 80°C (67). Bajo condiciones usuales de almacenamiento, la complejación de perfumes con ciclodextrinas logra una buena estabilidad (218).

Tabla XV. Contenido de fragancia de Algunos Complejos de β -ciclodextrina usados en Cosméticos en Polvo.

Fragancia Complejada	% Contenido de Fragancia en Complejo de β -ciclodextrina (peso/peso).
Acite de Lavanda	9.2
Acite de Salvia	10.5
Aceite de Pino	9.0
Colorete Savon*	7.0
Fougere G-22*	7.1
Savon Fougere*	9.0
Savon Rose 08*	9.0
Lucida 78*	8.5
I-Mentol	12.0
Alcanfor	

*sustancias comerciales.

En aplicaciones para cosméticos Szejtli y col. enuncian que el reemplazo total o parcial de almidón por β -ciclodextrina o complejos de fragancias- β -ciclodextrina aparentemente da claras ventajas en preparaciones para la piel tales como talcos. Las fragancias complejadas fueron estables a pérdidas por volatilización, descomposición y oxidación por un largo tiempo. Además de que los complejos de β -ciclodextrina no fueron un medio adecuado para el desarrollo de microorganismos, mejorando así la eficacia antimicrobiana de talcos en polvo (222).

Oishi y col. (170) informan que tintes para cabello en forma de polvo conteniendo un colorante complejado con ciclodextrinas, tiene una mayor vida de almacenamiento y firmeza en el color que aquellas de tintes convencionales,

además de mostrar facilidad en el control de su manufactura, almacenado y transporte.

Deura y col. (29) al igual que Matsuda y col. (132) enuncian la obtención de cosméticos para la piel conteniendo complejos de inclusión de componentes escasamente solubles en agua y ciclodextrinas.

Una loción humectante conteniendo compuestos de inclusión con parabenos escasamente solubles (o alcanfor ó mentol) e hidroxipropil- β -ciclodextrina mostró una buena estabilidad [131]. Al igual que una emulsión con buenas propiedades cosméticas, la cual fué estable durante 2 meses a 40°C de acuerdo a lo expuesto por Masuda [128].

Asimismo, un cosmético conteniendo un producto de inclusión de un componente escasamente soluble en agua (vgr: aceites, grasas y ácidos grasos de alto peso molecular) con ciclodextrinas hidroxialquiladas, presentó un alto grado de seguridad, solubilidad, estabilidad y es efectivo para prevenir la resequedad de la piel (130).

Existen informes sobre lociones de baño conteniendo compuestos de inclusión estables de productos de leche con ciclodextrinas (199), así como también la preparación de cosméticos nutritivos para la piel con vitaminas estabilizadas por la presencia de ciclodextrinas (200).

También hay patentes para jabones de tocador en donde las fragancias y pigmentos son estabilizados por la formación de compuestos de inclusión con ciclodextrinas (232).

Ogino e Hirata enuncian la preparación de shampoo líquido conteniendo mentol y β -ciclodextrina, en donde la adición de esta última es para enmascarar el desagradable olor de mentol (167). También hacen mención de que una refrescante sensación es obtenida después de su aplicación (168).

Un excelente acondicionador para el cabello es obtenido al mezclar ácido lánsico con β -ciclodextrina (162).

Iwao, hace referencia a el empleo de ciclodextrinas para inhibir el olor desagradable de un polímero catiónico que constituye un shampoo para el cabello (79).

Yagi y col, informan que una crema limpiadora conteniendo ciclodextrinas parcialmente metiladas en combinación con aceites que se emplean como sustitutos de surfactantes, los cuales frecuentemente causan irritación en la piel (258). Por otra parte Watanabe reporta la producción de limpiadores conteniendo un compuesto de inclusión de esqualeno-ciclodextrina (255).

Limpiadores en forma de polvo, conteniendo compuestos de inclusión aceite-ciclodextrina, compuestos medicinales (polvos de Aloe seco) y caseína muestran una buena acción limpiadora (231).

7.4 Ciclodextrinas en Agroquímica.

En agroquímica el uso de ciclodextrinas es el de mejorar la estabilidad y la liberación controlada, reducción de toxicidad, inhibiendo el enmascaramiento,

mejorando la solubilización y emulsificación de agroquímicos insolubles en agua (144).

Allerthin y piretroides naturales como componente principal de insecticidas, son excelentes agroquímicos de alta seguridad, pero son inferiores en estabilidad e involucran dificultad en cuanto a liberación controlada ya que se presenta en forma de emulsión. Sin embargo, por inclusión con ciclodextrinas pueden convertirse en polvo estable y mejorar su liberación controlada (fig. 46). (144, 190).

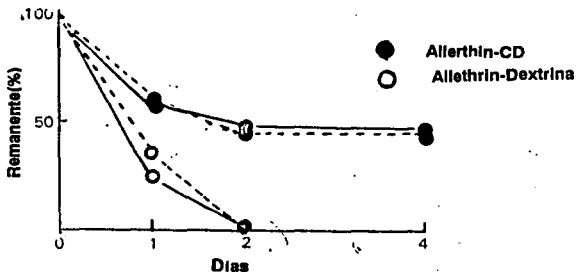


Fig. 46 Fotodescomposición de Allerthin.

Szejtli, reporta la complejación de pesticidas sintéticos (herbicidas, insecticidas, fungicidas, etc.) con ciclodextrinas y los efectos ventajosos sobre sus propiedades, por ejemplo hidrofobicidad, volatibilidad, compatibilidad y biodisponibilidad (220).

Nakamura y col (155), reportan que pesticidas conteniendo ciclodextrinas aumentan su solubilidad en cerca de un 10%, de igual forma, Salithion útil como

Insecticida fué estabilizado por la formación de un compuesto de inclusión con β -ciclodextrina (205).

Furakazawa y col, Informan sobre la formación de bactericidas constituidos de complejos de hinokitol-ciclodextrina (50). Con respecto a insecticidas de liberación controlada, existen los reportes de Toth y col., Chikahisa & Cho (25, 236).

Ahora bien Shibanaí, a través de una patente expone un método de manufactura de papel conteniendo sustancias insecticidas, inhibidores de moho, fungicidas y bactericidas para formar compuestos de inclusión con ciclodextrinas e incrementar el tiempo de retención de los agentes en el papel (198).

7.5 Diversos Usos de Ciclodextrinas en la Industria Química.

7.5.1 Biotecnología.

Szejtli reporta que las ciclodextrinas se usan en la conversión de esteroides microbianos, producción de vacunas, hidrólisis de glicéridos, cultivos de tejido y en tratamiento de aguas negras. Por lo cual están consideradas como bio-materiales importantes en la actualidad [221,223].

7.5.2 Cromatografía y Purificación.

Tsukahara comunica en una patente que un filtro para deodorizar el aire está constituido por una resina sintética y β -ciclodextrina (239).

Por otra parte la complejación con ciclodextrinas tiene una aplicación adicional en cromatografía, y ha sido descrita por Krysl-Smolkava (111).

Separaciones selectivas por cromatografía también han sido descritas (102, 108).

Las ciclodextrinas pueden ser empleadas como fase móvil o fase estacionaria, dentro del campo de la cromatografía de inclusión.

La introducción hecha por Armstrong de la fase estacionaria, ahora llamada "Ciclobond" esta teniendo un considerable impacto ya que esto añade una nueva dimensión -el fenómeno de inclusión molecular- a la cromatografía de absorción (202).

7.5.3 Separación de Isómeros.

Hay un gran número de ejemplos en que la complejación con ciclodextrinas puede ser usada para separar compuestos de estructura molecular semejante, así como en la producción selectiva fungiendo como catalizador (107).

Uekama y col. Informan que tanto α - como β -ciclodextrina incrementaron la velocidad de isomerización de prostaglandinas del tipo A en condiciones alcalinas, donde el efecto catalizador de α -ciclodextrina fué diferente al de β -ciclodextrina, lo cual se asocia a una diferencia de entalpía (241).

Sato y Susuki desarrollaron un método de resolución óptica de fármacos racémicos por una combinación de complejación con ciclodextrina y una subsecuente cromatografía en gel, obteniendo una pureza óptica de los enantiómeros de warfarina y ácido mandélico de 40% y 30% respectivamente (194).

VIII

DISCUSION Y CONCLUSIONES

De acuerdo con la investigación bibliográfica realizada, se puede apreciar que las ciclodextrinas se han consolidado como uno de los principales recursos de interés técnico para numerosas industrias.

Sin embargo, es importante hacer notar que fué necesario que transcurriera un amplio periodo de tiempo, para llevar a cabo el empleo práctico de las ciclodextrinas, el cual estuvo restringido debido a diversas razones tales como: la falta de un proceso de producción a escala industrial y por ende elevados costos de las mismas, así como el apoyo de estudios de metabolismo y toxicidad detallados.

Con respecto a la producción de ciclodextrinas, es pertinente señalar que aún cuando existen testimonios de síntesis químicas de las mismas, a nivel industrial siguen siendo producidas solo por la conversión enzimática del almidón utilizando la enzima ciclodextringlicosil-transferasa (CGT).

Debido a que la enzima (CGT) es de primordial importancia en la producción de ciclodextrinas, se han encontrado diversos microorganismos que tienen la habilidad de producirla, como se citó oportunamente.

Las enzimas de dos variedades de una especie son las que principalmente se utilizan para la producción industrial de ciclodextrinas, me refiero a *Bacillus macerans* y *Bacillus alcalófilos* No. 38-2.

Los microorganismos del género *Bacillus* son grandes bastones grampositivos caracterizados por encontrarse en muchas muestras de suelo y agua. Por lo cual muchas de sus propiedades se atribuyen a su necesidad de sobrevivir en las condiciones adversas presentes en su hábitat natural.

La cantidad de ciclodextrinas formadas es manipulada en los procesos industriales por la continua eliminación de la ciclodextrina deseada a través de la formación de un complejo específico insoluble ó por diálisis [218].

Actualmente β -ciclodextrina esta siendo producida en escala industrial por 4 compañías en Japón, 2 en Francia, 1 en Hungría y 1 en E.U.A. En Finlandia, Brasil, Corea del Norte y Corea del Sur han sido reportados laboratorios a escala para la producción de ciclodextrinas.

