UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA

DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DESARROLLO DE MATRICES SOL-GEL COMO ALTERNATIVA PARA MEJORAR LA ESTABILIDAD DE IBUPROFENO O DE INDOMETACINA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

RODRIGO DE SANTIAGO PEÑA

DIRECTOR

M. EN C. ELIZABETH GUADALUPE SÁNCHEZ GONZÁLEZ.

ASESOR

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD.

MAYO 2014

Contenido

1. Introducción 6

2. Marco Teórico. 7

2.1 Sol-gel. 7

2.1.1 Historia del proceso sol-gel. 7

2.1.2 Etapas del proceso Sol-Gel. 8

2.1.3 Efecto del catalizador. 10

2.1.4 Ventajas y desventajas del proceso de sol-gel. 11

2.1.5 Encapsulación y estabilidad de moléculas en matrices sol-gel. 11

2.1.6 Agentes estabilizadores. 13

2.2 Estabilidad de fármacos. 14

2.2.1 Rutas de degradación química. 15

2.2.2 Degradación física. 16

2.3 Fármacos AINE´s estudiados. 17

2.3.1 Ibuprofeno. 17

Espectro infrarrojo de Ibuprofeno[26] 18

2.3.2 Indometacina. 19

Espectro infrarrojo de la Indometacina[26]. 20

2.4 Métodos analíticos para evaluar estabilidad. 21

2.4.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). 21

3. Planteamiento del problema 23

4. Objetivos. 24

4.1 Objetivo general. 24

4.2 Objetivos particulares. 24

5. Hipótesis. 25

6. Diseño experimental 26

6.1 Tipo de estudio. 26

6.2 Población de estudio. 26

6.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación. 26

6.4 Variables. 26

7. Desarrollo Experimental. 27

7.1 Materiales. 27

7.1.1 Reactivos. 27

7.1.2 Principio Activo. 27

7.1.3 Instrumentos. 27

7.1.4 Equipo. 28

7.2 Metodología. 28

7.2.1. Elaboración de las matrices de sol-gel. 28

7.2.2 Elaboración de las matrices sol-gel con Ibuprofeno e Indometacina. 28

7.2.3 Estabilidad de las matrices sol-gel con Ibuprofeno e Indometacina. 29

7.2.4 Estabilidad de los fármacos no contenidos en la matriz. 30

7.2.5 Caracterización de los fármacos Ibuprofeno e Indometacina. 30

7.2.6 Obtención de los productos de degradación de Ibuprofeno e Indometacina. 31

7.2.7 Preparación de las muestras de matriz de Ibuprofeno. 31

7.2.8 Preparación de las muestras de matriz de Indometacina. 32

7.2.9 Evaluación de la estabilidad de los fármacos y de las matrices con fármaco. 32

8. Resultados y análisis de resultados. 33

8.1 Producción de matriz placebo 33

8.1.1 Análisis térmico 33

8.1.2 Análisis infrarrojo. 34

8.2 Caracterización de la Indometacina. 35

8.2.1 Análisis cromatográfico. 35

8.2.2 Análisis térmico. 36

8.2.3 Análisis infrarrojo. 37

8.3 Caracterización del Ibuprofeno. 38

8.3.1 Análisis cromatográfico. 38

8.3.2 Análisis térmico. 39

8.3.3 Análisis infrarrojo. 39

8.4 Fabricación de las matrices sol-gel. 41

8.5.1 Análisis térmico. 42

8.5.2 Análisis cromatográfico. 43

8.5.3 Análisis infrarrojo. 43

8.6 Estabilidad de Indometacina y de matrices de Indometacina. 45

8.7.1 Análisis cromatográfico. 57

8.7.2 Análisis térmico. 58

8.7.3 Análisis infrarrojo. 58

8.8 Estabilidad de matrices Ibuprofeno y fármaco sólo. 60

9. Conclusiones. 68

10. Referencias. 70

AGRADECIMIENTO

El desarrollo de esta tesis fue financiado en su totalidad con recursos del proyecto PAPIIT IT119211 “Matrices de componentes híbridos preparadas por el método sol-gel, para desarrollar dispositivos de liberación controlada de principios activos”, por lo que se agradece el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México.

1. Introducción

La Indometacina y el Ibuprofeno son fármacos que pertenecen a la familia de los AINE´s. Principalmente son utilizados como antiinflamatorios en el tratamiento de la artritis reumatoide. Para este tipo de tratamientos, es necesaria la ingesta frecuentemente del medicamento, por lo general por vía oral. Esta necesidad de la ingesta constante puede provocar que al paciente se le olvide la toma, tome el medicamento en horarios no adecuados, además que de manera general los AINE´s irritan la mucosa gástrica. Por todo lo anterior. es necesario buscar nuevas formulaciones que tenga un mayor beneficio al paciente y en las que el fármaco permanezca estable, tanto en el proceso de producción como en el organismo humano.

El proceso sol-gel es una técnica de encapsulación de fármacos en la que primeramente se realiza una hidrólisis de una suspensión coloidal (sol), que posteriormente se convertirá en un gel.

La estabilidad de un fármaco o un medicamento es la capacidad del mismo de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, también provee evidencia documentada de cómo las características físicas, químicas, fisicoquímicas, microbiológicas y biológicas del medicamento, varían con el tiempo bajo la influencia de factores ambientales tales como: temperatura, humedad y luz

Este trabajo se enfoca a evaluar la estabilidad de los fármacos Indometacina o Ibuprofeno que están encapsulados por el método sol-gel sometidas a diferentes condiciones (temperatura 40°C 75%HR, 60°C, 80°C, hidrólisis ácida e hidrólisis básica).

2. Marco Teórico.

2.1 Sol-gel.

2.1.1 Historia del proceso sol-gel.

Los procesos tradicionales de fabricación de vidrios y cerámicas emplean temperatura alta para transformar polvos inorgánicos en objetos densos por fusión o aglomeración. La temperatura alta y la aglomeración de los polvos limitan a menudo el orden de la microestructura, las propiedades, la forma y los rasgos de la superficie obtenida. La tecnología de sol-gel utiliza temperatura baja en procesos químicos para producir formas y superficies netas en películas, fibras, macropartículas o compuestos que pueden ser usados comercialmente.

El proceso de cerámicas produce materiales que tienen microestructuras típicamente en el rango de 1 a 100 µm de diámetro; en el proceso sol-gel puede lograrse una clasificación de micro estructuras en el rango de 1-100 nm. Estos materiales a menudo tienen características físicas y químicas únicas.[1]

El primer alcóxido metálico fue preparado por Ebelmen a partir de $SiCl_4$ y alcohol, encontró que el compuesto gelificaba a exposición atmosférica. Se realizaron estudios posteriores de la formación de geles inorgánicos a partir de sales acuosas. Posteriormente Graham demostró que el agua contenida en la sílica podía ser cambiada por solventes orgánicos, ya que el gel consiste en una red sólida con una porosidad continua.[2]

A través de sus investigaciones observaron que la hidrólisis del tetraetil ortosilicato (TEOS), $Si(OC_2H_5)_4$, en condiciones ácidas produce SiO_2, material parecido al vidrio.

El *sol* es una dispersión de partículas coloidales en un líquido. Un coloide es una suspensión en donde la fase dispersa es tan pequeña (1-1000 nm) que la fuerza gravitacional es despreciable, y las interacciones son dominadas por fuerzas de corto alcance, como la fuerza de atracción de Van der Waals. Un *gel* es una red rígida interconectada con poros micrométricos y cadenas poliméricas cuya longitud promedio es más grande que un micrómetro.[3]

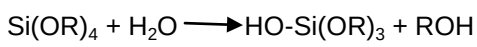
En 1969, Dislich y Hinz elaboraron la base química para la preparación de óxidos multicomponentes, la cual consistió en desarrollar los mecanismos de hidrólisis y condensación de alcóxidos. Para 1980 está técnica fue importante para la mejora de materiales existentes así como la síntesis de nuevos materiales, obteniendo también mejoras en las propiedades del material, como tamaño de poro.

Actualmente la técnica sol-gel ha abierto opciones de síntesis de nuevos materiales, obteniéndose una gran uniformidad en las propiedades del material final, cuando antes sólo se podía lograr bajo condiciones elevadas de temperatura y controlar el ambiente para el desarrollo de nuevos productos. Las limitantes en el desarrollo de la técnica sol-gel son principalmente por cuestiones económicas, sin embargo el poder sintetizar nuevos y mejores materiales han representado una alternativa para hacer la técnica sol-gel.

Las propiedades del sol-gel, por ejemplo transparencia, porosidad, tamaño de poro, funcionalidad de la superficie, dureza, entre otras, dependen del medio de preparación. Controlando las condiciones durante las etapas del proceso (hidrólisis condensación, envejecimiento y secado) es posible ajustar las características del material resultante.[1]

2.1.2 Etapas del proceso Sol-Gel.

Hidrólisis. El proceso de sol-gel comienza con la hidrólisis de los silicatos. Los precursores más usados en esta técnica son los metal-alcóxidos, debido a su fácil reactividad con el agua. La reacción se llama hidrólisis debido a que el ion hidroxilo se une al átomo metálico, como se muestra en la siguiente reacción.



$$Si(OR)_4 + H_2O \longrightarrow HO\text{-}Si(OR)_3 + ROH$$

Reacción de hidrólisis.

En donde R representa un protón u otro ligando y ROH es un alcohol.

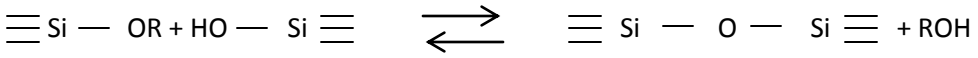
El control de la concentración de agua es de suma importancia, ya que de esto depende el tipo de sólido que se obtiene. Cuando la reacción ocurre con cantidades estequiométricas de H_2O, se

obtienen productos poliméricos; estos compuestos constituyen las especies intermediarias entre los alcóxidos monoméricos y los óxidos macromoleculares.[4]

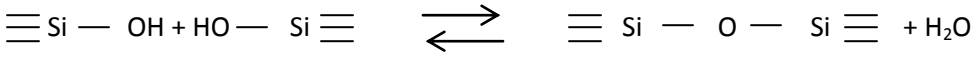
El precursor alcóxido es muy sensible a impedimento estérico. Entre más grande sea la cadena de grupos alcoxi mayor será el impedimento estérico y por lo tanto la reactividad es menor. Por lo cual la hidrólisis del tetrametoxisilano (TMOS) es más rápida que la de del tetraetoxisilano (TEOS). Tanto el alargamiento de la cadena como las ramificaciones de la cadena disminuyen la reactividad.

