

TRABAJO FIN DE GRADO

EFECTO DE LAS CICLODEXTRINAS SOBRE LA LIBERACIÓN DE β -ESTRADIOL DESDE CHITOSANO

Alumna: Laura Casas Álvarez

Tutora: Araceli Delgado Hernández

Cotutora: Carmen Évora García

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Facultad Ciencias de la salud

Sección de Farmacia

5º Grado en Farmacia

ÍNDICE

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.2. Métodos analíticos

2.3. Estudios de solubilidad

2.4. Inclusión del β - estradiol en quitosano

2.5. Ensayo de liberación

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Validación de los métodos analíticos

3.2. Complejos fármaco - ciclodextrina

3.3. Preparación de geles de quitosano conteniendo β - estradiol y entrecruzado

3.4. Liberación del β - estradiol desde quitosano

4. CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

ABSTRACT

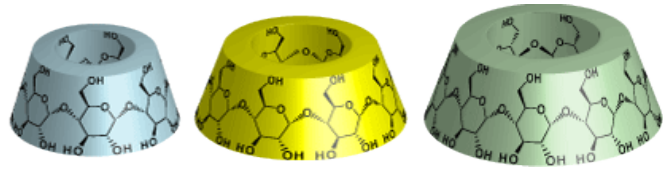
Cyclodextrins are oligosaccharides well known as pharmaceutical solubilizers which are able to enhance aqueous solubility of poorly soluble drugs, as ciprofloxacin or β -estradiol, by forming inclusion complexes where no covalent bonds are formed. The effect of hidroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) and hidroxypropyl- γ -cyclodextrin (HP γ CD) on the solubility of ciprofloxacin and β -estradiol respectively was evaluated. The results showed that it is possible to enhance aqueous solubility of both drugs with cyclodextrins and a linear correlation between cyclodextrin concentration and drug solubility was found.

The stability constant of the complex was only calculated for ciprofloxacin since the estimation of β -estradiol intrinsic solubility was not feasible. In both cases, the complexation efficiency of the drugs was low, although higher for the β -estradiol with HP γ CD (17%) than for the ciprofloxacin with HP β CD (0,22%). Chitosan based delivery system was prepared by cross-linking with tripolyphosphate (TPP). The β -estradiol was incorporate in a chitosan hydrogel (2%) completely solubilised in 10% HP γ CD aqueous solution or only partially solubilised in 2,5% HP γ CD. Due to the way that the drug was incorporated (partially or totally solubilised), differences in loading efficiency were observed. A higher loading efficiency (70%) was obtained when β -estradiol was incorporated only partially solubilised (in 2,5% HP γ CD). In vitro release assay of the two β -estradiol formulations was carried out at 37°C and sink conditions for 24 days. A similar release profile was obtained from both formulations that was characterised by a fast release in the first 24 hours with no significant further release until the end of assay. A lower percentage was released from the formulation where the β -estradiol was incorporated completely solubilised that could be due to a higher interaction or a better dispersion of drug-HP γ CD complex in the chitosan solid matrix. Further studies are required to optimise drug loading yield and release profile from the developed β -estradiol delivery system.

1. INTRODUCCIÓN

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos compuestos por unidades de α -D-glucosa unidas por enlaces α - (1,4) que adoptan estructura troncocónica. Dicha estructura se caracteriza por poseer una cavidad interior de carácter hidrofóbico y un exterior hidrofílico. Es esta estructura la que permite a las ciclodextrinas incluir fármacos/sustancias poco solubles/insolubles en agua en su cavidad hidrofóbica y así formar complejos de inclusión. Por ello, las ciclodextrinas se utilizan como excipientes funcionales persiguiendo diferentes fines, dentro de los cuales el más inmediato es la solubilización de fármacos insolubles en agua, pero también se utilizan con el fin de modificar la liberación de fármacos, enmascarar caracteres organolépticos desagradables, aumentar la estabilidad del fármaco, etc.

Podemos distinguir entre las ciclodextrinas de origen natural, α , β y γ ciclodextrinas, compuestas por 6, 7 y 8 unidades de glucosa respectivamente, y sus derivados sintéticos (metil, hidroxiopropil y sulfobutileter ciclodextrinas). Estas últimas han sido desarrolladas fundamentalmente con el fin de aumentar la solubilidad acuosa y disminuir la toxicidad por vía parenteral de las ciclodextrinas de origen natural (1,2,3,4,5).