Ahora bien, cuando en 1957 se publicó que las ciclodextrinas administradas oralmente fueron altamente tóxicas, extensivos estudios de metabolismo y toxicidad detallados fueron emprendidos para clarificar tal hecho.

Como consecuencia de tales estudios, hoy en día se sabe que administradas oralmente las ciclodextrinas son inofensivas, ya que cantidades insignificantes son absorbidas intactas a través de la región intestinal y la mayor cantidad de ciclodextrinas es metabolizada por la microflora del colon.

Cuando son administradas parenteralmente las ciclodextrinas pueden causar una severa nefrotoxicidad, así como también cambios en la forma y hemólisis de eritrocitos humanos.

Desde un punto de vista de seguridad, la administración parenteral de una gran dosis de ciclodextrinas, debe estar totalmente restringida para α - y β -ciclodextrinas. Y en caso de ser indispensable el uso de alguna ciclodextrina dentro de una formulación, solo podría considerarse γ -ciclodextrina por ser la más soluble y por ende la menos tóxica. En esto no consideramos los derivados por no ser parte de esta investigación.

En relación a los métodos de separación y análisis de ciclodextrinas pertinentemente expuestos, se puede concluir que los métodos cromatográficos son los que mejor cumplen con dicho objetivo. Siendo la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) el más recomendado por la rápida y exacta determinación de ciclodextrinas en un corto lapso de tiempo (10-15 min).

En caso de no contar con el equipo adecuado de HPLC, también es recomendable una cromatografía de capa fina ó en su defecto se puede recurrir a los métodos fotométricos, los cuales son rápidos de realizar pero presentan el inconveniente de no ser específicos, puesto que un incremento en la concentración de ciclodextrina, así como la presencia de otra sustancia en solución interfieren en los resultados.

En virtud de que la Encapsulación Molecular puede ocurrir tanto en medio sólido como en solución y las propiedades de las moléculas huésped son modificadas por la complejación con ciclodextrinas, tales alteraciones pueden ser detectadas por diversos métodos (remítese a 6.6).

Con el conocimiento de las diversas formas para preparar complejos de inclusión, considero que el mejor método para obtenerlos en estado sólido es el

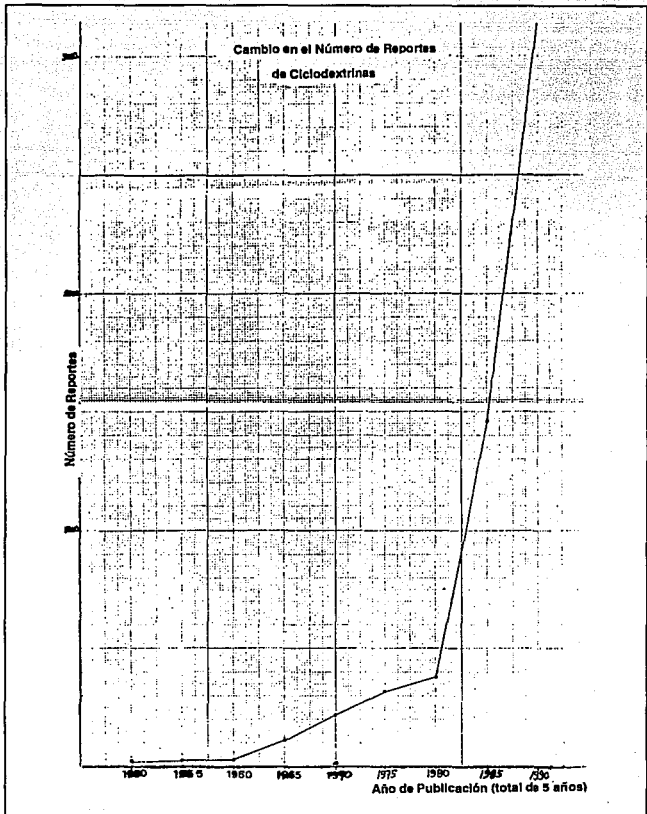
Secado por Congelamiento (Freeze-Drying), puesto que los complejos se obtienen en una forma amorfa y esto presenta ventajas en la solubilidad y por consiguiente en la biodisponibilidad. Es importante hacer mención de que el método de amasijo, es muy útil para la preparación de complejos de inclusión de sustancias escasamente solubles en agua.

El complejo fármaco-ciclodextrina generalmente es formado fuera del cuerpo y después de la administración este se disocia, liberando el fármaco dentro del organismo en una forma rápida y uniforme.

Las ciclodextrinas que han sido sucesivamente utilizadas para mejorar varias propiedades de fármacos, tales como solubilidad, disolución y velocidad de liberación, estabilidad, biodisponibilidad. En adición el realce de la actividad de fármacos, transferencia selectiva o la reducción de efectos colaterales han sido logrados por medio de la complejación de inclusión.

El incremento en el número de reportes tecnológicos de ciclodextrinas registrados en el Chemical Abstracts hasta 1992 se muestra en la figura 47. Los reportes sobre ciclodextrinas se incrementaron rápidamente de 1965-1970, sobre todo por que se encontró que eran inofensivas por vía oral y en aplicaciones tópicas, lo que daba a las Industrias Farmacéutica, Alimenticia y Cosmética un recurso nuevo renovable y con grandes posibilidades de mejoramiento, independientemente del grandísimo campo de aplicaciones comerciales que se encontraban en ese momento y a futuro.

En el periodo de 1980-1985 se registraron cerca de 80 documentos relacionados a aplicaciones de ciclodextrinas por año. Hacia fines de 1986 cerca



de 750 publicaciones concernientes a aplicaciones de ciclodextrinas fueron publicadas. Y el número de documentos científicos, patentes, libros, lecturas en conferencias en 1987 fué superior de 400.

El mercado mundial para β -ciclodextrina ya sea cristalina y en conversión mixta fué de 1 millón de kgs. en 1990, el precio de la ciclodextrina cristalina dependiendo de la calidad y el productor es de 7-25 dólares por kg.

En el caso de α -ciclodextrina su demanda es pequeña y en 1990 la cantidad comercializada fué probablemente de 3000 kgs a un costo de 16-24 dólares por kg. Para γ -ciclodextrina el costo es de 200-1200 dólares por kg, siendo con esto la más cara de las ciclodextrinas naturales. Sin embargo, si existe un incremento en la demanda de γ -ciclodextrina probablemente exista un descenso en el precio.

Finalmente, debo agregar que en base a la investigación realizada, se puede concluir que salvo la vía de administración que es recomendable sea sólo oral o tópica por la nefrotoxicidad que puede causar no hay barreras para la aplicación práctica de las ciclodextrinas, en diversas industrias de tal forma que un futuro no muy lejano serán consideradas como materiales básicos para la elaboración de fármacos, alimentos, cosméticos entre otros.

IX

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aboutaleb, A.E.; Rahman, A.A.A. and Ismail, S. Studies of cyclodextrin inclusion complexes: I.- Inclusion complexes between α - and β -cyclodextrins and chloramphenicol in aqueous solutions. Drug Development and Industrial Pharmacy., 12 (11-13), 2259-2279. (1986)
- 2.- Allenza Paul and Morrell, J. Marie. Cyclodextrin glycosyltransferases resembling the Bacillus enzyme from novel bacteria. Chemical Abstracts., 133(13), 332, (1990).
- 3.- Amdidouche, D.; Darronzet, H.; Duchene, D. and Poelman, M.C. Molecular encapsulation of retinoic acid by β -cyclodextrin, characterization of the inclusion compound. Chemical Abstracts., 112 (8), 415 (1990).
- 4.- Andersen, G.H.; Robbins, F.M.; Dominguez, F.J.; Moores, R.G. and Long, C.L. The utilization of Schardinger Dextrins by the rat. Toxicology and Applied Pharmacology 5, 257,266 (1963).
- 5.- Anguita Alegret, G. Interés de las ciclodextrinas en el sector alimentario. Alimentaria. Revista de tecnología e Higiene de los Alimentos., 214 (90) Julio/Agosto, 43-49 (1990).
- 6.- Aoki, H.; Yao, D. and Misawa, M. Production and characterization of a thermoestable bacterial cyclodextrin glicosyltransferase. Chemical Abstracts., 108(19) 299 (1988).
- 7.- Aoki, H.; Yu, E.K.Ch. and Misawa, M. Novel cyclodextrin glycosyltransferase and its use in manufacturing cyclodextrin. Chemical Abstracts., 111(39), 502 (1989).
- 8.- Bekers, O.; Uijtendaal E.V.; Beijnen, J.H.; Bult, A. and Underberg, W.J.M. Cyclodextrins in the Pharmaceutical Field. Drug Development and Industrial Pharmacy., 17(11), 1503-1549, (1991).
- 9.- Bender Hans. Cyclodextrin glycosyltransferase from Klebsella pneumoniae M5 al and Bacillus macerans: (Quantitative analysis by high-performance liquid chromatography of the (1-4) α -D-glucopyranosyl transfer products from some linear and cyclic substrates). Carbohydrate Research., 117, 1-11, (1983).