Debido a la naturaleza hidrofóbica de los grupos etoxi, el TEOS con el agua son inmiscibles, por lo cual es necesario agregar un cosolvente para favorecer la miscibilidad y por lo tanto la hidrólisis.
Se utilizan muchos cosolventes como: alcoholes, formamida, dimetilformamida. El uso de cosolvente es importante e influye en el proceso de secado

Condensación. Se puede realizar con agua o con alcohol.[5]



Reacción de condensación alcohólica



Reacción de condensación con agua

La condensación tiene gran importancia al momento de formarse el gel ya que, si no se controlan bien las condiciones de reacción, se puede formar un precipitado. Las reacciones de hidrólisis y condensación son muy sensibles a cambios bruscos de temperatura de reflujo, pH, concentración de H_2O, tipo de radical alquilo, naturaleza del solvente, tiempo de reacción por lo cual es necesario controlar estos factores.[4]

Gelación. La teoría de gelación desarrollada por Flory y Stockmayer se conoce como teoría clásica. Es el proceso en el que el sol se transforma en gel. Ocurre cuando se enlazan las partículas de sílica del sol y se transforman en una red tridimensional, producidas por la hidrólisis y la condensación, este gel tiene una viscosidad inicial alta, pero baja elasticidad.

Envejecimiento. La velocidad dependerá del pH, temperatura y composición del gel. Como resultado final se obtiene el endurecimiento y encogimiento. Esto es debido a un proceso llamado sinéresis, en el cual el gel se contrae para permitir la expulsión del líquido de los poros, así el gel homogéneo cambia de apariencia a un gel transparente sólido inmerso en líquido. Durante el envejecimiento el gel se endurece por la formación de enlaces cruzados.

Secado. Pérdida de los componentes volátiles, primero por sinéresis, después de la evaporación del líquido dentro de la estructura del poro que produce la tensión capilar y fisura del sólido.

Densificación. Tratamiento térmico que permite que se forme un cerámico denso.[5]

2.1.3 Efecto del catalizador.

Los catalizadores se usan para cambiar la velocidad de una reacción química, formando parte de ella pero sin ser un reactivo. Los catalizadores ácidos o básicos influyen en las velocidades tanto de hidrólisis como de condensación y en la estructura del producto condensado. Los ácidos sirven para protonar a los grupos alcoxi cargados negativamente, cuando se realiza una condensación catalizada por un ácido la reacción es finalizada resultando en polímeros menos ramificados.

En condiciones alcalinas se producen nucleófilos, de esta manera la condensación básica produce cadenas ramificadas en vez de cadenas lineales y grandes.[1]

2.1.4 Ventajas y desventajas del proceso de sol-gel.

Las ventajas que pueden obtenerse del proceso sol-gel para la síntesis de materiales es la gran variedad de estructuras que se pueden sintetizar. Estos materiales pueden encapsular sustancias o fármacos que pueden ser liberadas en un órgano específico. Las fibras cerámicas se sintetizan a baja temperatura con alta pureza. Los precursores como los alcóxidos son frecuentemente volátiles y fáciles de purificar,

Algunas de las desventajas del proceso son los altos costos, la escala de la producción es limitada, no hay mucha relación entre el desarrollo tecnológico y el proceso sol-gel.[6]

2.1.5 Encapsulación y estabilidad de moléculas en matrices sol-gel.

Desde 1990 la tecnología sol-gel ha sido usada para encapsular una gran variedad de moléculas desde colorantes, aceites, hasta biomoléculas como enzimas, proteínas y bacterias u otras células. La encapsulación se realiza con la adición de las moléculas durante la formación de la red de óxido a temperatura ambiente.[21]

Una gran cantidad de enzimas han sido encapsuladas dentro de matrices sol-gel, mostrando que la enzima mantiene su actividad catalítica, y también puede ser protegida de la degradación.[22]

Ellerby *y cols.* describieron el procedimiento específico de encapsulación de las enzimas que posteriormente se estandarizó para muchos experimentos. El primer paso de este procedimiento es la hidrólisis del alcóxido en agua, agregar el catalizador. El segundo paso es agregar una solución buffer de pH cercano a 7 para evitar la desnaturalización de la enzima por el ácido.[23]

Las enzimas encapsuladas tienen una mejor actividad y tiempos de vida más largos que las enzimas libres. Esto debido a que la movilidad dentro de la matriz es restringida, evitando así la desnaturalización, así como la degradación incluso cuando es expuesta a condiciones de estrés (temperatura, pH, solventes)

La enzima creatincinasa encapsulada en sol-gel fue protegida de la degradación térmica. La enzima encapsulada conservó un 50% de su actividad exponiendola a una temperatura de 47°C en

125 horas, mientra que la enzima libre a las 13 horas conservó la misma cantidad a las mismas condiciones.

Los altos niveles de protección contra las condiciones agresivas de pH se demostraron con la encapsulación de las fosfatasas en las matrices. La fosfatasa alcalina normalmente tiene su actividad óptima a pH de 9.5, y en encapsulación puede seguir manteniendo su efectividad en un pH tan bajo como 0.9. Esto se puede deber al hecho que debido a la limitación del espacio dentro de los poros las proteínas sólo están rodeadas por una o dos capas de agua por lo cual solo unas cuantas moléculas de agua podrían ser protonadas para formar H_3O^+ lo cual no sería lo suficientemente ácido para permitir la desnaturalización de la enzima (Figura 1) [22]

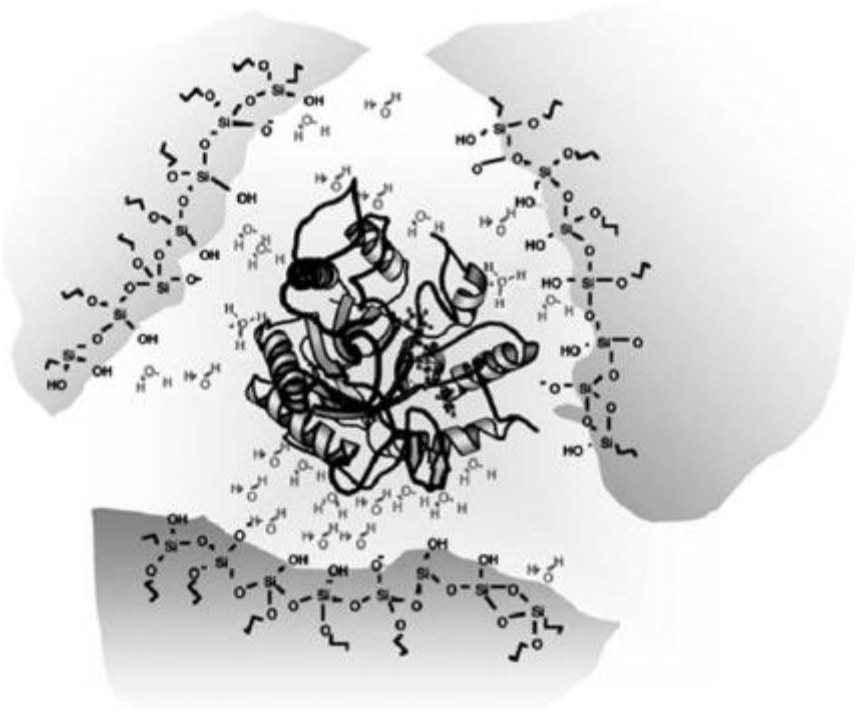


Figura 1. La estabilidad de las enzimas encapsuladas en las matrices sol-gel se debe a varios factores, como la rigidez del espacio en el que se encuentra, que inhibe la desnaturalización debido a que impide el movimiento de la molécula[22]

La cantidad o incluso la presencia de alcohol en las matrices afecta a la molécula dentro de la matriz. Para evitar este inconveniente es necesario remover el etanol a vacío con el fin de obtener una solución completamente hidrolizada antes de agregar la enzima.[22]

En un estudio se ha incorporado la dopamina a matrices sol-gel para el tratamiento del Parkinson como implantes intracraneales, ya que permite la liberación gradual y prolongada del fármaco. Se evaluó la estabilidad de la dopamina en la matriz realizando estudios de RMN, observando que no hay degradación de la dopamina, formando puentes de hidrógeno débiles con los grupos Si-OH.[25]

Es muy importante controlar la estructura del gel para una mejor liberación así como estabilidad de la molécula contenida en la matriz. Por ejemplo, el cambio de catalizador de básico a ácido puede cambiar la estructura, aumentando o disminuyendo el tamaño del poro.[21]

Los diferentes estudios de encapsulación de moléculas han demostrado que se mantienen las características tanto químicas como bioquímicas: fermentación, capacidad oxido-reductiva así como la actividad enzimática.[24]

2.1.6 Agentes estabilizadores.

Azúcar (sorbitol) y algunos aminoácidos (N-metilglicina) como aditivos son utilizados para estabilizar algunas enzimas dentro de las matrices de sol-gel.

La Quimotripsina y la ribonucleasa TI se han encapsulado en presencia de sorbitol y N-metilglicina incrementando significativamente la estabilidad térmica así como la actividad biológica, por el incremento del tamaño de poro y la hidratación.[22]

Algunos polimeros se han utilizado como aditivos para formar geles orgánico-inorgánico con el fin de reducir el encogimiento de la matriz para evitar que puedan desnaturalizarse algunas proteínas. Se han obtenido buenos resultados con la hidroxietil carboximetil celulosa disminuyendo significativamente el encogimiento del poro y conservando la estructura del xerogel.[22]

2.2 Estabilidad de fármacos.

La estabilidad es la capacidad de un fármaco o un medicamento de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil. Así mismo, provee evidencia documentada de cómo las características físicas, químicas, fisicoquímicas, microbiológicas y biológicas del medicamento, varían con el tiempo bajo la influencia de factores ambientales tales como: temperatura, humedad y luz.[7]

La forma más fácil de entender la inestabilidad de un fármaco y la más estudiada es la pérdida de fármaco a través de una reacción química, dando como resultado la reducción de la potencia del mismo.