	α - CD	β - CD	γ - CD
Nº unidades glucosa	6	7	8
Diámetro cavidad interior (nm)	0,47	0,60	0,75
Altura cavidad interior (nm)	0,79	0,79	0,79

Figura 1. Estructura y dimensiones de las ciclodextrinas naturales.

El β -estradiol es un estrógeno prácticamente insoluble en agua. Por ello, es un candidato para formar complejos de inclusión con ciclodextrinas con el fin de aumentar su solubilidad acuosa.

El quitosano (CHT) es un polisacárido de origen natural, lineal, compuesto por unidades de glucosamina que presenta interesantes propiedades desde el punto de vista farmacéutico, como su capacidad antiséptica además de ser biocompatible y biodegradable. Por otro lado, su carga positiva permite, mediante el método de gelificación iónica, entrecruzar fácilmente las cadenas de dicho polímero utilizando tripolifosfato (TPP) ya que este último aporta residuos aniónicos capaces de interactuar con los residuos catiónicos del polímero (6).

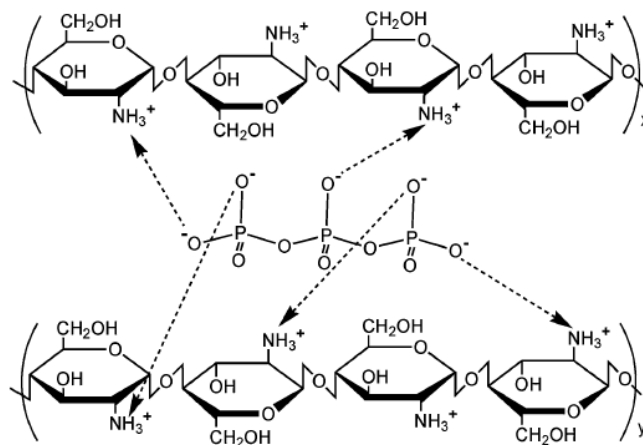


Figura 2. Entrecruzamiento iónico entre Quitosano con tripolifosfato

El objetivo de este trabajo es la incorporación de β -estradiol utilizando una ciclodextrina, concretamente la hidroxipropil- γ -ciclodextrina (HP γ CD), en un hidrogel de quitosano. Desde dicho gel, tras su entrecruzamiento, se persigue una liberación controlada del fármaco.

Se estudiará, por tanto, el efecto de la concentración de ciclodextrina en la solubilidad del fármaco, la incorporación del mismo al gel de quitosano y el perfil de liberación del β -estradiol desde el hidrogel entrecruzado.

Este sistema de liberación sostenida de β -estradiol podría ser útil como inyectable para la regeneración del hueso osteoporótico, dado que la carencia de dicho estrógeno es un factor clave en el desarrollo de la enfermedad.

El ciprofloxacino, antibiótico perteneciente al grupo de las fluorquinolonas, también es poco soluble en agua. De hecho, en este trabajo se comienza probando la metodología con el ciprofloxacino, como modelo de fármaco de reducida solubilidad acuosa, en HP β CD, para posteriormente estudiar la solubilización del β -estradiol con HP γ CD.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Las ciclodextrinas, hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) (CAVASOL[®] W7 HP) e hidroxipropil- γ -ciclodextrina (HP γ CD) (CAVASOL[®] W8 HP) fueron donadas por WACKER (Alemania). El ciprofloxacino (peso molecular 331,347 g/mol) y β -estradiol (peso molecular 272,388 g/mol) así como el tripolifosfato fueron suministrados por Sigma-Aldrich. El Chitosano (Protasan[®] UP CL 213) con un grado de deacetilación del 86% y una viscosidad de 150 mPa·s (disolución 1% en agua) fue proporcionado por NovaMatrix, Noruega).

2.2. Métodos analíticos

La determinación de las concentraciones de ciprofloxacino y β -estradiol se realizó mediante espectrofotometría UV (Ultrospect 3300 plus). La longitud de onda de máxima absorción que presentan ambos fármacos se verificó realizando un barrido en el intervalo de longitudes de onda de 200–400 nm, siendo a 271 nm para el ciprofloxacino y a 280 para el β -estradiol.

En el caso del ciprofloxacino, se disolvieron 40 mg de fármaco en HCl 0,1M obteniendo una disolución de concentración 0,4 mg/mL. A partir de ella, se prepararon disoluciones de concentración comprendida entre 2–12 μ g/mL por dilución con tampón fosfato a pH 7,4. Este proceso se realizó por triplicado.