- 10.- Berthold, A.; Jim, H.L. and Armstrong, D.W. Purification of cyclodextrins with fiber hollow. *Chemical Abstracts.*, 114(5), 625 (1991).
- 11.- Boger, Joshua Schafer. Cyclodextrin Chemistry. Part. I. Symmetrically substituted α -cyclodextrins as enzyme models. Part. II. Selective modification of α - and β -cyclodextrins. *Dissertation Abstracts Internacionnal B.* 715-B (1979).
- 12.- Bootsma, H.P.R.; Frijlink, H.W.; Eissens, A.; Proost, J.H.; Van Doorne, H. and Lerk, C.F. β -cyclodextrin as an excipient in solid oral dosage forms: in vitro and in vivo evaluation of spray-dried diazepam- β -cyclodextrin products. *International Journal of Pharmaceutics.*, 51, 213-223 (1989).
- 13.- Brewster, M.E.; Simpkins, J.W.; Hara, M.S.; Stern, W.C. and Bodor, N. The potential use of cyclodextrins in parenteral formulations. *Journal of Parenteral Science and Technology.*, 43(5), 231-240 (1989).
- 14.- Brewster, M.E.; Estes, K.S. and Bodor, N. Development of a non-surfactant formulation for alfaxalone through the use of chemically modified cyclodextrins. *Journal of Parenteral Science and Technology.*, 43(6) November-December 202-205 (1989).
- 15.- Brewster, M.E.; Anderson, W.R.; Estes, K.S. and Bodor, N. Development of aqueous parenteral formulations for carbamazepine through the use of cyclodextrins. *Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 80 (49) 380-383 (1991).
- 16.- Brewster, M.E.; Loftsson, T.; Baldvinsdóttir, J. and Bodor, N. Stabilization of aspartame by cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 75, R5-R8 (1991).
- 17.- Brunt, K. Rapid separation of linear and cyclic glucooligosaccharides on a cation-exchange resin using a calcium ethylenediaminetetraacetate solution as eluente. *Journal of Chromatography* 246, 146-151. (1982).
- 18.- Buschman, H.J.; Knittel, D. and Schollmeyer, E. α -cyclodextrin as a perfume oil complexing agent. *Chemical Abstracts.* 116 (6) 294 (1992).
- 19.- Celebi, N. and Nagai, T. Improvement of dissolution characteristics of piroxicam acid by dimethyl- β -cyclodextrin complexation. *Drug Development and Industrial Pharmacy.* 14(1), 63-75 (1988).

- 20.- Celebi, N. and Nagain, T. Enhancement of dissolution properties of nalidixic acid from ground mixture with gamma-cyclodextrin. *Chemical Abstracts.*, 108(18)386(1988).
- 21.- Clarke, R.J.; Coates, H.J. and Lincoln, S.F. Inclusion complexes of the cyclomalto-oligosaccharides (cyclodextrins). *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.*, Vol. 46 205-249 (1988).
- 22.- Cramer, F. and Henglein, F. Einschlussverbindungen der cyclodextrine mit gassen.. *Angewandte Chemistry.*, 68, 649 (1956).
- 23.- Cramer, F.; Saenger, W. and Spatz, H-Ch. Inclusion compounds. XIX. The formation of inclusion compounds of α -cyclodextrin in aqueous solutions. thermodynamics and kinetics. *Journal of the American Chemical Society.*, 89, 14-20 (1967).
- 24.- Chen, H.P.; Yang, Ch.P. and Marmerellis, V.Z. Kinetic study on the production of cyclodextrin: analysis of initial rate inhibitory effect of glucose and degradation. *Chemical Abstracts.*, 112 (7) 326 (1990).
- 25.- Chikahisa, N. and Cho, S. Insect control by spraying a mixture of insecticide-inclusion compounds. *Chemical Abstracts.*, 109(25) 294 (1988).
- 26.- Chikahisa, N. and Cho, S. Pefurme-containing thermosetting resin moldings. *Chemical Abstracts.*, 112(16) 79 (1990).
- 27.- Chin, Chihwei P. Cyclodextrins: 4. Effect of sodium lauryl sulfate (SDS) on the yield of cyclodextrins from starches. *Chemical Abstracts.*, 109(1) 503 (1988).
- 28.- De Ponti, R.; Torricelli, C.; Motta, A. and Crivellente, M. Use of a Polarographic method, a U.V. method and the Phase solubility technique to determine the stability constant in aqueous solution of α - β -cyclodextrin complex with a new immunomodulating agent. *Europea Journal of Pharmacy and Bhiopharmacy.*, 37(2) 106-109 (1991).
- 29.- Deura, Hiroshi. Cosmetics containing cyclodextrin inclusion compounds. *Chemical Abstracts.*, 100 (8) 356 (1987).
- 30.- Dou, Y.; Lin, D.J. and Cui, H. A method of quantitative test on cyclodextrins by papel chromatography and measuring spots. *Chemical abstracts.*, 109(11)(1988).

- 31.- Duchêne, D.; Debruères, Brétilon, A. Les cyclodextrines nature, origine et intérêt en pharmacie galénique. *Labo-Pharma-Problemes et Techniques.*, 32(348), 842-850 (1984).
- 32.- Duchêne, D.; Vaution, C. and Glomot, F. Cyclodextrins, their value in Pharmaceutical Technology. *Drug Development and Industrial Pharmacy.*, 12 (11-13), 2183-2218 (1986).
- 33.- Duchêne, D. and Wouessidjewe. Pharmaceutical Uses of cyclodextrins and derivatives, *Drug Development and Industrial Pharmacy.*, 16(17), 2187-2400 (1990).
- 34.- Duchêne, D. and Wouessidjewe, D. The current State of β -cyclodextrin in Pharmaceutics, *Acta Pharmaceutica Technologica.*, 36(1), 1-6 (1990).
- 35.- Duchêne, D. and Wouessidjewe, D. Physicochemical Characteristics and Pharmaceutical uses of Cyclodextrin derivatives, Part. I. *Pharmaceutical Technology.*, 14(0), (1990).
- 36.- Duchêne, D. and Wouessidjewe, D. Physicochemical characteristics and pharmaceutical uses of cyclodextrin derivatives, Part II. *Pharmaceutical Technology.*, 14(8), (1990).
- 37.- ElShaboury, M. S. Physical properties and dissolution profiles of tablets directly compressed with β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics.*, 63, 95-100 (1990).
- 38.- Erden, N. and Celebi, N. A. study of the inclusion complex of naproxen with β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics.*, 48, 83-89 (1989).
- 39.- Eumaji, K.; Yamaguchi, H. and Eto, S. Water-soluble antioxidants, *Chemical Abstracts.*, 104(26), 45 (1986).
- 40.- Fenyvesi, E.; Shirakura, O.; Szejtli, J. and Nagai, T. Properties of cyclodextrin polymers as a tableting aid. *Chemical Pharmaceutical Bulletin.*, 32(2), 955-963 (1984).
- 41.- Frank, D.W.; Gray, J.E. and Weaver, R.W. Cyclodextrin receptors in the rat. *American Journal of Pathology.*, 83, 367-374 (1975).
- 42.- French, Dorcas. *The Schardinger Derivatives. Advances in Carbohydrate Chemistry*, 10A, 12. Academic Press, New York, 139-250 (1957).

- 43.- Frijlink, H.W.; Eijsens, A.C.; Hoogstra, N.S.; Wessing, R.; Leek, C.F. and Abt-De, D.K.F. The effect of parenterally administered cyclodextrins on cholesterol levels in the rat. *Pharmaceutical Research*, 8(1), 9-16 (1991).
- 44.- Frijlink, H.W.; Franssen, R.J.F.; Eijsens, A.C.; Grooting, R.; Leek, C.F. and Abt-De, D.K.F. The effects of cyclodextrins on the disposition of nitrobenzyl-¹⁴C-cholesterol in the rat. *Pharmaceutical Research*, 8(3), 390-394 (1991).
- 45.- Frijlink, H.W.; Eijsens, A.C.; Schouwen, A.J.M. and Leek, C.F. The effects of cyclodextrins on drug release from fatty suppository bases I: in vitro studies. *Eur. Journal. Pharm. Biopharm.*, 37(3) 170-192 (1991).
- 46.- Froemming, Karl Heinz. Cyclodextrin in Pharmaceutical Industry. *Chemical Abstracts*, 97(22) 374 (1982).
- 47.- Froemming, K.H.; Norwing, J. and Mehnert, Menalons inclusion compounds with mixtures of natural cyclodextrins. *Chemical Abstracts*, 112(04) 419 (1981).
- 48.- Fujitaka, K.; Kurosaki, Y.; Sato, S.; Hojima, Y. and Tamahara, Y. Hydrophobic-catalytic study of inclusion complexes. I. Fluorimetric determination of the stability constant of cyclodextrins by ion exchange chromatography. *J. Chromatography*, 112(1) 149-155 (1983).
- 49.- Fujita, K.; Ishigami, H.; Hara, Y.; Tamahara, Y. and Sato, S. Separation and stability study of cyclodextrins by ion exchange chromatography. *J. Chromatography*, 112(1) 155-155 (1983).
- 50.- Furukawa, K.; Kikawa, S. and Sato, M. Synthesis of cyclodextrin derivatives. *Chemical Abstracts*, 106(9) 944 (1986).
- 51.- Gale, P.E. Characterization of cyclodextrin inclusion complexes by gel permeation chromatography. *Abstracts International*, 30, 9, 344-35 (1985).
- 52.- Gale, P.E. and Kawan, K. Cyclodextrin inclusion complexes and their applications in pharmaceuticals. *Pharmaceutical Research*, 10(5), 357-366 (1993).
- 53.- Garg, J.; Bhargava, S. and Singh, S. Synthesis and characterization of cyclodextrin derivatives. *Abstracts International*, 30(9) 355 (1985).

- 54.- Giordano, F.; Gazzaniga, A.; Bettinetti, G.P. and A.L.M. The influence of water content on the binding capacity of B-cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics.*, 62, 153-156 (1990).
- 55.- Giordano, F.; Pavan, M.; Yan, X.; La Manna, A. and Bettinetti, G.P. On the inclusion evidence of drugs with cyclodextrins by microcalorimetry. *Chemical Abstracts.*, 112(18), 416 (1990).
- 56.- Hall, E.S. and Ache, H.J. Study of the forces responsible for binding of polar substrates in the cyclohexaamylose cavity by positron annihilation techniques. *The Journal of Physical Chemistry.*, 83(14), 1805-1807. (1979).
- 57.- Hamada, Y.; Nambu, N. and Nagai, T. Interactions of α - and β -cyclodextrin with several non-steroidal antiinflammatory drugs in aqueous solution. *Chemical Pharmaceutical Bulletin.*, 23, 1205-1211 (1975).
- 58.- Harada, A. and Takahashi, S. Preparation and properties of cyclodextrin-ferrocene inclusion complexes. *Journal of Chemical Society Chemical Communications.*, 645-646 (1984).
- 59.- Harata, Kazuaki. Crystal structure of γ -cyclodextrin at room temperature. *Chemistry Letters* 4, 641-644 (1984).
- 60.- Hardec, G.E.; Otagiri, M. and Perrin, J.A. Microcalorimetric investigations of pharmaceutical complexes. I. Drugs and β -cyclodextrin. *Acta Pharmaceutica Suecica.* 15(3), 188-199 (1978).
- 61.- Hashimoto, H.; Hara, K.; Kuwabara, H.; Mikuni, H.; Ishigami, H.; Jaiunuma, K. and Kobayashi, S. α -Rich cyclodextrin manufacture. *Chemical Abstracts.*, 104(7), 432 (1986).
- 62.- Hashimoto, H., Hara, K.; Kuwabara, N. and Arakawa, K. Industrial Production of Cyclodextrins. I. Effective conditions on cyclodextrin preparation. *Chemical Abstracts.*, 105(8), 116 (1986).
- 63.- Hashimoto, H.; Hara, K.; Kuwabara, N.; Sakai, S. and Yamamoto, N. Industrial Production of cyclodextrins. VI. The continuous reaction of cyclodextrins formation by the column method using the immobilized enzyme on ion exchanger resins. *Chemical Abstracts.*, 105(10) 122 (1986).