Algunas de las razones más importantes por las que se estudia la degradación del fármaco son:[8]

- El fármaco puede formar productos de degradación tóxicos. Es importante determinar no sólo la cantidad de fármaco perdida durante un tiempo determinado sino conocer en qué se está degradando. En algunos casos los productos de degradación son conocidos por su toxicidad o en algunos casos se llegan a formar productos intermediarios que se sabe o se sospecha pueden ser tóxicos, ejemplo las penicilinas
- La degradación del fármaco puede formar productos estéticamente inaceptables. Presuntivamente algunos productos se cree que pueden ser adulterados si tienen cambios significativos en el color, olor.
- El formulador debe demostrar que el fármaco es estable bajo condiciones de pH donde será el sitio de acción del fármaco, por ejemplo el pH gástrico.[8]

2.2.1 Rutas de degradación química.

Los fármacos tienen diversas estructuras moleculares y por lo tanto son susceptibles a varias rutas de degradación. Dentro de las rutas posibles de degradación se encuentran hidrólisis, deshidrogenación, isomerización, oxidación, fotólisis así como interacción con excipientes y otros fármacos, por lo que es de suma importancia poder predecir la inestabilidad del fármaco basados en la estructura molecular.[9]

- **Hidrólisis.**

  Es la ruta de degradación más común de los fármacos que contienen grupos funcionales como ésteres y amidas. La mayoría de los productos parenterales son los que están expuestos, ya que el contacto con el agua puede producir esta degradación.

- **Oxidación.**

  La oxidación es una ruta de degradación muy conocida y que le ocurre a varios fármacos. El oxígeno participa en la mayoría de las reacciones de degradación, ya que está en abundancia en el ambiente y es expuesto el fármaco durante el proceso de fabricación o en el almacenamiento.

  El mecanismo de oxidación de las sustancias depende de la estructura química del fármaco así como de la presencia de otros oxidantes[8].

- **Interacción fármaco-excipiente y fármaco-fármaco.**

  Los medicamentos rara vez se formulan sólo con el principio activo, ya que es necesario agregar aditivos o excipientes en el proceso de fabricación o dentro de la misma formulación se ponen dos fármacos, por lo que es necesario realizar estudios de estabilidad para conocer si habrá interacción entre los fármacos o con algún excipiente.[8]

2.2.2 Degradación física.

Los componentes de una forma farmacéutica (fármacos y excipientes) se encuentran en varios estados físicos, por ejemplo amorfos, varios tipos de cristales, hidratos y solvatos. Con el tiempo los fármacos o alguno de los excipientes pueden cambiar su forma de un estado usualmente inestable o metaestable a uno termodinámicamente más estable.

Algunos cambios físicos que pueden sufrir los fármacos o los excipientes son:

- Cristalización de fármacos amorfos.
- Transición en estados cristalinos.
- Formación y crecimiento de los cristales.[9]

La estabilidad de un fármaco tiene un papel importante en el desarrollo de productos farmacéuticos ya que afecta la pureza, potencia y seguridad del producto farmacéutico.[9]

2.3 Fármacos AINE´s estudiados.

2.3.1 Ibuprofeno.

Ácido 2-(4-isobutilfenil)propiónico

$C_{13}H_{18}O_2$ PM 206.3

CAS 15687-27-1

Polvo blanco cristalino p.f. 75°C a 78°C

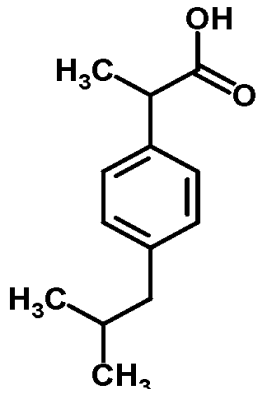


Figura 2. Estructura de Ibuprofeno

Prácticamente insoluble en agua, soluble 1 en 1.5 de etanol, 1 en 1 de cloroformo y 1 en 2 de éter.[26]

El Ibuprofeno es un fármaco perteneciente al grupo de los AINE (anti-inflamatorios no esteroidales). Este fármaco es utilizado en una gran variedad de medicamentos orales como: tabletas, suspensiones, pellets de gel y que son usadas en todo el mundo tanto por su eficiencia como por su tolerancia.[10]

El Ibuprofeno es un fármaco derivado del ácido 2-fenilpropiónico. Los profenos se han aplicado con éxito en el tratamiento de pacientes que sufren de artritis reumatoide debido a que disminuyen drásticamente el dolor y la inflamación provocadas por esta enfermedad.

El Ibuprofeno es un sólido incoloro, cristalino, estable, el cual presenta dos estereoisómeros debido a la presencia de un carbono quiral en la cadena del ácido: el S(+)-Ibuprofeno y el R(-)-Ibuprofeno.[11]

Una diferencia entre los cristales de dexibuprofeno e Ibuprofeno son los puntos de fusión (52.1±0.3°C y 75.3±0.3°C) respectivamente.[27]

El Ibuprofeno se degrada con la temperatura y dentro de los productos de degradación existen al menos dos: 4-isobutilacetofenona y el ácido 2-[4-isobutiril-fenil] propiónico.[12]

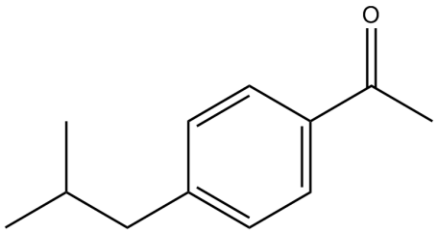
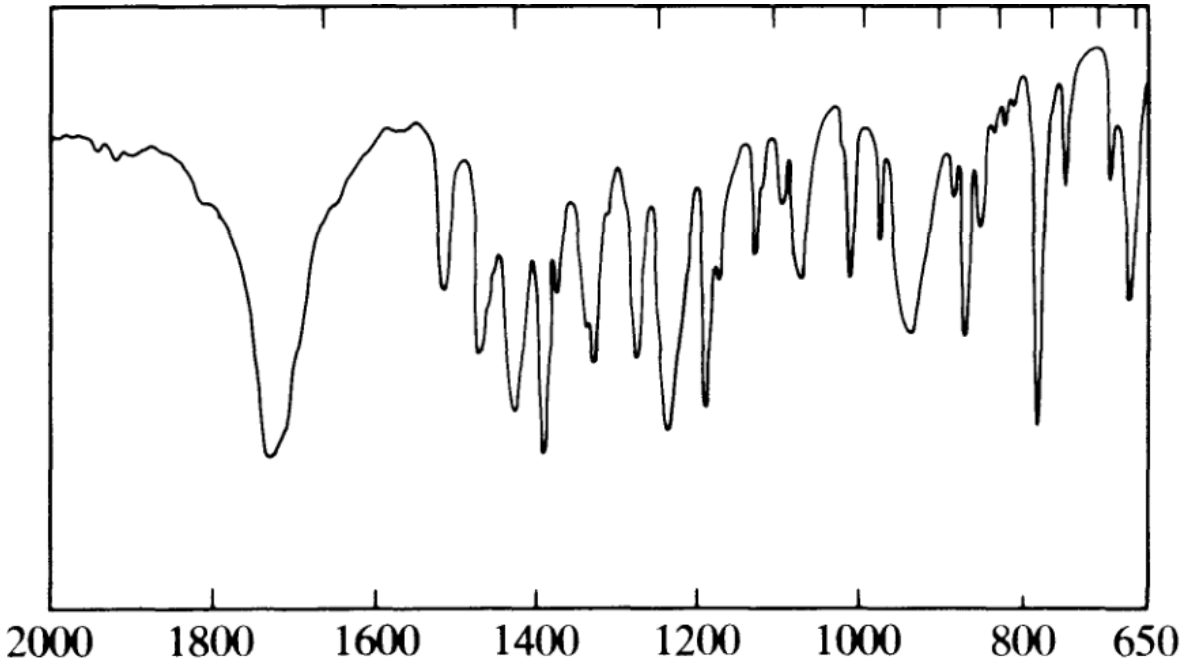


Figura 3. Estructura 4-isobutilacetofenona.

Espectro infrarrojo de Ibuprofeno[26]



2.3.2 Indometacina.

Ácido [1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-il]acético

$C_{19}H_{16}ClNO_4$ PM 357.8

CAS -53-86-1

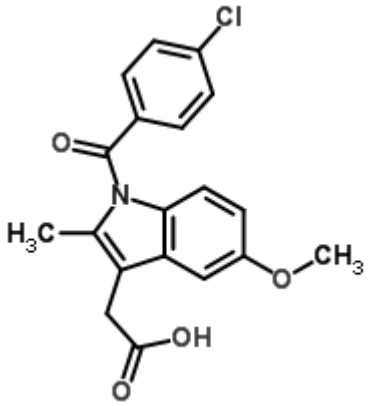


Figura 4. Estructura de Indometacina

Polvo cristalino blanco a ligeramente amarillento p.f. 158°C a 162°C presenta polimorfismo.

Prácticamente insoluble en agua, soluble 1 en 50 de etanol, 1 en 30 de cloroformo y 1 en 40 de éter; soluble en acetona.

pK_a 4.5 Log *P* (octanol/pH 7.4) -1.0. [26]

Es uno de los fármacos AINE´s con más potencia utilizados en el tratamiento anti-inflamatorio reumático y no reumático[13] Es un derivado metilado del indol introducido en terapéutica para el tratamiento de la artritis reumatoide y trastornos relacionados como la gota aguda.

Su comportamiento térmico muestra un punto de fusión entre 155 y 162ºC dependiendo del polimorfo estudiado[14]

Por la degradación de la Indometacina se pueden encontrar dos productos: ácido 4-cloro benzoico y el ácido 5-metoxi-2-metilindolacético, estos productos son monitoreados durante el proceso de manufactura siendo control de calidad para el producto final[15]. Por hidrólisis alcalina se obtiene p-cloro benzoato y el 2-metil-5-metoxi indol-3-acetato[14]