Para el β -estradiol, se disolvieron 5 mg de fármaco en metanol obteniendo una disolución de concentración 5 mg/mL. A partir de la cual se prepararon disoluciones de concentración comprendida entre 10–100 μ g/mL por dilución con una mezcla de Metanol:Agua en proporción 70:30. Este proceso se realizó por quintuplicado.

2.3. Estudios de solubilidad

Se estudió la solubilización del ciprofloxacino y del β -estradiol mediante el uso de HP β CD e HP γ CD respectivamente.

Para ello se añadió un exceso de ciprofloxacino (aproximadamente 3 mg) o de β -estradiol (6 mg aproximadamente) a disoluciones (2 mL) de HP β CD (0–30% p/p; 0–214,3 mM) en tampón fosfato pH 7,4 y disoluciones acuosas de HP γ CD (0–10% p/p; 0–63,5 mM) respectivamente.

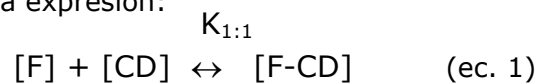
Las suspensiones se mantuvieron en agitación magnética, a temperatura ambiente y protegidas de la luz durante 24h. Tras ese periodo de tiempo, se filtraron utilizando filtros de jeringa de 25 mm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro (CHROMAFIL® PET) y se recogió el filtrado en tubos de ensayo.

Las muestras se diluyeron convenientemente con tampón fosfato (pH 7,4) en el caso del ciprofloxacino y con metanol hasta una proporción MeOH:Agua (70:30) en el caso del β-estradiol y se midió su absorbancia a 271 y 280 nm respectivamente.

Evaluación del complejo fármaco-ciclodextrina

Los complejos que ambos fármacos forman con las correspondientes ciclodextrinas se caracterizaron utilizando el diagrama de solubilidad de fases de Higuchi y Connors (7).

Suponiendo la formación de un complejo de estequiometría 1:1 y centrándonos en un perfil tipo A_L, donde existe una relación lineal entre la solubilidad del fármaco y la concentración de ciclodextrina, la formación del complejo fármaco-ciclodextrina se puede representar mediante la expresión:



Donde [F] es la concentración de fármaco libre, [CD] la concentración de ciclodextrina libre y [F-CD] la concentración de complejo fármaco-ciclodextrina.

El perfil de solubilidad viene definido por la expresión lineal:

$$S_{total} = S_0 + \frac{K_{1:1} \cdot S_0}{1 + K_{1:1} \cdot S_0} [CD] = b_0 + b_1 [CD] \quad (\text{ec. 2})$$

Siendo S_{total} la solubilidad que el fármaco presenta para una cierta concentración de ciclodextrina, S₀ la solubilidad intrínseca del fármaco, b₁ la pendiente de la recta y b₀ la ordenada en el origen.

La formación del complejo está determinada por la constante de asociación del mismo (K_{1:1}):

$$K_{1:1} = \frac{[SL]}{[S][L]} = \frac{b_1}{S_0(1-b_1)} \quad (\text{ec. 3})$$

La eficacia de complejación (EC) se puede estimar a partir de la pendiente del diagrama de fases (e independientemente de la solubilidad intrínseca del fármaco):

$$EC = \frac{[SL]}{[L]} = S_0 \cdot K_{1:1} = \frac{b_1}{(1-b_1)} \quad (\text{ec. 4})$$

2.4. Inclusión del β-estradiol en chitosano

Se prepararon geles de chitosano al 2% p/p conteniendo β-estradiol (2 mg/mL) e HPγCD al 2,5% y 10% p/p. Para ello se partió de disoluciones de β-estradiol (4 mg/mL) en HPγCD al 5% y 20% respectivamente, que se mantuvieron en agitación durante 24 h y finalmente se añadió un volumen equivalente de chitosano al 4% p/p.

Para entrecruzar los geles preparados, con ayuda de una jeringa, se depositaron alícuotas de 100 µL de gel sobre 1 mL de tripolifosfato (TPP) al 5% p/v y se mantuvo en agitación orbital suave (100 rpm, agitador *Grant bio POS-300*) durante 30 min.

Transcurrido ese tiempo, se retiró el TPP y se lavó la matriz resultante dos veces con agua (alícuotas de 1 mL). Finalmente, se determinó mediante espectrofotometría a 280 nm el β -estradiol que no se incorporó y quedó en la disolución de TPP y en el agua de lavado.

El rendimiento de incorporación del fármaco en el sistema final se calculó por diferencia entre la cantidad teórica de fármaco incluida en el gel y la cantidad de fármaco presente en el TPP y los lavados.