- 64.- Hashimoto, H.; Hara, K. and Kuwabara, N. Industrial Production of Cyclodextrins. IV Fractionation of cyclodextrins and other dextrans using the ultrafiltration membrane. *Chemical Abstracts.*, 105(10), 122 (1986).
- 65.- Hashimoto, H.; Kuwabara, N. and Ito, Industrial Production of Cyclodextrins. V. Continuous production of cyclodextrins using the ultrafiltration membrane reactor. *Chemical Abstracts.*, 105 (10) 122 (1986).
- 66.- Hashimoto, K.; Shirai, Y.; Adachi, S. and Horie, M. Effect of the content of divinylbenzene in Ion-exchange resins on the chromatographic separation of α -cyclodextrine and glucose. *Journal of Chromatography.*, 448, 241-248, (1988).
- 67.- Hattori, T.; Ogura, S.; Fujeda, T. and Ymamura, Y. Manufacture of perfume-inclusion compound powders. *Chemical Abstracts.*, 114 (4), 375 (1991).
- 68.- Hedge, R. Studies of the formulation of pharmaceutical products containing cyclodextrins. *Dissertation Abstracts International B.*, 47 (5), 1998-B (1986).
- 69.- Heredia, A.; Requena, G. and Garcia Sanchez, F. An approach for the estimation of the polarity of the β -cyclodextrin internal cavity. *Journal of Chemical Society Chemical Communications.*, 1814-1815 (1985).
- 70.- Hersey, A.; Robinson, B.H. and Kelly, H.C. Mechanism of Inclusion-compound formation for binding of organic dyes, ions and surfactants to α -cyclodextrin studied by kinetic methods based on competition experiments. *Journal of Chemical Society of Faraday Trans I.*, 82, 1271-1287 (1986).
- 71.- Hibino, T.; Nakao, K.; Okada, T. and Sahashi, H. Stabilization of γ -linoleic acid by forming its inclusion compounds with cyclodextrins. *Chemical Abstracts.*, 108 (22), 392 (1988).
- 72.- Hokse, H. Analysis of cyclodextrins by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography.*, 1989, 98-100 (1980).
- 73.- Holobradi, B.; Kall, G. and Meszaros, B. Flavoring agents for tea bags. *Chemical Abstracts.*, 107 (1), 561 (1987).
- 74.- Horikoshi, Koki. Production and Industrial Application of β -cyclodextrin. *Process Biochemistry* 14(5), 26-30 (1979).

- 75.- Horikoshi, K. and Leo, T. Microbial production of γ -cyclodextrin synthetase and its use in manufacture of γ -cyclodextrin. *Chemical Abstracts.*, 107 (7), 603 (1987).
- 76.- Ichimaru, Farukosu, K.K. Preparation of water soluble oryzanol. *Chemical Abstracts.*, 104 (8), 365 (1986).
- 77.- Ikeda, Tohka Industry Co., Ltd. Production of heat-resistant cyclodextrin glycosyltransferase. *Chemical Abstracts.*, 104 (1), 428 (1986).
- 78.- Irie, T.; Tsunenari, Y.; Uekama, K. and Pitha, J. Effect of bile on the intestinal absorption of α -cyclodextrin in rats. *International Journal of Pharmaceutics.*, 43, 41-44 (1988).
- 79.- Iwao, S. and Kuwana, H. Hair-cosmetic composition containing a cationic polymer and a cyclodextrin for inhibition of perm odor. *Chemical Abstracts.*, 108 (10), 422 (1988).
- 80.- Iwao, J.; Iso, T.; Uemura, O. and Kawashima, Y. Aqueous pharmaceuticals containing cationic surfactants and cyclodextrins. *Chemical Abstracts.*, 112 (6), 445, (1990).
- 81.- Japan Malze Products, Co., Ltd. Promotion of cyclodextrin production *Chemical Abstracts.*, 101 (3), 484 (1984).
- 82.- Jeang, Chilling and Sung, Hsienyl. Study on the production of cyclodextrins. The relation between enzyme, substrate and production. *Chemical Abstracts.*, 113 (21), 578 (1990).
- 83.- Jones, S.P.; Grant, D.J.W.; Hadgraft, J. and Parr, G.D. Cyclodextrins in the Pharmaceutical Sciences. Part I: Preparation, Structure and properties of cyclodextrins and cyclodextrin inclusion compounds. *Acta Pharmaceutica Technologica.*, 30 (3), 213-223 (1984).
- 84.- Jones, S.P.; Grant, D.J.W.; Hadgraft, J. and Parr, G.D. Cyclodextrins in the Pharmaceutical Sciences. Part II: Pharmaceutical, biopharmaceutical, biological and analytical aspects, and applications of cyclodextrin and its inclusion compound. *Acta Pharmaceutica Technologica.*, 30 (4), 263-277 (1984).
- 85.- Jozwiakowski, M.J. and Connors, K.A. Aqueous solubility behavior of three cyclodextrins. *Carbohydrate Research.*, 143, 51-59 (1985).

- 86.- Juhász, A.; Salgó, A. and Székli, M. Improving the consistency of meat products with cyclodextrin. *Chemical Abstracts.*, 107 (15) 618 (1987).
- 87.- Kagawa, M.; Shinoda, M. and Ikeda, G. Cyclodextrins in bitterness removal from plant-fungus extract. *Chemical Abstracts.*, 104 (7) 440 (1980).
- 88.- Kainuma, K.; Nogami, A. and Mercier, Ch. Gel permeation chromatography of maltosaccharides on polyacrylamide gel. *Journal of Chromatography.*, 131, 301-303, (1976).
- 89.- Kainuma, Keiji. *Starch Oligosaccharides: Theory, Synthesis and Cyclis.* *Starch Chemistry and Technology*, Second edition, Academic Press Inc., 143-160, (1984).
- 90.- Kamikawa, K.; Ueno, M. and Inoue, T. Vitamin B₁₂(120) dimethyl β -cyclodextrin inclusion compounds. *Chemical Abstracts.*, 108 (14) 873 (1987).
- 91.- Kanai, A.; Alba, R.M.; Takano, T.; Kobayashi, Ch.; Hokenjima, K.; Kurihara, B.; Yokoyama, T. and Fukami, M. The effect on the content of cyclosporin in eye drops of cyclosporin eye drops. *Chemical Abstracts.*, 111 (9), 375 (1988).
- 92.- Kaneko, T.; Yoshida, M.; Yamamoto, M.; Sakamoto, M. and Matsushita, R. Purification of cyclodextrins by *Spirulina maxima* (A Blue Green Alga) from Waste Water of Bacteria. *Chemical Abstracts.*, 115 (15) 1187 (1991).
- 93.- Karl-Hermann, P.; The, G. and Wolfgang, M. *Starch: Chemistry and Technology*, 2nd Edition, Wiley-Interscience, 1984, 270-271, 1984.
- 94.- Kato, M. and Kobayashi, G. Increasing the solubility of cyclodextrin in water. *Chemical Abstracts.*, 107 (15) 618 (1987).
- 95.- Kato, M. and Inoue, T. Increasing the solubility of cyclodextrin in water. *Chemical Abstracts.*, 107 (15) 618 (1987).
- 96.- Kato, M., Inoue, T. and Yamamoto, K. Purification of cyclodextrin from waste water of bacteria. *Chemical Abstracts.*, 111 (9) 375 (1988).
- 97.- Kato, M., Inoue, T. and Yamamoto, K. Purification of cyclodextrin from waste water of bacteria. *Chemical Abstracts.*, 111 (9) 375 (1988).

- 86.- Juhasz, A.; Salgo, A. and Szalai, M. Improving the consistency of meat products with cyclodextrin. *Chemical Abstracts.*, 107 (15), 615 (1987).
- 87.- Kagawa, M.; Shinoda, M. and Ikeda, G. Cyclodextrins in bitterness removal from plant-fungus extract. *Chemical Abstracts.*, 104 (7), 449 (1986).
- 88.- Kainuma, K.; Nogami, A. and Mercier, Ch. Gel permeation chromatography of maltosaccharides on polyacrylamide gel. *Journal of Chromatography*, 121, 361-369, (1976).
- 89.- Kainuma, Keiji, *Starch Oligosaccharides: linear, branched and cyclic. Starch: Chemistry and Technology*, Second edition, Academic Press Inc., 143-150, (1984).
- 90.- Kamikawa, K.; Ueno, M. and Isane, T. Vitamin K2(20)-dimethyl- β -cyclodextrin inclusion compounds. *Chemical Abstracts.*, 106 (14), 373 (1987).
- 91.- Kanai, A.; Alba, R.M.; Takano, T.; Kobayashi, C.; Nakajima, A.; Kurihara, K.; Yokoyama, T. and Fukami, M. The effect on the cornea of α -cyclodextrin vehicle for cyclosporin eye drops. *Chemical Abstracts.*, 111 (8), 379 (1989).
- 92.- Kaneko, T.; Yoshida, M.; Yamamoto, M.; Nakamura, N. and Horihoshi, K. Production of cyclodextrins by simultaneous actions of two CGTases from three strains of *Bacillus*. *Chemical Abstracts.*, 113 (15), 5 (1990).
- 93.- Karl-Heinz, F.; Till, G. and Wolfgang, M. Inclusion compound of β -cyclodextrin and vitamin A acetate. *Acta Pharmaceutica Technologica.*, 34(3), 152-155, (1988).
- 94.- Kata, M. and Kedvessy, G. Increasing the solubility characteristics of drugs with cyclodextrins. *Chemical Abstracts.*, 107(2), 348 (1987).
- 95.- Kata, M. and Tuske, B. Increasing the solubility characteristics of griseofulvin with γ -cyclodextrin. *Pharmazie.*, 43(1), 52-53 (1988).
- 96.- Kata, M.; Haragh, L. and Pintye-Hodi, K. Production and investigation of tablets containing furosemide and β -cyclodextrin *Chemical Abstracts.*, 112(20), 416 (1990).
- 97.- Kato, Takahashi and Horihoshi, Koki. A new γ -cyclodextrin-forming enzyme produced by *Bacillus subtilis* No. 313. *Chemical Abstracts.*, 106(5), 196 (1987).