Principales productos de degradación de la Indometacina

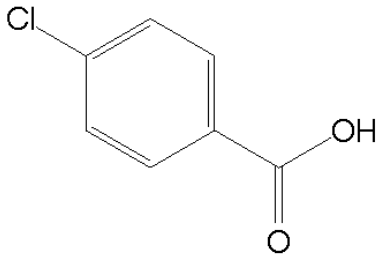


Figura 5. Estructura ácido 4-cloro benzoico

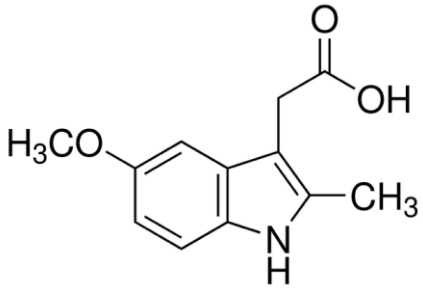
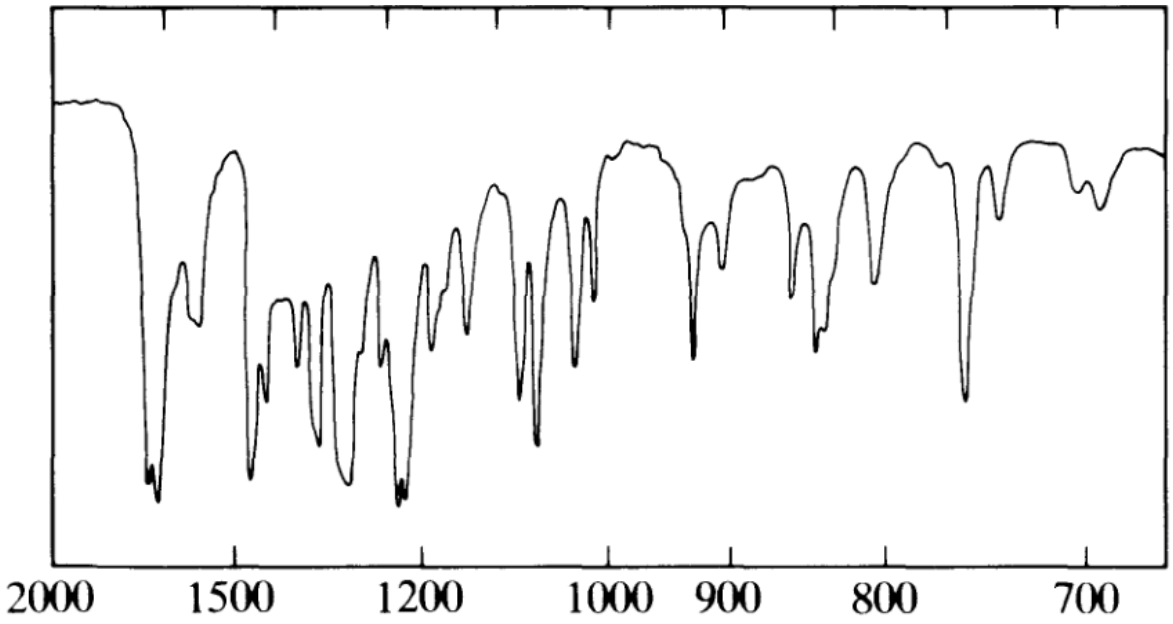


Figura 6. ácido 5-metoxi-2-metilindolacético.

Espectro infrarrojo de la Indometacina[26].



2.4 Métodos analíticos para evaluar estabilidad.

Los métodos analíticos cuantitativos se basan en las características estructurales, propiedades químicas o biológicas, los cuales distinguen a cada ingrediente activo.

Un método indicativo de estabilidad es un procedimiento analítico que puede discernir entre el ingrediente activo, de algún producto o productos de degradación. Debe ser lo suficientemente sensible para detectar y cuantificar uno o más productos de degradación.

2.4.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Es una técnica analítica ampliamente utilizada. Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general.

Algunos ejemplos de estos materiales incluyen: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, plaguicidas, especies organometálicas y una variedad de sustancias inorgánicas.

La cromatografía de líquidos de alta resolución utiliza una presión elevada para forzar al disolvente que pase por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución.

El equipo de CLAR consta de un sistema de suministro de solvente, una válvula de inyección de muestra, una columna de alta presión, un detector y un ordenador para controlar el equipo y visualizar los resultados. Actualmente muchos equipos incluyen además un horno para controlar la temperatura de la columna.

El soporte más común en CLAR son partículas microporosas esféricas de sílice muy pura, que son permeables al disolvente, y que tienen un área superficial de varios centenares de metros

cuadrados por gramo. La sílice, por lo normal, se disuelve en agua a pH superior a 8, por lo que no puede utilizarse por encima de ese pH

Para aumentar la eficacia en cromatografía de se puede aumentar la velocidad de transferencia de masa entre la fase estacionaria y la fase móvil.

La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos tienen una longitud entre 10 y 30 cm. El diámetro interno de las columnas es a menudo de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 5 o 10 µm [17]

La eficacia de una columna empaquetada aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. El tamaño típico de las partículas en CLAR es de 3-10µm.

En relación con las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria, se distinguen dos tipos de cromatografía. Al principio la cromatografía de líquidos utilizaba fases estacionarias de elevada polaridad tales como el agua o el trietilenglicol soportadas sobre partículas de sílice o alúmina y como fase móvil se empleaba un disolvente poco polar, a este tipo de cromatografía se considera cromatografía en fase normal. En la de fase inversa, la fase estacionaria es no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo, y la fase móvil es relativamente polar.[18]

3. Planteamiento del problema

Uno de los usos de las matrices elaboradas por el proceso de sol-gel desde el punto de vista farmacéutico es la encapsulación de enzimas, proteínas, y diferentes principios activos para mejorar la estabilidad de tales fármacos.

Tanto la Indometacina como el Ibuprofeno pertenecen al grupo de los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE´s). La Indometacina sufre hidrólisis alcalina generando p-cloro benzoato y 2-metil-5-metoxi indol-3-acetato. El producto de degradación más importante del Ibuprofeno es la 4-isobutilacetofenona.

Debido a lo extensivo del uso de la Indometacina y el Ibuprofeno, es importante generar formulaciones que, además de permitir su liberación modificada en el organismo para prolongar sus efectos, les brinden protección de agentes externos para mejorar su estabilidad.

Es entonces necesario saber si la estabilidad de Indometacina o Ibuprofeno se ve mejorada al formularlos en matrices sol-gel. En este proyecto se propone la comparación ya sea del Ibuprofeno o de la Indometacina ”libres” contra matrices sol-gel que contienen a alguno de ellos, para establecer si existen mejoras en la estabilidad de dichos fármacos.

4. Objetivos.

4.1 Objetivo general.

Determinar si la formulación de matrices sol gel de Ibuprofeno o de Indometacina mejora la estabilidad de dichos fármacos.

4.2 Objetivos particulares.

Evaluar la estabilidad de los fármacos Ibuprofeno e Indometacina frente a diferentes factores (temperatura, humedad, pH).

Evaluar la estabilidad de los fármacos Ibuprofeno e Indometacina contenidos en matrices elaboradas por el método sol-gel frente a diferentes factores (temperatura, humedad, pH).

Comparar la estabilidad de los fármacos Ibuprofeno e Indometacina contra los de las matrices con los mismos fármacos.

5. Hipótesis.

Los fármacos Indometacina e Ibuprofeno contenidos en las matrices sol-gel tendrán una mayor estabilidad, dando pie a estudios posteriores para poder desarrollar otras formas farmacéuticas diferentes, como podrían ser las de liberación modificada, sin que exista degradación de los mismos.

6. Diseño experimental

6.1 Tipo de estudio.

- Experimental.
- Descriptivo
- Prospectivo.
- Transversal.

6.2 Población de estudio.

Matrices de sol-gel con Ibuprofeno (100mg) o de Indometacina (100mg) fabricadas en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica de la FES Zaragoza por el método sol-gel.

6.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

- Criterios de inclusión: Matrices de sol-gel que contengan 25mg de Indometacina y matrices sol-gel que contengan 25mg de Ibuprofeno.
- Criterios de exclusión: Matrices que no cumplan con criterios de aceptación.
- Criterios de eliminación: Matrices no contengan Indometacina o Ibuprofeno.

6.4 Variables.

- Hidrólisis ácida a pH=0, hidrólisis básica a pH=14.
- Temperatura 45°C, 60°C y 80°C
- Humedad Relativa 45%.

7. Desarrollo Experimental.

7.1 Materiales.

7.1.1 Reactivos.

Reactivo	Marca	Lote	Pureza
Fosfato monobásico de potasio	J.T. Baker	G13C22	99.50%
Fosfato dibásico de potasio	J.T. Baker	B14C13	99.90%
Tetraetil ortosilicato	Aldrich Chemistry	MKBK0937V	98%
Metanol	J.T. Baker	L27C08	99.90%
Etanol absoluto anhidro	J.T. Baker	233C53	99.90%

7.1.2 Principio Activo.

Principio Activo	Marca	Lote	Pureza
Indometacina	Retecma S.A. de C.V.	TOH-021	
Ibuprofeno DC 90	Helm	I003/2002-03	90%

7.1.3 Instrumentos.

Instrumento	Marca	Modelo	Clave
Micro balanza	Mettler	Mettler MTS	IF-056
Balanza Analítica	OHAUS	Explorer Pro	EP214

7.1.4 Equipo.

Equipo	Marca	Modelo	Clave
Baño de ultrasonido	VWR	75D	2133784
Pulidor de agua	Milli-Q	QFARDOOR1	2180846
Bomba de vacío	Gast	DOA-P740-HA	12428501F-036
Cromatógrafo de líquidos de alta resolución	Varian Pro Star	410	2196250
Calorímetro diferencial de barrido	Perkin-Elmer	DSC 7	
Columna de CLAR	Agilent	Zorbax	

7.2 Metodología.

7.2.1. Elaboración de las matrices de sol-gel.

1. En un matraz balón de 3 bocas se agregaron 50 mL de TEOS, 50 mL de etanol anhidro, 4 mL de agua desionizada, y 0.16 mL de ácido clorhídrico 1 M con agitación y calentamiento.

2. Se verificó que la temperatura alcanzó los 90°C y se mantuvo durante 1.5 h. Posteriormente se agregaron 40 mL de agua desionizada y 10 mL de ácido clorhídrico 1 M.

3. Finalmente se fraccionó la solución Stock en cajas Petri con 25 mL cada una, se dejó secar 24 h y se trituró el gel.[19]

7.2.2 Elaboración de las matrices sol-gel con Ibuprofeno e Indometacina.

1. Se repitieron los pasos de 1-2 de 7.2.1. Posteriormente al tener la solución Stock se fraccionó en vasos de precipitados de 100 mL y se agregaron 100 mg de cada uno de

los fármacos (Ibuprofeno o Indometacina) sometiendo posteriormente a ultrasonido en baño de agua por 30 minutos.

2. Se vació el contenido de los vasos sobre unas cajas Petri, dejando secar el gel y posteriormente se trituró.

7.2.3 Estabilidad de las matrices sol-gel con Ibuprofeno e Indometacina.

Se sometieron las matrices (con Indometacina o con Ibuprofeno) a:

A) Hidrólisis ácida con solución de HCl 1 M (preparación de solución según FEUM), se agregaron 20 mL al frasco de polietileno blanco que contenía la matriz durante 57 días para matriz con Indometacina y 74 días para matriz con Ibuprofeno.

B) Hidrólisis alcalina con solución de NaOH 1 M (preparación de solución según FEUM), se agregaron 20 mL al frasco de polietileno blanco que contenía la matriz durante 74 días para matriz con Ibuprofeno. Por otra parte para la matriz de Indometacina además de la hidrólisis alcalina anterior se realizó lo siguiente:

1. Se colocó 1 g de Indometacina en cada tubo (3 en total) y se sometieron a hidrólisis con amortiguador pH 7.2 en un baño de agua a una temperatura de 40 °C durante 3 horas realizando muestreo cada hora.