2.5. Ensayo de liberación

A 200 μ L de cada uno de los geles (conteniendo un 2,5% ó 10% de HP γ CD) entrecruzados y lavados, se añadieron 2 ml de medio de cesión (MeOH:Agua, 70:30) y se incubó en estufa a 37°C. A determinados intervalos de tiempo (1, 4, 10 y 24 días) se tomaron alícuotas del medio (0,5 mL) y se determinaron espectrofotométricamente (280 nm) las concentraciones de β -estradiol. Cada una de las alícuotas extraídas se devuelve al vial de partida para continuar el ensayo. El ensayo se realiza por cuatriplicado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Validación de los métodos analíticos

En la figura 3 se recoge la recta de calibrado de ciprofloxacino en tampón fosfato (pH=7,4), así como el análisis de la varianza correspondiente en la tabla 1.

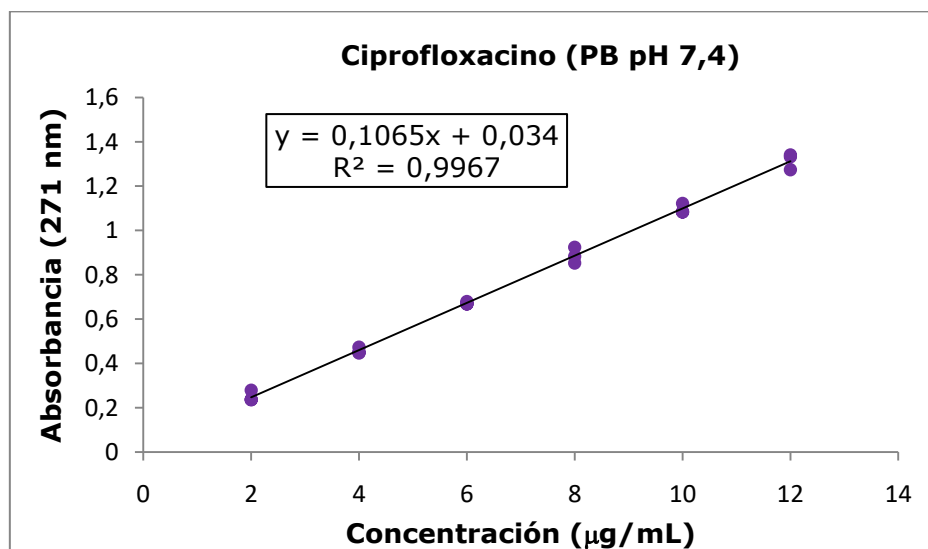


Figura 3. Recta de calibrado de ciprofloxacino en tampón fosfato, pH=7,4.

Origen de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F calculadas
TOTAL	2,3916	17		
REGRESIÓN	2,3836	1	2,3836	4781,0148
RESIDUAL	0,0080	16	0,0005	
D.L.	0,0001	4	0,0000	0,0505
ERROR	0,0078	12	0,0007	

Tabla 1. Análisis de la varianza de la regresión lineal (ciprofloxacino)

Comprobación de hipótesis ($\alpha=0.05$)

$H_0: b_0 = 0$ $H_1: b_0 \neq 0$	tcal = 2,8294	t tab = 2,1199	Se rechaza la hipótesis nula (H_0)
$H_0: b_1 = 0$ $H_1: b_1 \neq 0$	Fcal = 4781,0148	F tab = 4,4940	Se rechaza la hipótesis nula (H_0)
H_0 : No existe DL H_1 : Existe DL	Fcal = 0,0505	F tab = 3,2592	Se acepta la hipótesis nula (H_0)

Coefficiente de variación del método (CV) = 2,86%

En la figura 4 se recoge la recta de calibrado de β -estradiol en Metanol:agua (70:30) y en la tabla 2 el análisis de la varianza correspondiente.