- 98.- Kawachi, Takeshi. Cyclodextrin inclusion complexes with halocinnamaldehydes as controlled-release microbicides.. Chemical Abstracts., 104 (21), 218 (1986).
- 99.- Kazori, A. and Kawasaki, M. Flavor improvement of glycyrrhizin sweeteners. Chemical Abstracts., 104 (7), 449, (1986).
- 100.- Kedzierewicz, F.; Hoffman, M. and Malcent, P. Comparison of tolbutamide β -cyclodextrin inclusion compounds and solid dispersions. Physicochemical characteristics and dissolution studies. International Journal of Pharmaceutics., 58 (39, 221-227, (1990).
- 101.-Keipert, S. and Hilderbrant, S. Interactions between macromolecular adjuvants and drugs. Part 27: the effect of benzodiazepines. Chemical Abstracts., 113(8), 371 (1990).
- 102.-Kerschbaum, J. and Kerr, L. Separation of steroidal epimers and isomers using cyclodextrins HPLC columns. Chemical Abstracts., 104 (14), 830 (1986).
- 103.-Khanolbar, R.D. and Hosangadi, B.D. Electrophoretic studies on cyclodextrins: separation of cyclodextrins on polyacrylamide gels. Chemical Abstracts., 98 (5) 677 (1983).
- 104.-Kitahata, S.; Yoshikawa, S. and Okada, S. determination of α -, β -, and γ -cyclodextrin by high-performance liquid chromatography. Chemical Abstracts., 91 (15), 484, (1979).
- 105.-Ko, G.U.; Chang, M.S.; Hlm, S.G. and Chon, H.Y. Preparation of β -cyclodextrin and applications. (2) β -CGTase. Chemical Abstracts., 109(9), 303, (1988).
- 106.-Kobayashi, S.; Kalnuma, K. and Susuki, S. Purification and some properties of *Bacillus macerans* cycloamilose (cyclodextrin) glucanotransferasa. Carbohydrate Research., 61, 229-238, (1978).
- 107.-Komiyama, M. and Hirai, H. Selective synthesis using cyclodextrins as catalysts. Chemical Abstracts., 104 (21), 567, (1986).
- 108.-Komiyama, M. Synthesis using cyclodextrins as catalysts. Part 3. Improvements by immobilization of selective catalysts, for the synthesis of 4-hydroxybenzoic acid. Chemical Abstracts., 106 (21), 648, (1987).

- 109.-Kondo, H.; Nakatani, H. and Hiroki, K. Analysis of mixtures of α - and β -cyclodextrins using fluorescent dyes. *Carbohydrate Research.*, 52, 1-10, (1976).
- 110.-Kotany, A. and Ito, T. Manufacture of fluid large granule instant tea. *Chemical Abstracts.*, 107 (17), 603, (1987).
- 111.-Krysl, S. and Smolkova, K.E. Cyclodextrins and their use in chromatography methods. *Chemical Abstracts.*, 104 (4), 570, (1986).
- 112.-Kurasumi, T.; Otsuka, S. and Kusunoki, M. Antitussives and expectorants containing tipepidine citrate. *Chemical Abstracts.*, 107 (4), 325, (1987).
- 113.-Kuruzumi, M.; Nambu, N. and Nagai, T. Inclusion compounds of non-steroidal antiinflammatory and other slightly water soluble drugs with α - and β -cyclodextrins in powdered form. *Chemical Pharmaceutical Bulletin.*, 23(12), 3062-3068, (1975).
- 114.-Kyoshim, C. Vitamin-cyclodextrins compounds as food additives. *Chemical Abstracts.*, 98(7), 539, (1983).
- 115.-Lammers, J.N.J.J. Reproducible separation of α - and β -cyclodextrin on charcoal columns. *Journal of Chromatography* 41, 462-466, (1969).
- 116.-Lee Yun-Dong and Kim, Hak-Sung. Enzymatic production of cyclodextrins from unliquefied corn starch in an attrition bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering.*, 37(9), 795-801, (1991).
- 117.-Lin, S.Y. and Yang, J.C. Drug interaction in pharmaceutical formulation. Kinetic determinations of stability of acetaminophen with cyclodextrins and glucose in aqueous solution. *Chemical Abstracts.*, 104(2), 307, (1986).
- 118.-Lin, S.Y.; Kao, Y.H. and Yang, J.Ch. Grinding effect on some pharmaceutical properties of drugs by adding β -cyclodextrin. *Drug Development and Industrial Pharmacy.*, 14(1), 99-118, (1988).
- 119.-Loftsson, T.; Ólafsdóttir, B.J. and Bodor, N. The effects of cyclodextrins on transdermal delivery of drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 37(1), 30-33, (1991).
- 120.-Low, M.; Kisfaludy, L.; Vikmon, A.; Szejtli, J.; Stadler, I.; Gemest, I.; Kolbe, I.; Hoffman, G. and Hortobagyi, G. Preparation of the complex of isosorbide-2,5-

- dinitrate cyclodextrin as a coronary vasodilator. *Chemical Abstracts.*, 106(18), 369, (1987).
- 121.-Maekawa, Yoshio. Preparation of β -linolein- β -cyclodextrin inclusion compound as a anticholesteremic. *Chemical Abstracts.*, 104(20), 390. (1986).
- 122.-Mäkelä, M.; Mattsson, P.; Pintamo-Kenttala, K. and Korpela, T. Cyclodextrin-ligand interaction as a simplified model of bio-specific affinity chromatography. 448, 391-397, (1988).
- 123.-Mäkelä, M.J.; Korpela, T.K.; Puisto, J. and Laakso, S.V. Nonchromatographic cyclodextrin assays: evaluation of sensitivity, specificity and conversion mixture applications. *Journal of Agricultural Food and Chemistry.*, 36, 83-88, (1988).
- 124.-Mäkelä, M.; Mattsson, P. and Korpela, T. Specific adsorbents in isolation and purification of cyclodextrins. *Biotechnology and Applied Biochemistry.*, 11, 193-200, (1989).
- 125.-Makita, T.; Ojima, N.; Hsahimoto, Y.; Ide, H.; Tsuji, J. and Fujisa, K.Y. Chronic oral toxicity of β -cyclodextrin. *Chemical Abstracts.*, 88(17), 49. (1978).
- 126.-Marshall, J.J. and Miwa, I. Kinetic difference between hydrolyses of γ -cyclodextrin by human salivary and pancreatic α -amylases. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 661, 142-147, (1981).
- 127.-Martini, A.; Torricelli, C.; Confalonieri, c. and De Ponti, R. Pharmaceutical formulations containing dehydrated β -cyclodextrin for enhanced solubility. *Chemical Abstracts.*, 115(10), 452, (1991).
- 128.-Masuda, T.; Ishida, S. and Hashimoto, S. Emulsions contains carboxymethylcellulose sodium salt. *Chemical Abstracts.*, 106(16), 386, (1987).
- 129.-Matsuda, K.; Mera, Y.; Segawa, Y.; Uchida, I.; Yokomine, A. and Tagaki, K. Acute toxicity study of γ -cyclodextrin in mice and rats. *Chemical Abstracts.*, 100(1), 61, (1984).
- 130.-Matsuda, H.; Ito, K.; Taki, A. and Uejima, O. Cosmetic composition containing inclusion product with hydroxyalkylated cyclodextrin for preventing skin roughness. *Chemical Abstracts.*, 114 (2), 398, (1991).

- 131.-Matsuda, H. and Ito, K. Inclusion compounds of hydroxyalkylethers of cyclodextrin and sparingly soluble substances for cosmetics. *Chemical Abstracts.*, 115(8), 286, (1991).
- 132.-Matsuda, H.; Ito, K.; Taki, A. and Uejima, O. Cosmetic powders containing inclusion compounds of water-insoluble ingredients with cyclodextrins polymer-hydroxyalkylated cyclodextrin mixtures. *Chemical Abstracts.*, 116(2), 286, (1992).
- 133.-Matsui, Y. and Mochida, K. Binding forces contributing to the association of cyclodextrin with alcohol in an aqueous solution. *Bulletin of the Chemical Society Japan.*, 52(10), 2808-2814, (1979).
- 134.-Mattsson, P.; Mäkelä, M. and Korpela, T. Chromatographic determination of cyclodextrins on benzoylated polyacrylamide gels. *Journal of Chromatography.*, 447(2), 398-403, (1988).
- 135.-Mazzi, G.; Vincieri, F.F.; Formi, F.; Mulinacci, N. and Celli, S. Formation of inclusion complex between the non-steroidal anti-inflammatory drug (R-S)-2-(4-Isobutylphenyl)-propionhydroxamic acid and β -cyclodextrin. *Acta Pharmaceutica Technologica.*, 34(1), 17-21, (1988).
- 136.-Mc. Clenahan, W.S.; Tilden, E.B. and Hudson, C.A. A study of the products obtained from starch by the action of the amylase of *Bacillus macerans*. *Journal of the American Chemical Society.*, 64, 2139-2144, (1942).
- 137.-Menard, F.A.; Dedhiya, G. and Rhodes, C.T. Studies of the effect of pH, temperature and ring size on the complexation of phenytoin with cyclodextrin. *Pharmaceutica Acta Helvetica.*, 63(11), 303-308, (1988).
- 138.-Menard, F.A.; Dedhiya, M.G. and Rhodes, C.T. Potential pharmaceutical applications of a new beta cyclodextrin derivative.. *Drug Development and Industrial Pharmacy.*, 14(11), 1529-1530, (1988).
- 139.-Menard, Francois A., Ph.D. A physico-chemical study of the complexation of cyclodextrins with pharmaceutical substances. *Dissertation Abstracts International.*, 49(11), 4831-B, (1989).