2. Se agregaron 20 mL de una solución de NaOH 3 N a un frasco de polietileno blanco que contenía 10 g de matriz y se sometió a estabilidad durante 3 días. Se realizó el monitoreo de la estabilidad cada 24hrs, 48hrs y 72hrs

C) Temperatura 60°C. Se colocaron 10 g de cada matriz (Ibuprofeno e Indometacina) en una caja Petri en la estufa de calentamiento durante 57 días para matriz de Indometacina y 78 días para matriz de Ibuprofeno.

D) Temperatura 80° C. Se colocaron 10 g de cada matriz (Ibuprofeno e Indometacina) en una caja Petri en la estufa de calentamiento durante 57 días para matriz de Indometacina y 78 días para matriz de Ibuprofeno.

E) Temperatura 45 C, 75% HR. Se colocaron 10 g de cada matriz (Ibuprofeno e Indometacina) en una caja Petri en la estufa de calentamiento durante 57 días para matriz de Indometacina y 59 días para matriz de Ibuprofeno.

7.2.4 Estabilidad de los fármacos no contenidos en la matriz.

1. Se sometieron los fármacos Indometacina e Ibuprofeno a las mismas condiciones que las mencionadas en el numeral de 7.2.3.

7.2.5 Caracterización de los fármacos Ibuprofeno e Indometacina.

1. Se realizó la caracterización del Ibuprofeno en el calorímetro diferencial de barrido: se pesaron 3-5 mg del fármaco y se realizó una corrida de 70°C-85°C a una velocidad de 2”C/min.

2. Se caracterizó el Ibuprofeno en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución: realizando una valoración de la siguiente manera: se preparó una solución del fármaco de 400µg/10 mL utilizando como disolvente la fase móvil.

3. Se inyectaron las muestras, con las condiciones del equipo:

- Velocidad de flujo: 1.2mL/min.
- Fase móvil: MeOH: Buffer fosfatos pH 3 proporción 75:25.
- Tiempo de corrida: 5 min.
- Detector UV: 240nm.
- Volumen de inyección: 20µL[19]

4. Se realizó la caracterización del Ibuprofeno por la técnica de Infrarrojo (técnica de pastilla de KBr).

5. Se caracterizó la Indometacina en el calorímetro diferencial de barrido: pesando 3-5mg del fármaco y se realizó una corrida de 155°C-162°C a una velocidad de 2”C/min.

6. Se caracterizó la Indometacina en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución: realizando una valoración de la siguiente manera: se preparó una solución del fármaco de 400µg/10mL utilizando como disolvente la fase móvil.

7. Se inyectaron las muestras, con las condiciones del equipo:

   - Velocidad de flujo: 1.1 mL/min.
   - Fase móvil: MeOH: Buffer fosfatos pH 3 proporción 80:20.
   - Tiempo de corrida: 10 min
   - Detector UV: 280 nm.
   - Volumen de inyección: 20 µL[20].

8. Se realizó la caracterización de la Indometacina por la técnica de infrarrojo (técnica pastilla de KBr).

7.2.6 Obtención de los productos de degradación de Ibuprofeno e Indometacina.

1. Indometacina: Se colocaron 5 g del fármaco en un vaso de precipitados de 100 mL y se agregaron 50 mL de una solución NaOH 1 M.

2. Ibuprofeno: Se colocó 1 g del fármaco en tubos de ensayo. A un tubo se le agregaron 10 mL de NaOH 1 M, a otro tubo 10 mL de HCl 1M, a otro tubo 10 mL de MeOH y al último tubo 10 mL de Buffer de fosfatos pH 3 y se calentaron en la estufa a 60°C.

7.2.7 Preparación de las muestras de matriz de Ibuprofeno.

1. Se realizó la valoración de las matrices de la siguiente manera. Se trituraron las matrices y se pesó el equivalente a 5 mg del principio activo, se aforó a 25 mL con la solución para extracción (metanol amortiguador de fosfatos pH7.2 50:50) y se sometió

a ultrasonido en un baño de agua por 1 h para abrir el poro de la matriz y extraer el fármaco.

2. Se tomaron 2 mL de la solución anterior y 1 mL de estándar interno Ketorolaco a una concentración de 40 µg/mL y se aforó a 10 mL con la fase móvil.

3. Se inyectaron las muestras en el cromatógrafo con las condiciones del equipo descritas anteriormente.

4. Columna: 150 mm. de largo por 4.6 mm. de ancho, con un tamaño de partícula de 5µm.

7.2.8 Preparación de las muestras de matriz de Indometacina.

1. Se realizó la valoración de las matrices de la siguiente manera. Se trituraron las matrices y se pesó el equivalente a 5 mg del principio activo, se aforó a 25 mL con la solución para extracción (metanol, amortiguador de fosfatos pH7.2 50:50) y se sometió a ultrasonido en baño de agua por 1 h para abrir el poro y extraer el fármaco.

2. Se tomaron 2 mL de la solución anterior y 1 mL de estándar interno Ketorolaco a una concentración de 40µg/mL y se aforó a 10 mL con la fase móvil.

3. Se inyectaron las muestras en el cromatógrafo con las condiciones del equipo descritas anteriormente.

7.2.9 Evaluación de la estabilidad de los fármacos y de las matrices con fármaco.

1. Una vez colocados los fármacos Indometacina e Ibuprofeno y las matrices de Indometacina e Ibuprofeno a las condiciones descritas anteriormente, se realizó la valoración cada semana de los fármacos en estado libre, así como los fármacos contenidos en las matrices.

2. Con las valoraciones que se obtuvieron se realizaron cinéticas de degradación

8. Resultados y análisis de resultados.

8.1 Producción de matriz placebo

El primer paso fue la síntesis de un pequeño lote (3g. aproximadamente) de matriz placebo, utilizando la metodología anteriormente descrita exceptuando el paso de agregar el fármaco y se obtuvo una pequeña muestra para analizar y se corroboraron algunos resultados de la literatura. Una vez obtenido este lote se le realizaron pruebas como son espectroscopia infrarroja y calorimetría diferencial de barrido y se evaluó si existen diferencias con respecto a las matrices con fármaco.

8.1.1 Análisis térmico

Se analizó una muestra de matriz placebo (matriz sin fármaco) con una corrida de 25°C-200°C a una velocidad de calentamiento de 15°C/min[40]. Se observó en el termograma (figura 7) una pendiente que no presentó ningún pico, esto es característico de la pérdida de humedad por la matriz de diferentes fuentes, solventes, y el agua destilada que se utilizó en la síntesis. La cantidad de poros, el tipo de poros tuvo efecto en la cantidad de humedad contenida en la matriz así como la facilidad o dificultad de desprendimiento de humedad[29,30,31], ya que en sí el compuesto de silicio se usa como agente desecante lo cual favoreció la absorción de la humedad del ambiente como la de los compuestos utilizados en la síntesis de la misma. Esta prueba confirmó que la matriz no presentó fusión al menos a los 200°C.

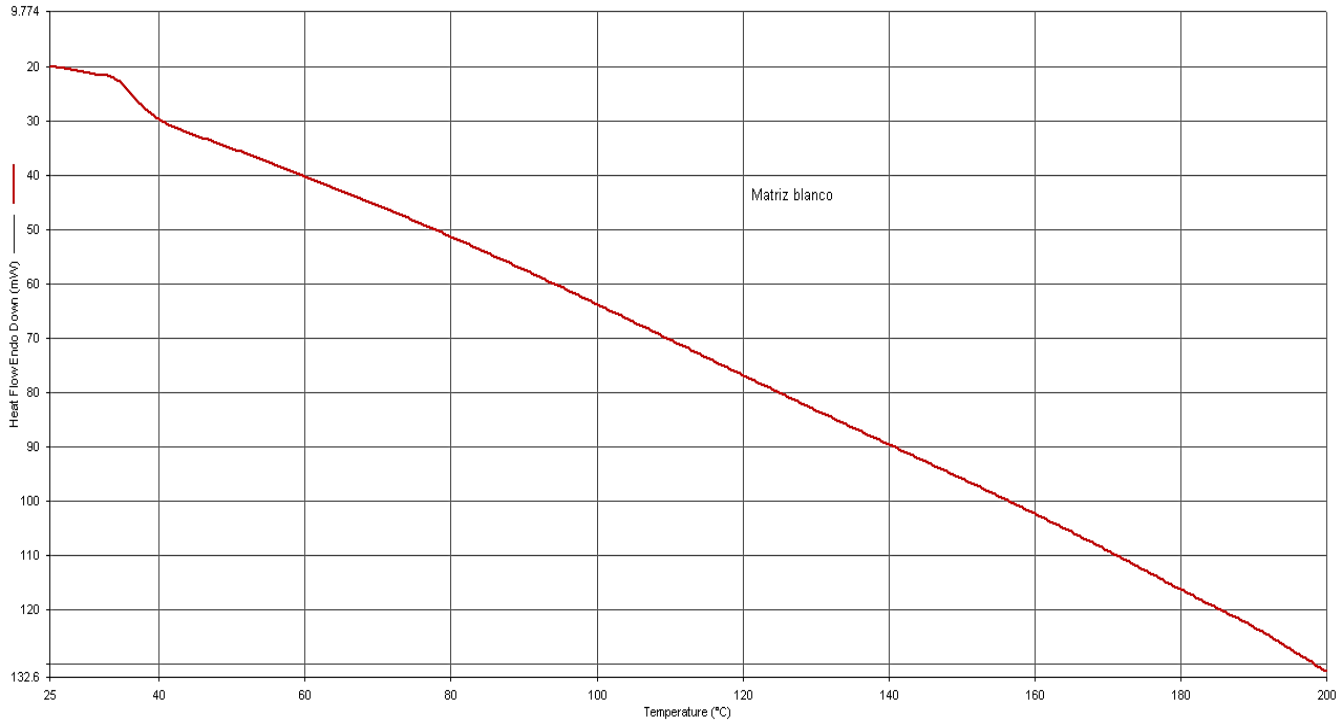


Figura 7. Termograma de matriz placebo.

8.1.2 Análisis infrarrojo.

En el espectro se observó (figura 8) en la región de 3500-3750 cm^{-1} los enlaces O-H tanto del agua contenida en la matriz, el enlace Si-OH. En la región 455-457 cm^{-1} se encuentra el enlace Si-O-Si, en la región de 1100cm^{-1} se encuentra el estiramiento del enlace Si-O-Si y en la región de 900-980cm^{-1} el estiramiento del Si-OH. También en la región cercana a los 800 cm^{-1} se observa el estiramiento simétrico del Oxígeno a lo largo de la línea que bisecta al eje formado por los dos átomos de silicio[34,35]. Por lo cual se puede decir que las matrices que se obtuvieron por el procedimiento utilizado tuvieron características similares a las teóricas.