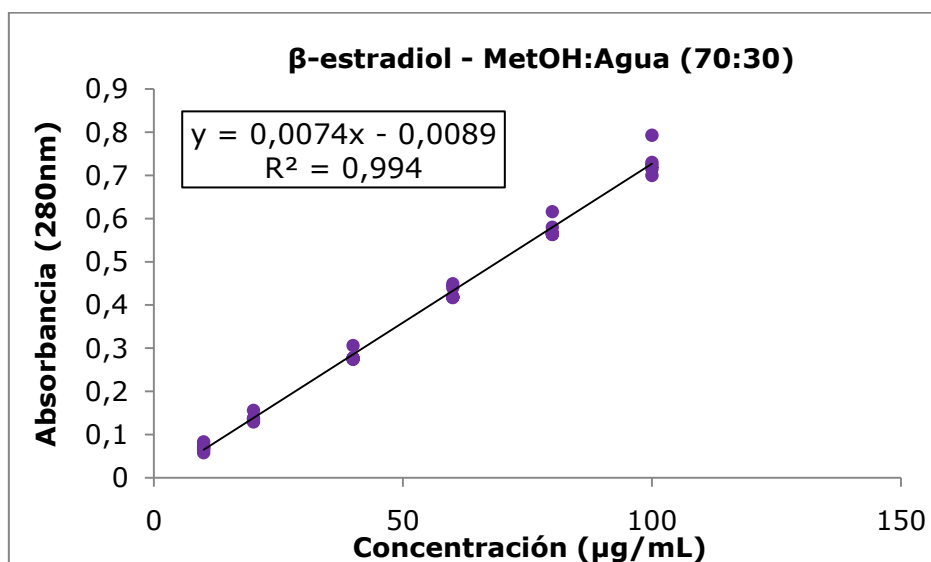


Figura 4. Recta de calibrado de β -estradiol en Metanol:agua (70:30)

Origen de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F calculadas
TOTAL	1,6575	29		
REGRESIÓN	1,6476	1	1,6476	4642,5240
RESIDUAL	0,0099	28	0,0004	
D.L.	0,0004	4	0,0001	0,2523
ERROR	0,0095	24	0,0004	

Tabla 2. Análisis de la varianza de la regresión lineal (β -estradiol)

Comprobación de hipótesis ($\alpha=0.05$)

H ₀ : b ₀ = 0 H ₁ : b ₀ ≠ 0	tcal = -1,3618	t tab = 2,0484	Se acepta la hipótesis nula (H ₀)
H ₀ : b ₁ = 0 H ₁ : b ₁ ≠ 0	Fcal = 4642,5240	F tab = 4,1960	Se rechaza la hipótesis nula (H ₀)
H ₀ : No existe DL H ₁ : Existe DL	Fcal = 0,2523	F tab = 2,7763	Se acepta la hipótesis nula (H ₀)

Coefficiente de variación del método (CV) = 5,07%

3.2. Complejo fármaco-ciclodextrina

Son varias las razones por las que se eligieron los hidroxipropil derivados de β y γ -ciclodextrinas para llevar a cabo los ensayos de solubilización de los fármacos propuestos y, más concretamente, para el β -estradiol. En primer lugar, los hidroxipropil derivados presentan una mayor solubilidad acuosa (4) y una menor toxicidad para su administración por vía parenteral (8) comparado con las correspondientes β y γ ciclodextrinas. Por otro lado, tanto el ciprofloxacino como el β -estradiol son fármacos de estructura policíclica y voluminosa que requerirían de una ciclodextrina de dimensiones apropiadas (β o γ) en la que la molécula del fármaco pueda ser incluida (1). Tras una revisión bibliográfica se encontró un estudio de solubilización de ciprofloxacino utilizando HP- β -CD (9). Se repitió este estudio para comparar los resultados y a la vista de los mismos se decidió usar la HP- γ -CD (cavidad interna con mayores dimensiones) para realizar el estudio con el β -estradiol.

Los diagramas de fase obtenidos tanto para el ciprofloxacino (figura 5) como para el β -estradiol (figura 6) muestran un perfil de tipo A_L, es decir, existe una correlación lineal entre la solubilidad del fármaco y la concentración de ciclodextrina (ec. 2). Dado que, en ambos casos, la pendiente de la recta de regresión es inferior a la unidad, se asume que cualquiera de los dos fármacos forma con la correspondiente ciclodextrina un complejo de estequiometría 1:1 (1).