- 140.-Menard, F.A.; Dedhiya, M.G. and Rhodes, C.T. Physicochemical aspects of the complexation of some drugs with cyclodextrins. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 16(1), 91-113, (1990).
- 141.-Miseta, M.; Pintye, K.; Szabo, R.P. and Selmeczi, B. Effect of ingredients and technology on tableting of difficultly compressible drugs. *Chemical Abstracts*, 107(2), 355, (1987).
- 142.-Mochida, K.; Kagita, A.; Matsui, Y. and Date, Y. Effects of inorganic salts on the dissociation of a complex of β -cyclodextrin with an azo dye in an aqueous solution. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 46, 3703-3707, (1973).
- 143.-Mura, P.; Liguori, A., Bramanti, G. and Paggi, L. Improvement of dissolution characteristics of picotamide by cyclodextrin complexation. *Acta Pharmaceutica Technologica*, 34(2), 77-79, (1988).
- 144.-Nagamoto, Shinji. Cyclodextrins-Expanding the development of their functions and applications. *Chemical Economical and Engineering Review*, 17(7/8), 28-34, (1985).
- 145.-Nakai, Y.; Yamamoto, K.; Terada, K. and Kajiyama, A. Relations between crystallinity of β -cyclodextrin and tablet characteristics. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 33(11), 5110-5112, (1985).
- 146.-Nakai, Y.; Yamamoto, K.; Terada, K. and Kajiyama, A. Crystallinity changes of α - and β -cyclodextrins by grinding. *Chemical Abstracts*, 104(9), 709, (1986).
- 147.-Nakai, Y.; Yamamoto, K.; Kajiyama, A. and Sasaki, I. Properties of crystal water of α -, β - and γ -cyclodextrin. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 34 (5), 2178-2182, (1986).
- 148.-Nakai, Y.; Yamamoto, K.; terada, K. and Watanabe, D. New methods for preparing cyclodextrin inclusion compound. I. Heating in a sealed container. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 35, 4609-4615, (1987).
- 149.-Nakai, Y.; Aboutaleb, A.E.S.; Yamamoto, K.; Saleh, S.I. and Ahmed, M.O. Study of the interaction of clobazam with cyclodextrins in solution and in the solid state. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 38 (3), 728-732, (1990).

- 150.-Nakajima, T.; Sunagawa, M.; Hirohoshi, T. and Fujitaka, K. Studies of cyclodextrin inclusion complexes. I. Complex between cyclodextrins and benzylamine in aqueous solution. *Chemical Pharmaceutical Bulletin.*, 32 (2), 383-400. (1984).
- 151.-Nakamura, N. and Horiyoshi, K. Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase producing alkalophilic *Bacillus* sp. *Agricultural and Biological Chemistry.*, 40 (4), 753-757. (1976).
- 152.-Nakamura, N. and Horiyoshi, K. Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic bacillus sp. *Agricultural and Biological Chemistry.*, 40 (5), 935-941. (1976).
- 153.-Nakamura, N. and Horiyoshi, K. Purification and properties of neutral-cyclodextrin glycosyl-transferase of an alkalophilic bacillus sp. *Agricultural and Biological Chemistry.*, 40 (9), 1785-1791. (1976).
- 154.-Nakamura, N. and Horiyoshi, K. Development of and prospects for cyclodextrins-based on alkaline fermentation process. *Chemical Economy and Engineering Review.*, Vol. (14), No. 9 (161), 32-38. (1982).
- 155.-Nakamura, E.; Azuma, A. and Fukada, M. Pesticide composition containing cyclodextrins for the increase of solubility and stability. *Chemical Abstracts.*, 109 (25), 294. (1988).
- 156.-Nakanishi, Michio. Antiinflammatory pharmaceutical containing absorption promoters. *Chemical Abstracts.*, 107 (24), 369. (1987).
- 157.-Nakanishi, K.; Masada, M.; Nadai, T. and Miyajima, K. Effect of the interaction of drug- β -cyclodextrin complex with bile salts on the drug absorption from rat small intestinal lumen. *Chemical Pharmaceutical Bulletin.*, 37 (1) 211-214. (1989).
- 158.-Nakanishi, K.; Nadai, T. and Miyajima, K. Effect of cyclodextrins on biological membrane. I. Effect of cyclodextrins on the absorption of a non-absorbable drug from rat small intestine and rectum. *Chemical Pharmaceutical Bulletin.*, 38 (6), 1684-1687. (1990).
- 159.-Nara, T.; Hatori, T.; Nishinomiya, Y. and Senda, S. Pharmaceuticals containing prozolin. *Chemical Abstracts.*, 106 (12), 364. (1987).

- 160.-Nardi, A.; Fanali, S. and Foret, F. Capillary zone electrophoretic separation of cyclodextrins with indirect UV photometric detection. *Electrophoresis*, 11 (9), 774-776, (1990).
- 161.-Nippon Sangria Beverage Co. Japan. Preparation of inclusion compounds with ultrasonication. *Chemical Abstracts*, 104 (), 319, (1986).
- 162.-Nogawa, Y.; Nishimura, H.; Matsumoto, S. and Yamada, H. Cosmetics containing cyclodextrins and *Lanclum domesticum* extracts (lansic acid and lansiosides). *Chemical Abstracts*, 111 (8), 375, (1989).
- 163.-Nomoto, M.; Shew, D-C.; Chen, S-J.; Yen, T-M.; Liao, C-W. and Yang, Ch-P. Cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic bacterium of Taiwan. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48 (5), 1337-1338, (1984).
- 164.-Nomoto, M.; Chen, Ch-Ch. and Sheu, D-CH., Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic bacterium of Taiwan. *Agricultural Biological Chemistry*, 50 (11) 2701-2707, (1986).
- 165.-Ofuji, T. and Ogata, T. cyclodextrin increase the pastiness in rice products. *Chemical Abstracts*, 104 (17), 573, (1986).
- 166.-Ogawa, T. and Takahashi, Y. Total synthesis of α -cyclodextrin. *Carbohydrate Research*, 138, C5-C9, (1985).
- 167.-Ogino, S. and Hirata, H. Liquid shampoos containing menthol and β -cyclodextrin. *Chemical Abstracts*, 106 (4), 287, (1987).
- 168.-Ogino, H. and Hirota, H. Liquid shampoos containing inclusion compounds of menthol derivatives with cyclodextrins. *Chemical Abstracts*, 112(4), 289, (1990).
- 169.-Ohtani, Irie, T.; Uekama, K.; Fukinaga, K... and Pitha, J. Differential effects of α - β - and γ -cyclodextrin on human erythrocytes. *Europea Journal of Biochemistry*, 186, 17-22, (1989).
- 170.-Oishi, T.; Nakanishi, F. and Yamamoto, T. Hair dye powders containing cyclodextrin-dye inclusion compounds. *Chemical Abstracts*, 110 (18), 389, (1989).

- 171.-Orienti, I.; Fini, A.; Zecchi, V. and Zuman, P. Diffusion of naproxen in presence of β -cyclodextrin across a silicone rubber membrane. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, 66 (7), 204-208, (1990).
- 172.-Orienti, I.; Fini, A.; Bertasi, V. and Zecchi, V. Inclusion complexes between non-steroidal antiinflammatory drugs and β -cyclodextrin. *Eur J. Pharm. Biopharm.*, 37 (2), 110-112, (1991).
- 173.-Otogiri, M.; Uekama, K. and Ikeda, K. Inclusion complexes of β -cyclodextrin with tranquilizing drugs phenothiazines in aqueous solution. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 23 (1), 188-195, (1975).
- 174.-Otero-Espinar, F.J.; Angulano-Igea, S.; Blanco Méndez, J. and Vila-Jato, J.L. Reduction in the ulcerogenicity of naproxen by complexation with β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*, 70, 35-41, (1991).
- 175.-Otero-Espinar, F.J.; Angulano Igea, S.; García-González, N.; Vila-Jato, J.L. and Blanco-Méndez, J. Oral bioavailability of naproxen- β -cyclodextrin inclusion compound. *International Journal of Pharmaceutics*, 75, 37-44, (1991).
- 176.-Pagington, J., Foods C. and Chesham. *Beta-Cyclodextrin. Perfumer and Flavorist*, Vol. 11, February/March, 49-58, (1986).
- 177.-Park, Ch. S.; Park, K. H. and Kim, S.H., A rapid screening method for alkaline β -cyclodextrin glucanotransferase using Phenolphthalein-methylorange-containing-solid medium. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(4), 1167-1169, (1989).
- 178.-Pendergast, D.D. and Connors, K.A. Improved competition indicator methods for the study of α -cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73 (12), 1779-1783, (1984).
- 179.-Pitha, J.; Szente, L. and Szejtli, J. Molecular Encapsulation of Drugs by cyclodextrins and Congeners., *Controlled Drugs Delivery*, Vol. 1. CRC, FL, 123-148, (1983).
- 180.-Pitha, J.; Harman, M. and Michel, M.E. Hydrophilic cyclodextrin derivatives enable effective oral administration of steroidal hormone. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75 (20), 165-167 (1986).