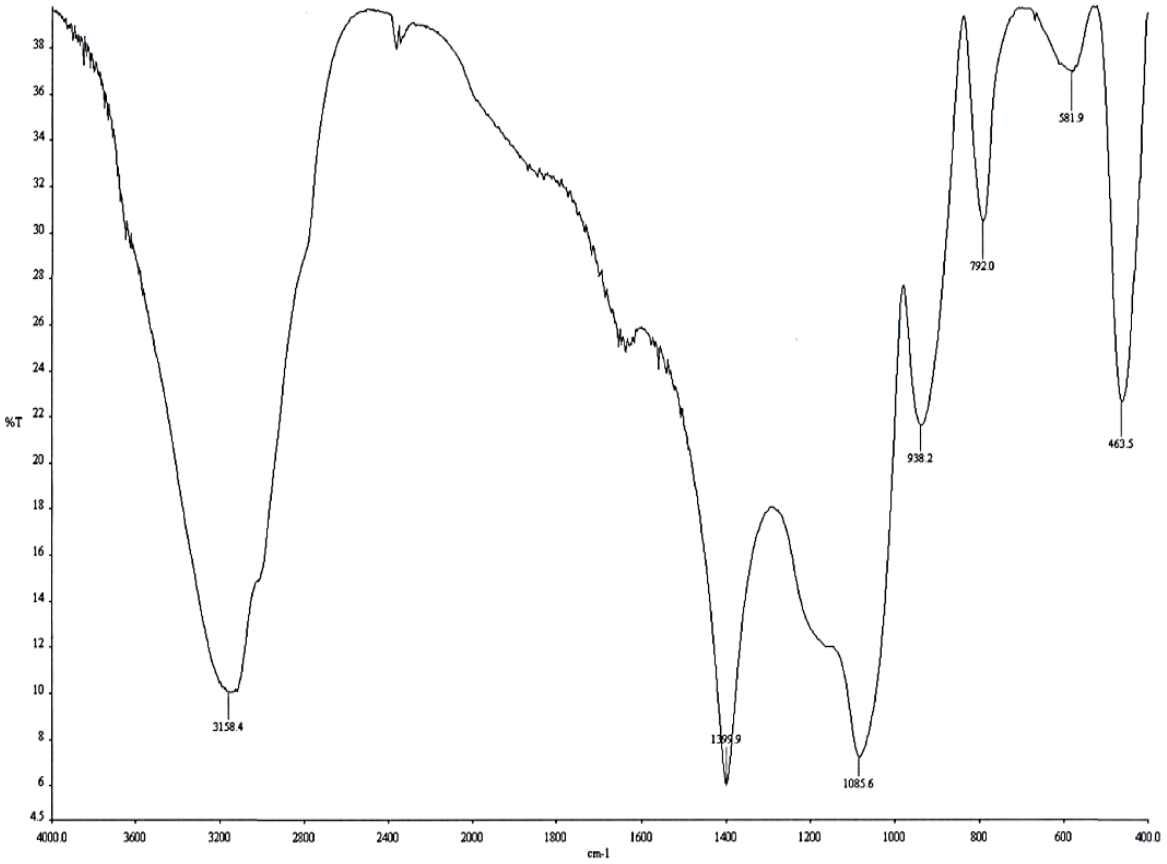


Figura 8. Espectro Infrarrojo de una muestra de matriz sol-gel placebo HCl 1M.

8.2 Caracterización de la Indometacina.

8.2.1 Análisis cromatográfico.

En el cromatograma (condiciones del equipo descritas en metodología) que se obtuvo (figura 9) se observó el pico de Indometacina cuyo tiempo de retención fue de 2.8 min y no se observó algún otro pico indicativo de un producto de degradación o de algún contaminante.

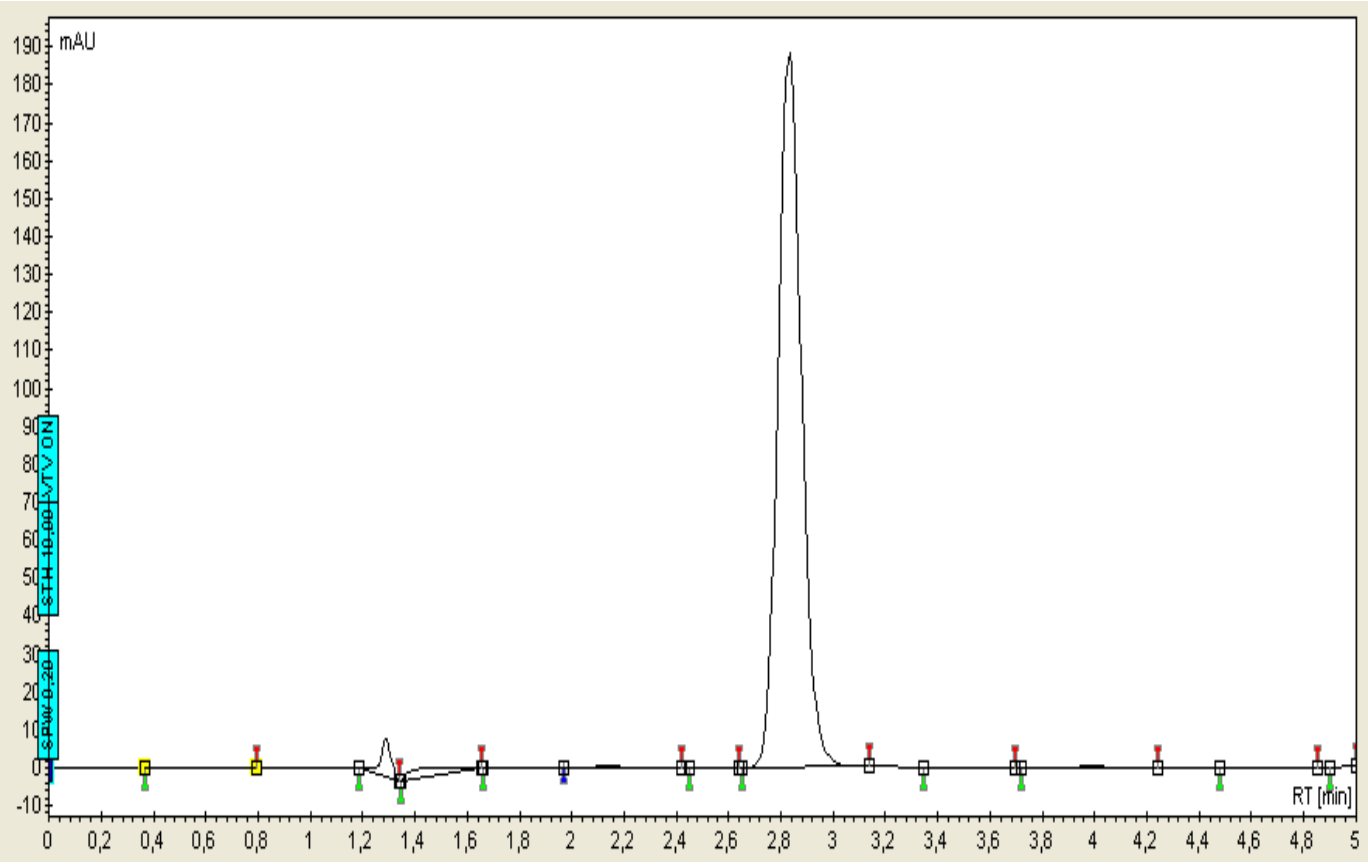


Figura 9. Cromatograma de Indometacina caracterización inicial.

8.2.2 Análisis térmico.

Con respecto al termograma obtenido (figura 10) se observó un endoterma característico de la Indometacina, cuyo punto de fusión es de 158°C a 162°C, se obtuvo experimentalmente un punto de fusión de 161.63°C[26]. La isoterma fue decreciendo con respecto al punto inicial esto es indicativo de la humedad que perdió la muestra.

Con el termograma que se obtuvo (figura 10) se confirmó que la Indometacina no contuvo algún otro compuesto que afectó la fabricación de las matrices ya que no se observaron otros picos de fusión.