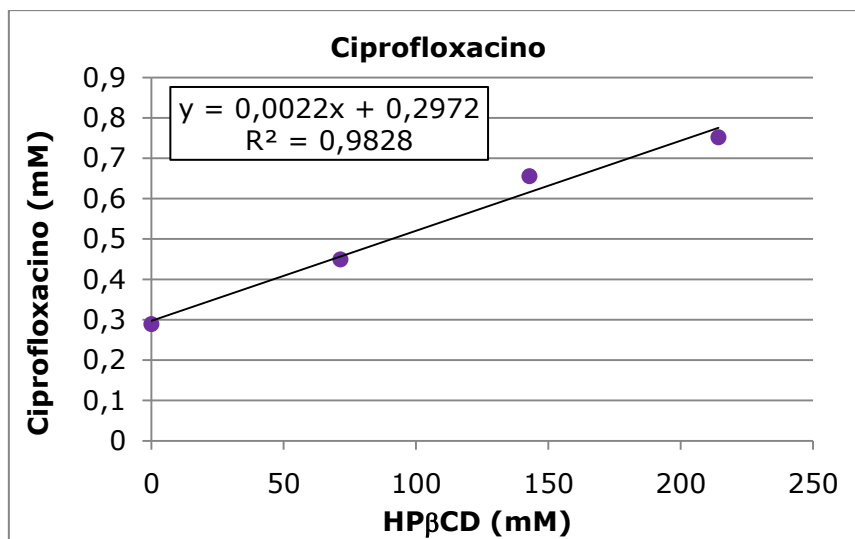


Figura 5. Diagrama de solubilidad de fases del ciprofloxacino con hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD).

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,2972	0,0279	10,6401	0,0087	0,1770	0,4174
Variable X 1	0,0022	0,0002	10,6759	0,0087	0,0013	0,0031

Tabla 3. Coeficientes de regresión estimados y su error estándar del diagrama de solubilidad de fases ciprofloxacino-HPβCD. α=0.05.

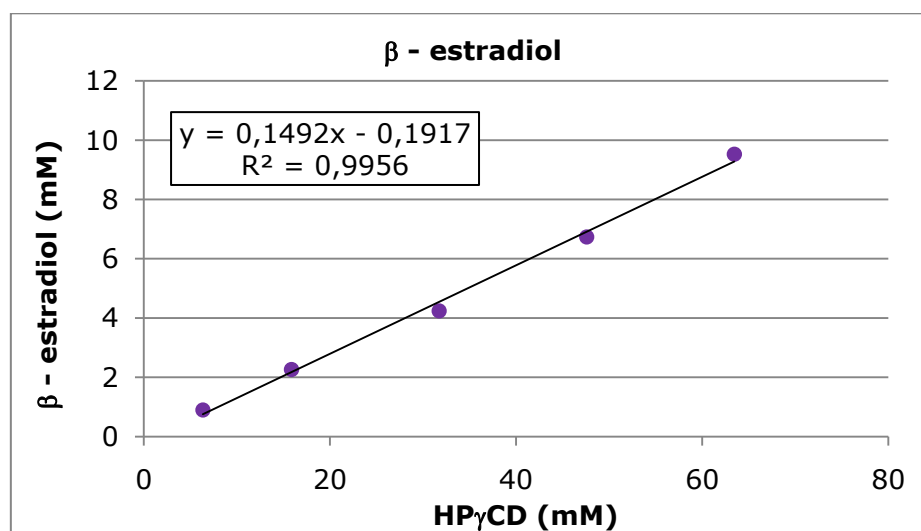


Figura 6. Diagrama de solubilidad de fases del β-estradiol con hidroxipropil-γ-ciclodextrina (HPγCD).

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-0,1917	0,2237	-0,8571	0,4544	-0,9037	0,5202
Variable X 1	0,1492	0,0057	25,9901	0,0001	0,1310	0,1675

Tabla 4. Coeficientes de regresión estimados y su error estándar del diagrama de solubilidad de fases β -estradiol-HP γ CD. $\alpha=0.05$.

La constante de asociación del complejo ciprofloxacino-HP β CD determinada (ec. 3) fue $7,63 \text{ M}^{-1}$ y $7,42 \text{ M}^{-1}$ según se utilizase la solubilidad intrínseca del fármaco determinada experimentalmente, $95,78 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ($0,2891 \text{ mM}$) o bien el valor de la ordenada en el origen de la recta del perfil de solubilización, $98,49 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ($0,2972 \text{ mM}$) (figura 5) respectivamente. En cualquiera de los casos, el valor de la constante de asociación obtenido difiere de forma importante con el recogido en el estudio citado (9), que aportan un valor de 83 M^{-1} . La principal causa de esta discrepancia creemos que se debe al valor de solubilidad intrínseca usada por estos autores ($2,93 \text{ } \mu\text{g/mL}$) y que no se corresponde con el valor de ordenada en el origen del perfil de solubilidad de fases que presentan.