- 181.-Pitha, J.; Analsie, E.J. and Uekama, K. Cyclodextrin: testosterone complex suitable for sublingual administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 76 (10), 788-790, (1987).
- 182.-Gian, X. and Sheng, S. Determination of cyclodextrin by HPLC. *Chemical Abstracts.*, 106 (10), 757, (1987).
- 183.-Raja, K.C.M.; Sreedharan, V.P.; Prenia, P. and Ramakrishna, S.V. Cyclodextrin from cassava (*manihot esculenta* Crantz) Starch. Isolation and Characterization as bromobenzene and chloroform clathrates. *Chemical Abstracts.*, 113 (6), 106, (1990).
- 184.-Rahmann, A.A.A.; Khidr, S.H.; Ahmed, S.M. and Aboutaleb, A.E. Evaluation of chloraphenicol- β -cyclodextrin inclusion complex. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 37 (1), 34-37, (1991).
- 185.-Rauh, S. and Knoche, W. Ultrasonic attenuation in aqueous solutions of α -, β - and γ -cyclodextrins. *Journal of Chemical Society Faraday Trans 1.*, 81, 2551-2559, (1985).
- 186.-Reinneclius, G.A. and Risch, S.J. Encapsulation of artificial flavors by β -cyclodextrin. *Chemical Abstracts.*, 106 (3), 486, (1987).
- 187.-Rohrbach, R.P.; Rodriguez, L.J.; Eyring, E.M. and Wojcik, J.F. An equilibrium and Kinetic investigation of salt-cycloamylose complexes. *The Journal of Physical Chemistry.*, 81 (10), 944-948, (1977).
- 188.-Rohrbach, R.P. and Scherl, D.S. Cyclodextrin enzymic manufacture from starch, yield enhancement by addition of organic solutes. *Chemical Abstracts.*, 110 (15), 580, (1989).
- 189.-Saenger, W.; Betzel, Ch.; Hingerty, B. and Brown, G.M. Flip-flop hydrogen bonding in a partially disorderd system. *Nature.*, 296 (5857), 581-583, (1982).
- 190.-Saenger Wolfran. Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Angewandte Chemie International Edition.*, 19, 344-362, (1980).
- 191.-Saito, H. and Matsuo, M. Antishock preparation containing prostaglandin-cyclodextrin inclusion compounds. *Chemical Abstracts.*, 106 (16), 400, (1987).

- 192.-Sakai, S.; Yamamoto, N.; Hashimoto, H. and Hara, K. Immobilization of cyclodextrin glucanotransferase. *Chemical Abstracts.*, 106 (5), 219, (1987).
- 193.-Sanraku-ocean. Stevioside- γ -cyclodextrin inclusion compound as sweeteners. *Chemical Abstracts.*, 104 (1), 441 (1986).
- 194.-Sato, Y. and Susuki, Y. Optical resolution of drugs by cyclodextrin complexation. *Chemical Pharmaceutical Bulletin.*, 33 (10), 4606-4609, (1985).
- 195.-Sato, M.; Nagano, H.; Yagi, Y. and Ishikura, T. Increasing γ -cyclodextrin yield. *Chemical Abstracts.*, 104 (15), 567, (1986).
- 196.-Sato, M.; Yagi, Y.; Nishimura, M. and Ishikura, T. Solubilization of cyclodextrin inclusion compounds. *Chemical Abstracts.*, 107 (6), 403, (1987).
- 197.-Sekulovic, D. and Zajic, L. The investigation of cyclodextrin polymer as a new desintegrant for direct compressed tablets. *Chemical Abstracts.*, 107 (22), 447, (1987).
- 198.-Shibanai, Ichiro. Manufacture of paper containing cyclodextrin and protective agents. *Chemical Abstracts.*, 106 (18), 274, (1987).
- 199.-Shibauchi, I. and Nakamura, K. Bath preparations containing cyclodextrin inclusion compounds of milk or milk product. *Chemical Abstracts.*, 104, (2), 302, (1986).
- 200.-Shibauchi, I. and Nakamura, K. Bath preparations containing cyclodextrin inclusion compounds of vitamin. *Chemical Abstracts.*, 104 (6), 366, (1986).
- 201.-Sirichote, O. Ph.D. Studies of the nature of the binding process responsible for the existence of complexes of cyclodextrins. *Dissertation Abstracts International.*, 48 (4), 1060-B-1061-B, (1987).
- 202.-Stoodart, J. Fraser. A century of cyclodextrins. *Carbohydrate Research.*, 192, xii-xv. (1989).
- 203.-Street, Kenneth W., Jr. Cyclodextrin cavity polarity and chromatographic implications. *Chemical Abstracts.*, 107 (10), 741, (1987).

- 204.-Su, Ch.S. and Yang, Ch.P. A novel method for continuous production of cyclodextrins using an immobilized enzyme system. *Chemical Abstracts.*, 113 (3), 500, (1990).
- 205.-Sumitomo, Ch. Stabilization of 2-methoxy-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin 2-sulfide. *Chemical Abstracts.*, 104 (3), 493 (1986).
- 206.-Sunami, M.; Horihuchi, T.; Tanada, M. and Ito, Y. Adhesive gel compositions as carriers for transdermal pharmaceuticals. *Chemical Abstracts.*, 107 (12), 389, (1987).
- 207.-Sundararajan, P.R. and Rao, V.S.R. Conformational studies on cycloamyloses. *Carbohydrate Research.*, 13, 351-358, (1970).
- 208.-Susuki, M. and Nichino, K. Foods containing anticholesteremic-cyclodextrins. *Chemical Abstracts.*, 104 (1), 441, (1986).
- 209.-Susuki, M.; Ueda, S. and Kusal, A. Application of Freezing point depression to drug interaction studies. I. Interaction between cyclodextrins and alcohols. *Chemical Pharmaceutical Bulletin.*, 36 (2), 720-725, (1988).
- 210.-Szabó, P.; Ferenazy, T.; Serfozo, J.; Szejtli, J. and Liptak, A., Absorption and elimination of cyclodextrin derivatives by rabbits and rats. *Chemical Abstracts.*, 98 (2), 10, (1993).
- 211.-Szeman, J.; Fenyvesi, E. and Szejtli, J. Water soluble cyclodextrin polymers; their interaction with drugs. *Chemical Abstracts.*, 107 (24), 357, (1987).
- 212.-Szeman, J.; Stadler-Szoke, A.; Vikmon, M. and Szejtli, J. Stabilization of prostacyclin and furosemide by cyclodextrins. *Chemical Abstracts.*, 108 (6), 392, (1988).
- 213.-Szente, L. and Szejtli, J. Molecular encapsulation of natural and synthetic coffee flavor with β -cyclodextrin. *Journal of Foods Sciences.*, 51 (4), 1024-1027, (1986).
- 214.-Szente, L. and Szejtli, J. Formulation of propolis with β -cyclodextrin. *Acta Pharmaceutica Technologica.*, 33 (4), 218-221, (1987).
- 215.-Szente, L. and Szejtli, J. Stabilization of flavors by cyclodextrin. *Chemical Abstracts.*, 109 (21), 598, (1988).

- 216.-Szejtli, Jozsef and Sebestyen, G. Resorption, metabolism and toxicity studies on the peroral application of β -cyclodextrin. *Chemical Abstracts.*, 92 (13), 146, (1980).
- 217.-Szejtli, J.; Gerl6czy, A. and F6nag, A. Intestinal absorption of ¹⁴C-labelled β -cyclodextrin in rats. *Arzneimittel-Forschung. Drug Research.*, 30 (1), Nr.5 808-810 (1980).
- 218.-Szejtli, Jozs6f. Industrial applications of cyclodextrins. *Inclusion Compounds, Vol. III*, (Eds. J.L. Atwood, J.E.D. Davies and D.D. MacNichol) Academic Press Inc. London., 331-390. (1984).
- 219.-Szejtli, Jozs6f. Molecular entrapment and release properties of drugs by cyclodextrins. *Controlled Drug Bioavailability. Vol. 3.*, Smolen, V.F. and Ball, L.A., Eds., John-Wiley and Sons, New York, 365-421, (1985).
- 220.-Szejtli, Jozs6f. Cyclodextrins in Pesticides. *Chemical Abstracts.*, 104 (1), 192, (1986).
- 221.-Szejtli, Jozs6f. Cyclodextrins: a new group of industrial basic materials. *Chemical Abstracts.*
- 222.-Szejtli, J.; Szente, L.; Kulczar, G. and Kernoczy, L. β -cyclodextrin complexes in talc powder compositions. *Chemical Abstracts.*, 106 (2), 263 (1987).
- 223.-Szejtli, Jozs6f. Cyclodextrins in biotechnology. *Chemical Abstracts.*, 106,(3), 472 (1987).
- 224.-Szejtli, Jozs6f. *Cyclodextrin Technology.* (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1988).
- 225.-Szejtli, Jozs6f. Cyclodextrins in drug formulations: Part I. *Pharmaceutical Technology.*, 15 (6), 36-44 (1991).
- 226.-Szejtli, Jozs6f. Cyclodextrins in drug formulations: Part II. *Pharmaceutical Technology.*, 15 (8), 24-36, (1991).

- 216.-Szejtli, József and Sebestyén, G. Resorption, metabolism and toxicity studies on the peroral application of β -cyclodextrin. *Chemical Abstracts.*, 92 (13), 146, (1980).
- 217.-Szejtli, J.; Gerlóczy, A. and Fónagy, A. Intestinal absorption of ^{14}C -labelled β -cyclodextrin in rats. *Arzneimittel-Forschung. Drug Research.*, 30 (1), Nr.5 808-810 (1980).
- 218.-Szejtli, József. Industrial applications of cyclodextrins. *Inclusion Compounds. Vol. III.* (Eds. J.L. Atwood, J.E.D. Davies and D.D. MacNichol) Academic Press Inc. London., 331-390, (1984).
- 219.-Szejtli, József. Molecular entrapment and release properties of drugs by cyclodextrins. *Controlled Drug Bioavailability. Vol. 3.*, Smolen, V.F. and Ball, L.A., Eds., John-Wiley and Sons, New York, 365-421, (1985).
- 220.-Szejtli, József. Cyclodextrins in Pesticides. *Chemical Abstracts.*, 104 (1), 192, (1986).
- 221.-Szejtli, József. Cyclodextrins: a new group of industrial basic materials. *Chemical Abstracts.*
- 222.-Szejtli, J.; Szenté, L.; Kulczar, G. and Kernoczy, L. β -cyclodextrin complexes in talc powder compositions. *Chemical Abstracts.*, 106 (2), 263 (1987).
- 223.-Szejtli, József. Cyclodextrins in biotechnology. *Chemical Abstracts.*, 106, (3), 472 (1987).
- 224.-Szejtli, József. *Cyclodextrin Technology.* (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1988).
- 225.-Szejtli, József. Cyclodextrins in drug formulations: Part I. *Pharmaceutical Technology.*, 15 (6), 36-44 (1991).
- 226.-Szejtli, József. Cyclodextrins in drug formulations: Part II. *Pharmaceutical Technology.*, 15 (8), 24-36, (1991).