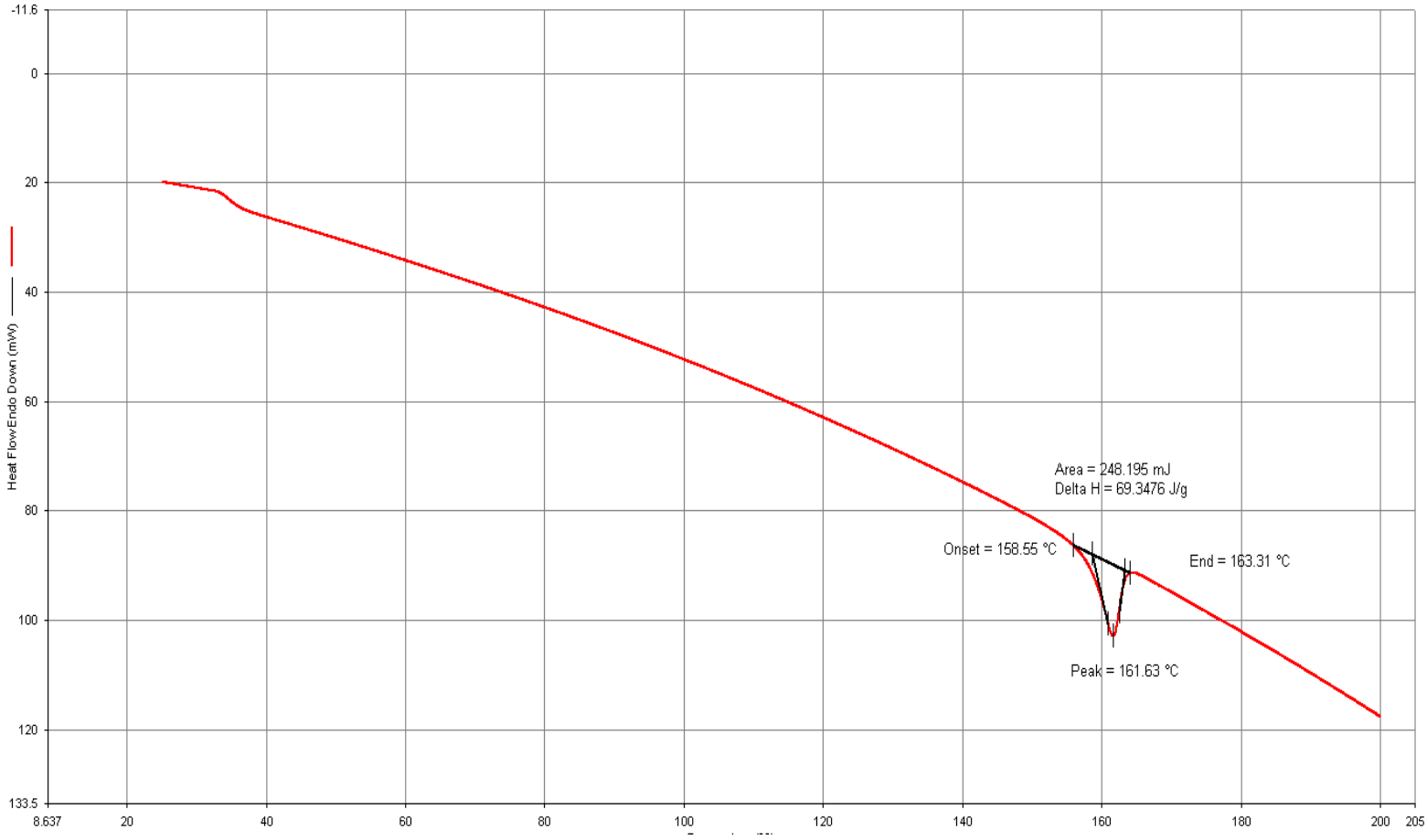


Figura 10. Termograma de Indometacina

8.2.3 Análisis infrarrojo.

En el espectro infrarrojo obtenido (figura 11) se observan los picos característicos de una muestra de Indometacina en 1691, 1234.1, 691.7, 1307.9 y 1067.8 contrastados con la teoría[25].

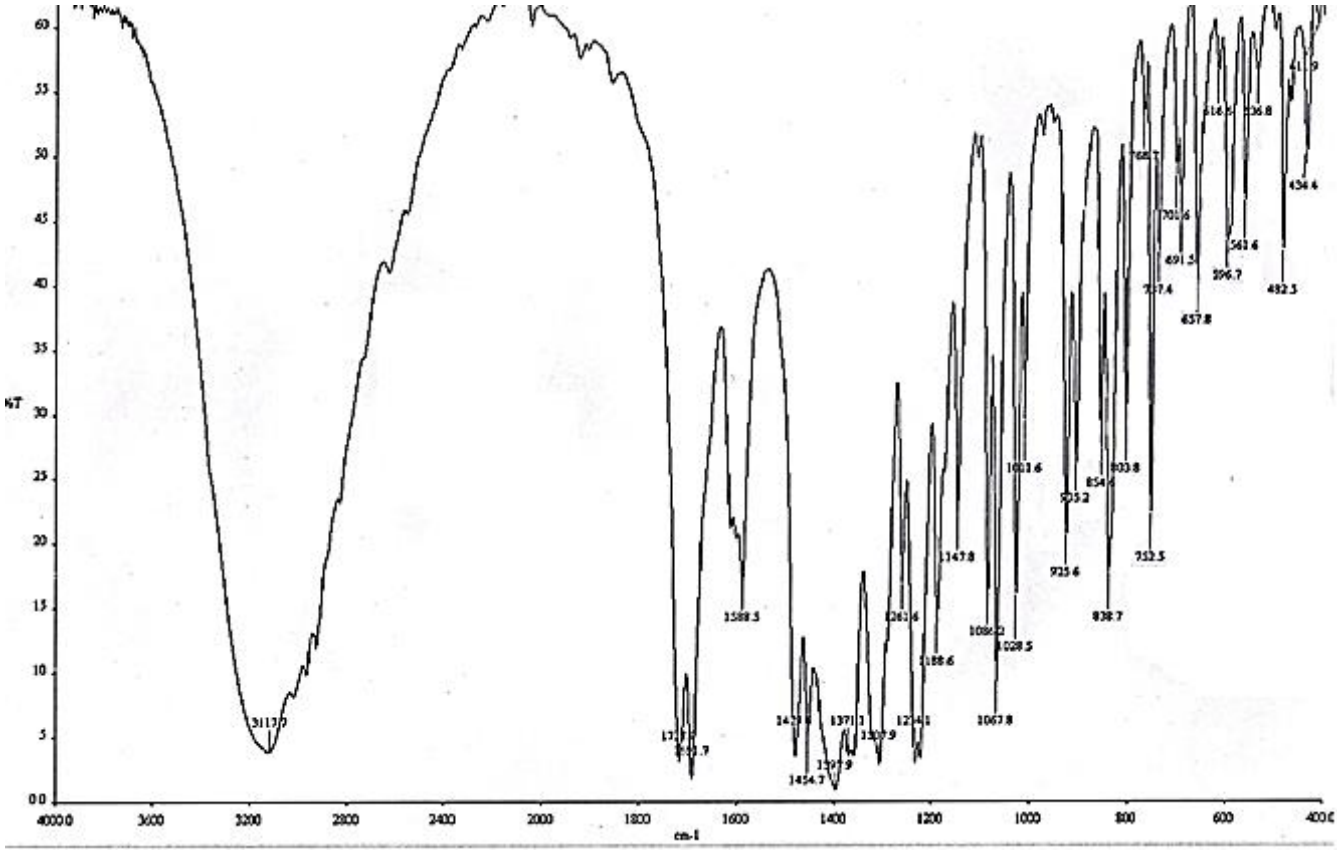


Figura 11. Espectro Infrarrojo de una muestra de Indometacina

Con la caracterización anterior se procedió a la fabricación las matrices con el fármaco, ya que se determinó que el fármaco no contenía ningún producto de degradación que afectara los resultados y cualquier contaminante o degradación fue atribuible al proceso de fabricación o a las condiciones de estabilidad a las que fueron sometidas las matrices.

.

8.3 Caracterización del Ibuprofeno.

8.3.1 Análisis cromatográfico.

En el cromatograma obtenido (figura 12) se observó un pico correspondiente al Ibuprofeno cuyo tiempo de retención fue a los 4.09 min, y no se observó ningún otro compuesto presente en el fármaco utilizado en las matrices sol-gel.

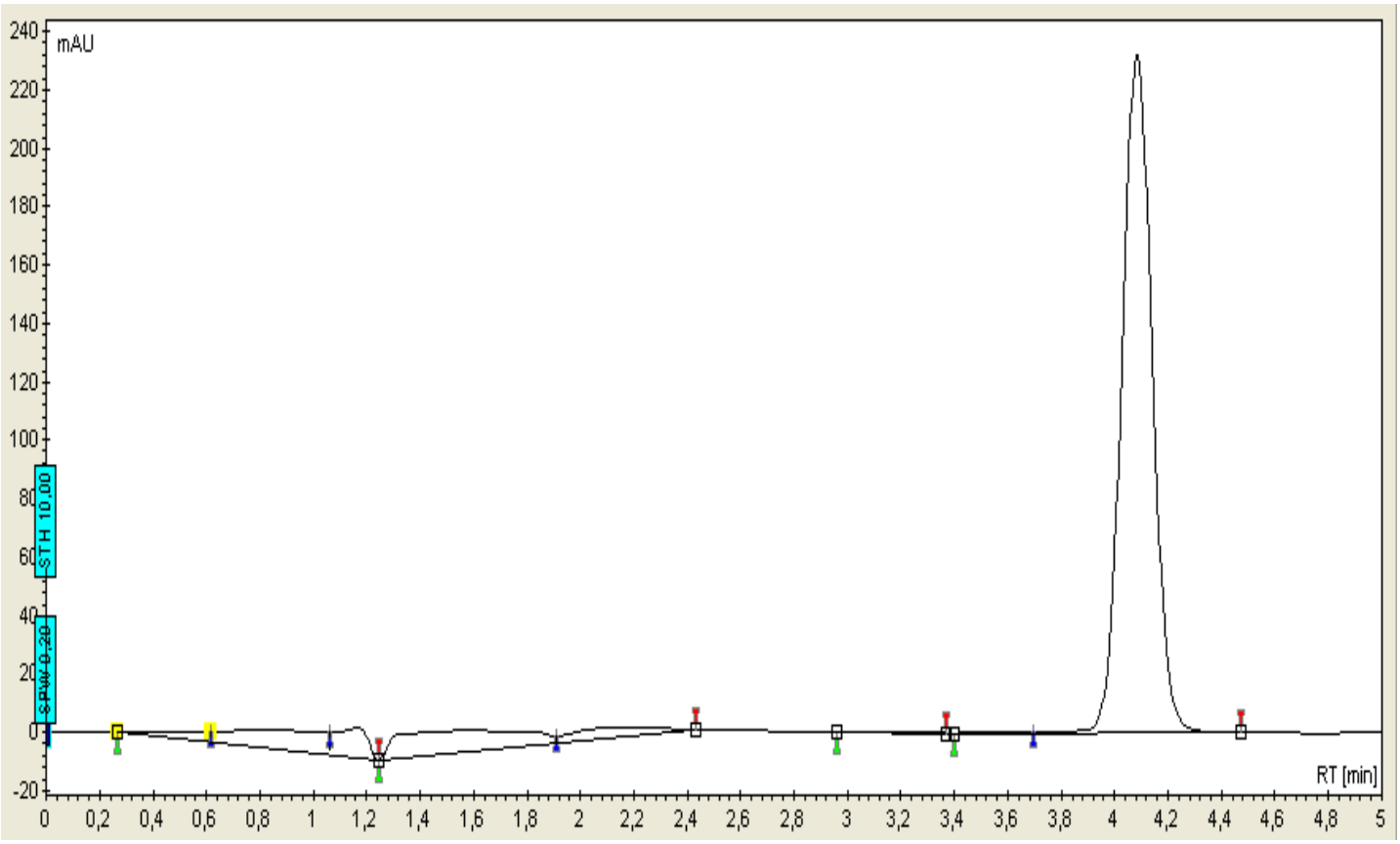


Figura 12. Cromatograma de Ibuprofeno caracterización inicial.

8.3.2 Análisis térmico.

Se analizó una muestra de Ibuprofeno. Se obtuvo experimentalmente un punto de fusión de 76.63°C[26]. La isoterma decreció con respecto al punto inicial esto es indicativo de la humedad que perdió la muestra.

En el termograma (figura 13) se observó un solo pico de fusión lo cual confirmó que no hay otras sustancias tanto impurezas como productos de degradación presentes en el Ibuprofeno que se utilizó.