En el caso del β -estradiol, no se pudo estimar la constante de asociación con la HP γ CD ya que no se disponía de la solubilidad intrínseca del mismo. Experimentalmente, los niveles de β -estradiol en agua (sin HP γ CD) quedaron por debajo del límite de detección del método, por lo que no se pudieron medir. Tampoco se pudo estimar la solubilidad intrínseca del β -estradiol a partir de la ordenada en el origen de la recta de regresión del perfil de solubilización, ya que como se puede comprobar (figura 6) presenta un valor negativo (estadísticamente igual a cero (tabla 4)).

Por ello, para caracterizar la unión de fármaco-ciclodextrina se ha utilizado la estimación de la eficacia de complejación (EC). La EC nos da una medida de la proporción de moléculas de ciclodextrina complejadas con respecto al total. Este parámetro es independiente de la solubilidad intrínseca del fármaco, la cual está sometida a error en su determinación, especialmente en el caso de fármacos cuya solubilidad intrínseca (S_0) sea inferior a 1 mg/mL (3).

La EC del ciprofloxacino con HP- β -CD resultó ser muy baja, del 0,22%. En el caso del β -estradiol, la EC con HP γ CD fue del 17,25%.

3.3. Preparación de gel de quitosano conteniendo β -estradiol y entrecruzado

A partir de los datos de solubilización del β -estradiol con HP γ CD, se preparan dos formulaciones de geles de quitosano 2% conteniendo un 0,2% p/v de β -estradiol. Según la formulación, el β -estradiol (2 mg/mL) se incorporó en una disolución de HP γ CD al 10% p/p, con lo que estaba totalmente disuelto, o bien en una disolución de HP γ CD al 2,5% p/p, en la que se encontraba sólo parcialmente disuelto. De cada una de las formulaciones descritas se preparan 4 lotes, cada uno de ellos obtenido a partir del entrecruzamiento de dos alícuotas de $100 \text{ } \mu\text{L}$ de gel. Los rendimientos de incorporación de β -estradiol obtenidos para cada formulación se recogen en la tabla 5.

LOTE	1	2	3	4	Media (%)	Desviación estándar
Gel CHT 2% conteniendo β -estradiol 0,2%/ HP γ CD 10%	26,48	25,27	25,00	25,54	25,40	0,65
Gel CHT 2% conteniendo β -estradiol 0,2%/ HP γ CD 2,5%	69,23	70,72	69,91	68,80	69,57	0,83

Tabla 5. Rendimiento de incorporación de β -estradiol con HP γ CD (10% y 2,5%) a Chitosano 2% (CHT) entrecruzado con tripolifosfato.

Durante el proceso de entrecruzado del Chitosano se produce una pérdida del fármaco que varía dependiendo de la forma en la que se haya incorporado en el gel. El rendimiento de incorporación es mayor (70%) cuando el β -estradiol se incorpora solo parcialmente disuelto que cuando está totalmente disuelto (25%) en la solución de ciclodextrina. Es importante destacar que la uniformidad en la incorporación del β -estradiol y por tanto su dispersión previa en el gel, es buena, aún cuando no se encuentre totalmente disuelto en el mismo.

3.4. Liberación del β -estradiol desde Chitosano.

El perfil de liberación que presentan el β -estradiol desde las dos formulaciones elaboradas es similar (figura 7), una liberación inicial importante (entre el 50% y 80%) durante el primer día, sin que se observe una liberación posterior en los siguientes 24 días de ensayo.

El porcentaje liberado es mayor, alrededor del 80%, desde la formulación en la que el β -estradiol se incorporó en forma parcialmente dispersa (en HP γ CD al 2,5%), en comparación con el 55% liberado desde la formulación en la que se incorporó totalmente disuelto (HP γ CD al 10%) (figura 7). En este caso, el mayor porcentaje de fármaco retenido cuando se incorpora disuelto, podría ser debido a una mayor interacción o dispersión más homogénea del complejo del fármaco-CD dentro de la matriz sólida de quitosano, lo que favorecería el atrapamiento en la misma.