- 227.-Szilassi, M.; Otta, K.; Zsádon, B.; Szejtli, J. and Tudos, F. Separation of cyclodextrins with gel chromatography and HPLC. *Chemical Abstracts.*, 97 (24), 96 (1982).
- 228.-Takahashi, Y. and Ogawa, T. Total synthesis of cyclomaltooctase and an isomer of cyclomaltohexaose. *Carbohydrate Research.*, 169, 127-149, (1987).
- 229.-Takahashi, Y. and Ogawa, T. Total synthesis of cyclodextrins. *Chemical Abstracts.*, 111 (3), 649 (1989).
- 230.-Takahashi, T.; Kagami, I. and Tanaka, T. Suppositories containing anti-inflammatory- β -cyclodextrin inclusion compound. *Chemical Abstracts.*, 104 (2), 445 (1986).
- 231.-Takeshima, Kenji. Powdery cosmetic cleansers containing casein compounds, oil-cyclodextrin inclusion compounds and medicinal plant components. *Chemical Abstracts.*, 110 (16), 389 (1989).
- 232.-Terajima, U.; Tokuda, K. and Nakamura, S.. Cosmetics containing fragrant compound-cyclodextrin inclusion compounds with oils. *Chemical Abstracts.*, 109 (14) 355 (1988).
- 233.-Thiem, J.; Treder, W.; Keller, R. and Schlegmann, M. Synthesis of α - and β -cyclodextrins from α -glucopyranosyl fluoride using cyclodextrin α -(1-4) glucosyltransferase. *Chemical Abstracts.*, 109 (25), 673, (1988).
- 234.-Tilden, E.B. and Hudson, C.S. The conversion of starch to crystalline dextrans by the action of a new type of amylase separate from cultures of *Aerobacillus macerans*. *Journal of the American Chemical Society.*, 61, 2900-2902, (1939).
- 235.-Tokumura, Ch.; Tsushima, I.; Tateishi, K.; Kashino, M.; Machida, R. and Nagai, T. Oral formulation containing cinnarizine-cyclodextrin inclusion compound. *Chemical Abstracts.*, 106 (20), 404 (1987).
- 236.-Toth, G.; Szejtli, J.; Istvan, T.; Szente, L. and Wertman, T. Pesticidal cyclodextrin complexes. *Chemical Abstracts.*, 106 (13), (1987).
- 237.-Toyo, Kozo. Enhancement of cyclodextrin production. *Chemical Abstracts.*, 94, (1981).

- 238.-Treder, W.; Thiem, J. and Schlingmaun, N. Enzymatic synthesis of cyclodextrins with α -glucosylfluoride a substrate for cyclodextrin α -(1-4) glucosyltransferase. *Tetrahedron Letters.*, 27 (46), 5605-5608 (1986).
- 239.-Tsukahara, H.; Tsukui, T. and Kolwa, T. Air deodorizing filters. *Chemical Abstracts.*, 107 (12), 337 (1987).
- 240.-Uekama, K.; Hirayama, F.; Matsuo, N. and Koinuma, H., Structural elucidation of the inclusion complexes of tolbutamide with α - and β -cyclodextrins in aqueous solution., *Chemistry Letters.*, 703-706 (1978).
- 241.-Uekama, K.; Hirayama, F. and Daiguji, M. Effects of α - and β -cyclodextrins on base-catalyzed isomerization of prostaglandin A₁ and prostaglandin A₂. *Chemistry Letters*, 327-330. (1978).
- 242.-Uekama, K.; Hirayama, F.; Nasu, S.; Matsuo, N. and Irie, T. Determination of the stability constants for inclusion complexes of cyclodextrins with various drug molecules by High performance liquid chromatography. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 26(11), 3477-3484, (1978).
- 243.-Uekama, K.; Irie T.; Sunada, M; Otagiri, M. and Tsubaki, K. Protective effects of cyclodextrins on drug-induced hemolysis in vitro. *Journal Pharmacobio-Dyn.*, 4, 142 (1981).
- 244.-Uekama, K.; Fujinaga, T.; Hirayama, F.; Otagiri, M.; Yamasaki, M.; Seo, H.; Hashimoto, T. and Tsuruoka, M. Improvement of the oral bioavailability of digitalis glycosides by cyclodextrin complexation. *Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 72 (11), 1338-1341, (1983).
- 245.-Uekama, K.; Fujinaga, T.; Hirayama, F.; Otagiri, M. and Inaba, K. Improvement of dissolution characteristics and chemical stability of prostaglandin E1 by γ -cyclodextrin complexation. *Chemical Pharmaceutical Bulletin.*, 32 (1), 275-279 (1984).
- 246.-Uekama, K. and Otagiri, M. Cyclodextrins in drug carrier systems, CRC. *Critical Reviews in Therapeutic Carrier Systems.*, Vol. 3 Issue 1, 1-40, (1987).

- 247.-Uekama, K. Improvement of chemical instability of carmofur in β -cyclodextrin solid complex by utilizing some organic acids. *Chemical Abstracts.*, 109 (8) 429 (1988).
- 248.-Ueno, A.; Takahashi, K.; Hino, T. and Osa, T. Fluorescence enhancement of α -naphthoxyloxyacetic acid in the cavity of γ -cyclodextrin, assisted by a space-regulating molecule. *Journal Of Chemical Society Chemical Communications.*, 194-195, (1981).
- 249.-Vandamine, E.J.; Declercq, C. and Bebonme, I. Dynamics of the *Bacillus curculans* var. *alkalophilus* cyclodextrin glycosyltransferase fermentation. *Chemical Abstracts.*, 105 (1), 496 (1986).
- 250.-Vikmon, M.; Stlader-Szoké, A. and Szejtli, J. Solubilization of amphotericin B with γ -cyclodextrin. *The Journal of Antibiotics.*, 38 (12), 1822-1824, (1985).
- 251.-Vikmon, M.; Stlader-Szoké, A. Hortobagy, G.; Kolbe, I. and Szejtli, J. Stabilization of mydenton with β -cyclodextrin. *Acta Pharmaceutica Technologica.*, 32 (1), 29-32, (1986).
- 252.-Vila-Jato., J.L.; Blanco, J. and Vilar, A. Spirolactone/ β -cyclodextrin complexes: oral bioavailability in humans. *Acta Pharmaceutica Technologica.*, 32(2), 82-85, (1986).
- 253.-Vinceri, F.F.; Mulanacci, N.; Mazzi, G. and Bambagiotti-Alberti, M. Stabilization of tinctures with cyclodextrins: a tincture from the fruits of *oenanthe aquatica* L. *International Journal of Pharmaceutics.*, 48, 119-124, (1988).
- 254.-Vromans, H.; Eissens, A.C. and Lerk, C.F. Mechanism of dissolution of drug-cyclodextrin complexes: A pragmatic approach. *Acta Pharmaceutica Technologica.*, 35 (4), 250-255, (1989).
- 255.-Watanabe, N. and Morioka, T. Cleansers containing oil-cyclodextrin inclusion compounds. *Chemical Abstracts.*, 109 (18), (1988).
- 256.-Weiszfeiler, V.; Stlader-Szoké, A. and Szejtli, J. Solubility enhancement of ipriflavone by cyclodextrin complexation. *Chemical Abstracts.*, 112 (8), 415 (1990).

- 257.-Wiedenhof, N. and Lammers, N.J.J., Properties of cyclodextrins. Part II. Preparation of a stable β -cyclodextrin hydrate and determination of its water content and enthalpy of solution in water from 15-30°. Carbohydrate Research., 7, 1-16 (1968).
- 258.-Yagi, Y.; Tsuchiyama, Y.; Sato, M.; Fujie, K. and Ishikura, T. Combinations of partially methylated cyclodextrin and oils as substitutes for surfactants. Chemical Abstracts., 108 (12), 431 (1988).
- 259.-Yagi, Y.; Sato M. and Ishikura, T. Improvement of the taste of seaweeds by cyclodextrin. Chemical Abstracts., 109 (5), (1988).
- 260.-Yang, Ch. P. and Huang, Ch. H. Cyclodextrin production. I. Reaction conditions for cyclodextrin formation from soluble starch by cyclodextrin glucosyltransferase. Chemical Abstracts., 102 (24), 101, (195).
- 261.-Yoshida, A.; Yamamoto, M.; Hirayama, F. and Uekama, K. Improvement of chemical instability of digitoxin in aqueous solution by complexation with β -cyclodextrin derivatives. Chemical Pharmaceutical Bulletin., 36 (10), 4075-4080, (1988).
- 262.-Yu, E.K.C.; Aoki, H. and Misawa, M. Specific α -cyclodextrin production by a novel thermo-stable cyclodextrin glycosyltransferase. Applied and Microbiology Biotechnology., 28 (1), 377-379, (1988).
- 263.-Yusuff, N.T.; York, P.; Chrystyn, H.; Brmaley, P.N.; Swallow, R.D.; Tuladhar, B.R. and Losowsky, M.S. Improved bioavailability from spirinolactone β -cyclodextrin complex. Chemical Abstracts., 115 (10), 435, (1991).
- 264.-Zhang, D.; Hiang, N. and Zhang, R. Reducing moisture absorptivity in candies by β -cyclodextrin. Chemical Abstracts., 106 (2), 486, (1987).
- 265.-Zsádon, B.; Szilassi, M.; Szejtli, J.; Seres, G. and Tüdös, F. Chromatography of α -, β - and γ - cyclodextrin on dextran gel columns. Chemical Abstracts., 89 (20), 96 (1978).
- 266.-Zsádon, B.; Otta, K.H.; Tüdös, F. and Szejtli, J. Separation of cyclodextrins by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography., 172, 490-492. (1979).