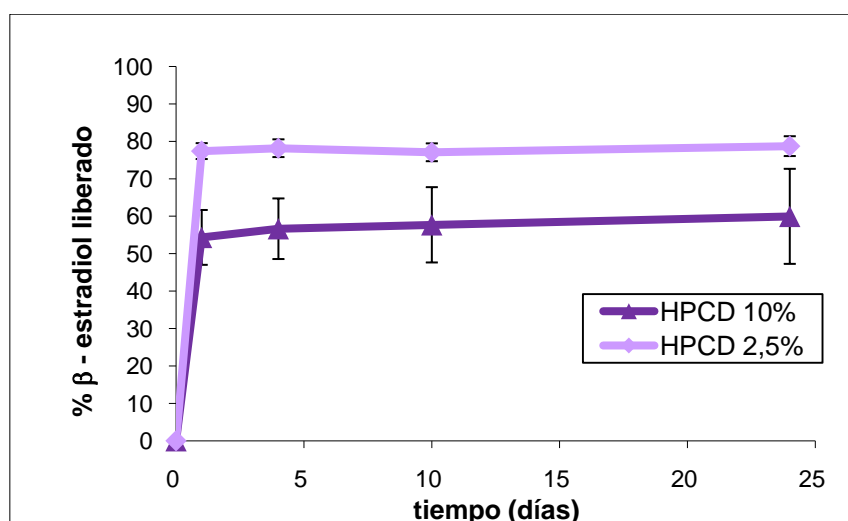


Figura 7. Perfil de liberación del β -estradiol incorporado en HP γ CD al 2,5% y 10 %, desde el gel de CHT al 2% entrecruzado con TPP. En MetOH:agua (70:30) a 37°C. n=4.

Este es un estudio preliminar en el que fundamentalmente nos hemos centrado en la solubilización del β -estradiol mediante la formación de un complejo con HP γ CD. En cuanto al sistema de liberación elaborado a base de quitosano, éste no presenta las características adecuadas para una liberación sostenida del β -estradiol por tiempo prolongado para su uso en regeneración ósea en osteoporosis. Sería necesario estudiar el efecto de otras variables como, por ejemplo, la concentración de quitosano, su grado de deacetilación, la concentración de agente entrecruzante, etc, que permitan optimizar el rendimiento de incorporación y posterior perfil de liberación del β -estradiol. Como alternativa, también se podrían usar otros polímeros de tipo hidrogel con los que se pudiese modular más fácilmente el grado de entrecruzamiento y con ello la consistencia del gel y liberación del fármaco, manteniendo al mismo tiempo su inyectabilidad.

4. CONCLUSIONES

- La HP γ CD permite una solubilización del β -estradiol con un perfil lineal (de tipo A_L) mediante formación de complejos de estequiometría 1:1, con una eficacia de complejación del 17%.
- El rendimiento de la incorporación del fármaco al quitosano varía según se incluya disperso o disuelto, siendo mayor en el primer caso.
- La liberación del fármaco desde ambos sistemas es rápida aunque incompleta. En ambos casos queda un remanente de fármaco incluido en la matriz de quitosano que no se libera, *in vitro*, en el periodo de tiempo ensayado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jambhekar SS, Philip B. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. *Drug discovery today*. 21 (2016) 356-362.
2. Jambhekar SS, Breen P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations II: solubilization, binding constant, and complexation efficiency. *Drug discovery today*. 21 (2016) 363-368.
3. Loftsson T, Hreinsdóttir D, Másson M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *International journal of pharmaceutics*. 302 (2005) 18-28.
4. Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced drug delivery reviews*. 59 (2007) 645-666.
5. Loftsson T, Brewster ME. Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. *Journal of pharmaceutical sciences*. *Journal of pharmaceutical sciences*. 101 (2012) 3019-3032.
6. Bugnicourt L, Ladavière C. Interests of chitosan nanoparticles ionically cross-linked with tripolyphosphate for biomedical applications. *Progress in polymer science*. 60 (2016) 1-17.
7. Higuchi T, Connors K. Phase solubility techniques. *Advances in analytical and chemistry instrumentation*. 4 (1965) 117-212.
8. European Medicines Agency. [Online]. Background review for cyclodextrins used as excipients. (2014) Citado: Marzo 2017. Disponible online: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2014/12/WC500177936.pdf.
9. Bozkir A, Fusun Denli Z, Basaran B. Effect of hydroxypropyl - beta - cyclodextrin on the solubility, stability and in - vitro release of ciprofloxacin for ocular drug delivery. *Acta poloniae Pharmaceutica drug research*. 69 (2012) 719-724.
10. Crestani de Miranda J, Azevedo Martins TE, Veiga F, Gomes Ferraz H. Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*. 47 (2011) 666-681.
11. Rodriguez Tenreiro C, Alvarez Lorenzo C, Rodríguez Pérez A, Concheiro A, Torres Labandeira JJ. Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 66 (2007) 55-62.
12. Chattopadhyay DP, Inamdar MS. Aqueous behaviour of chitosan. *International journal of polymer science*. 2010 (2010) 1-7.