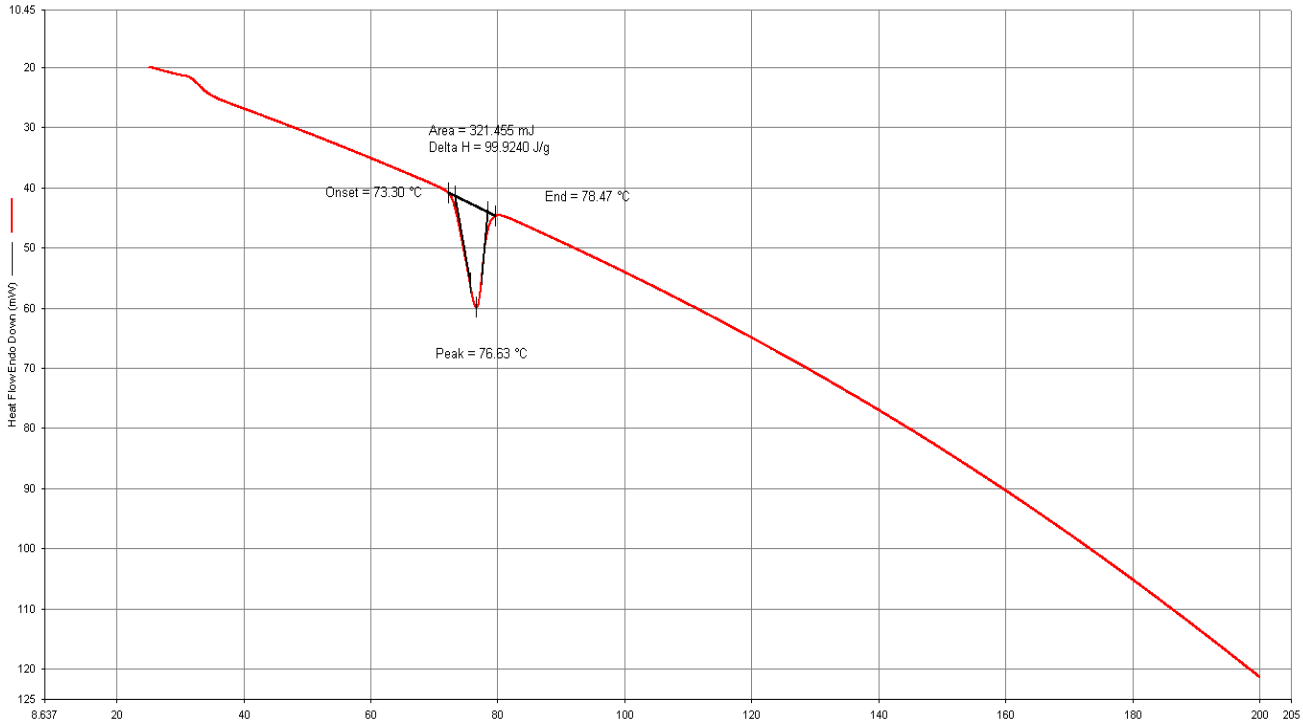


Figura 13. Termograma de Ibuprofeno.

8.3.3 Análisis infrarrojo.

Al analizar el espectro infrarrojo obtenido (figura 14) se observaron los picos característicos del Ibuprofeno en la región de 2500-3100cm^{-1} se encuentra el estiramiento del O-H del ácido carboxílico, en la región, aunque en esta misma región se encuentra el O-H del agua por lo que se confirmó la presencia de agua, tanto por el espectro IR como por la CDB, en la región 1409 se encuentra la torsión enlace del ácido carboxílico, y las demás señales obtenidas son: 1229,1269, 1180, 866, y 778 (huella digital del compuesto) según lo reportado en la literatura[26,35,36].

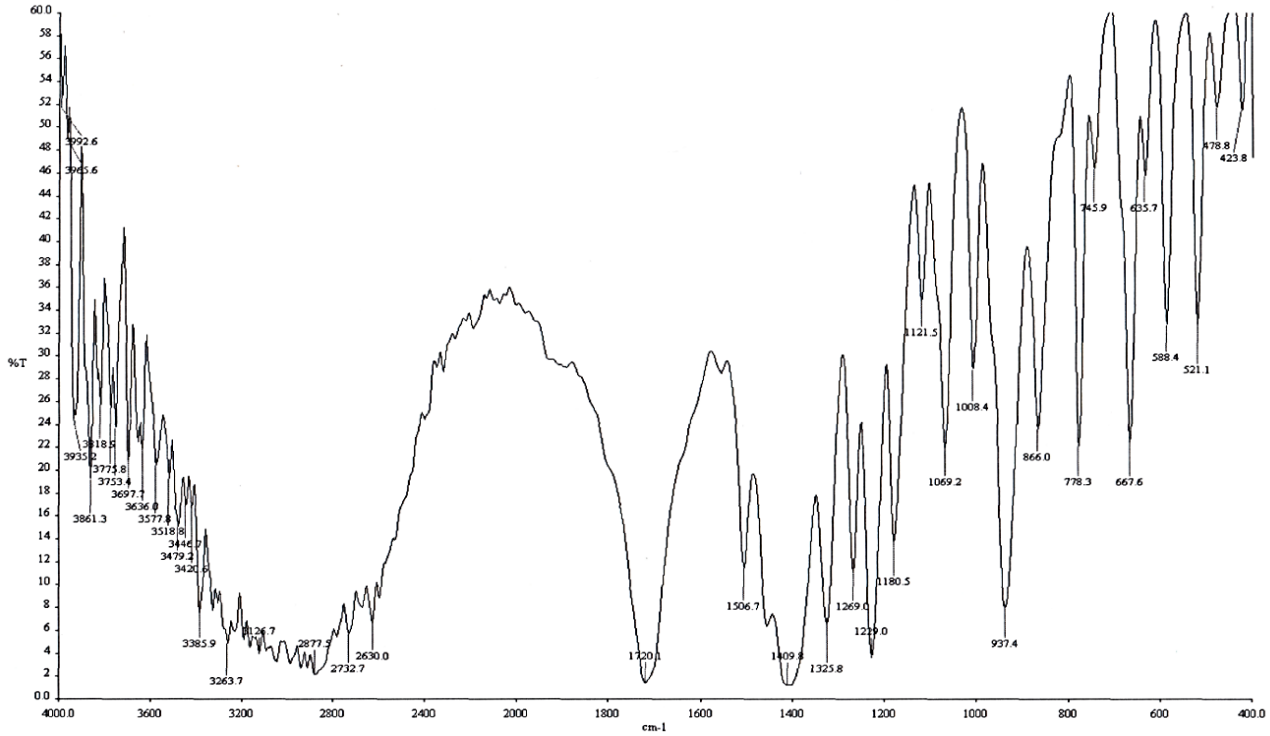


Figura 14. Espectro Infrarrojo de una muestra de Ibuprofeno.

Con los resultados anteriores se procedió a la fabricación de matrices sol-gel de Ibuprofeno, ya que no se observó algún compuesto que pudo afectar al fármaco y por ende las matrices. Al igual que con las matrices de Indometacina, si se llegó a generar algún compuesto adicional, fue atribuible al proceso de fabricación o a las condiciones de estabilidad a las que fueron sometidas las matrices.

8.4 Fabricación de las matrices sol-gel.

Fue realizada la fabricación de las matrices sol-gel como marca el apartado de metodología; se tuvo especial cuidado en el control de las temperaturas (temperatura 90°C ± 5°C) tanto en la reacción en el matraz como el ultrasonido[21,29] ya que se observó que existe cambio en las matrices fabricadas de este modo, comparadas con las que no tiene un control sobre la temperatura: cambios de coloración e incluso cuando se realiza la valoración en CLAR se observaron otros picos que no aparecían con otros lotes. En contraste con lo reportado en la teoría, no se realizó ninguna adición de solución amortiguadora durante la síntesis del sol, esto debido a que las proteínas tienen cierta desnaturalización frente a varias condiciones (pH, solventes, etc.), mientras que los fármacos utilizados no lo presentan[23,28,30,31].

Aunque se encontró que además de la estabilidad del sol, aumenta la porosidad de la matriz cuando se realiza la neutralización[30,31], esto pudo ser perjudicial para la Indometacina ya que tiende a degradarse en pH básico,.

Si bien la fabricación de las matrices es un gran avance en la tecnología para producir materiales cerámicos, la síntesis se realizará de manera diferente para el uso que se le desee dar ya que las concentraciones de precursores alcóxidos, catalizadores (tanto ácidos como básicos), solventes, tipo de agua, tiempo de agitación, tipo de secado e incluso la cantidad de los fármacos, proteínas etc. se va a encapsular dentro de la matriz se ha visto que tienen un impacto en el producto final obtenido[21,30,32].

Fue de suma importancia la cantidad de los reactivos utilizados en las síntesis de las matrices con el fin de obtener una matriz con ciertas características físicas: el tipo de poro, la cantidad de poro y la nanoestructura de la misma En este caso, como se ha mencionado, se optó por un catalizador ácido (HCl 1N), lo cual podía favorecer la formación de microporos en vez de mesoporos (formados por catalizador básico), lo que conllevó a una difusión restringida de las moléculas encapsuladas en las matrices y por lo tanto la velocidad de liberación se ve disminuida[21], sin afectar la estabilidad de las mismas.

Una vez que se obtuvieron las matrices de Indometacina y matrices de Ibuprofeno, se realizó la caracterización de las matrices para poder continuar con el desarrollo del proyecto,

8.5 Caracterización de las matrices de Indometacina.

Fue necesario realizar la valoración inicial de las matrices de Indometacina lo cual demostró que el fármaco que estaba encapsulado en las matrices no presentó ningún cambio durante el proceso de producción y así se tuvo una referencia de cómo va cambiando el comportamiento del mismo a lo largo del tiempo en las condiciones que se establecieron.

Debido a que es necesario realizar una extracción del fármaco para que puedan ser analizadas en el CLAR , se utilizó una solución amortiguadora ligeramente básica (pH 7.2) con el fin de abrir el poro[30,33] y después la utilización de un solvente (metanol) para solubilizar el fármaco. El sonicado con la mezcla 50:50 de amortiguador de fosfatos con metanol fue un paso crítico en el procedimiento ya que no se conoce la cantidad de fármaco que está liberando con dicho método, a pesar que se realizaron pruebas en el que se extrae una gran cantidad de fármaco[20].

8.5.1 Análisis térmico.

Al evaluar la matriz sol-gel por CDB (figura 15) se encontró que no existe una endoterma de fusión correspondiente de la Indometacina, por lo que se confirmó la encapsulación del fármaco dentro de la matriz, únicamente se observó la pérdida de humedad, que al igual que la matriz placebo retuvo mucho la humedad (figura 7).

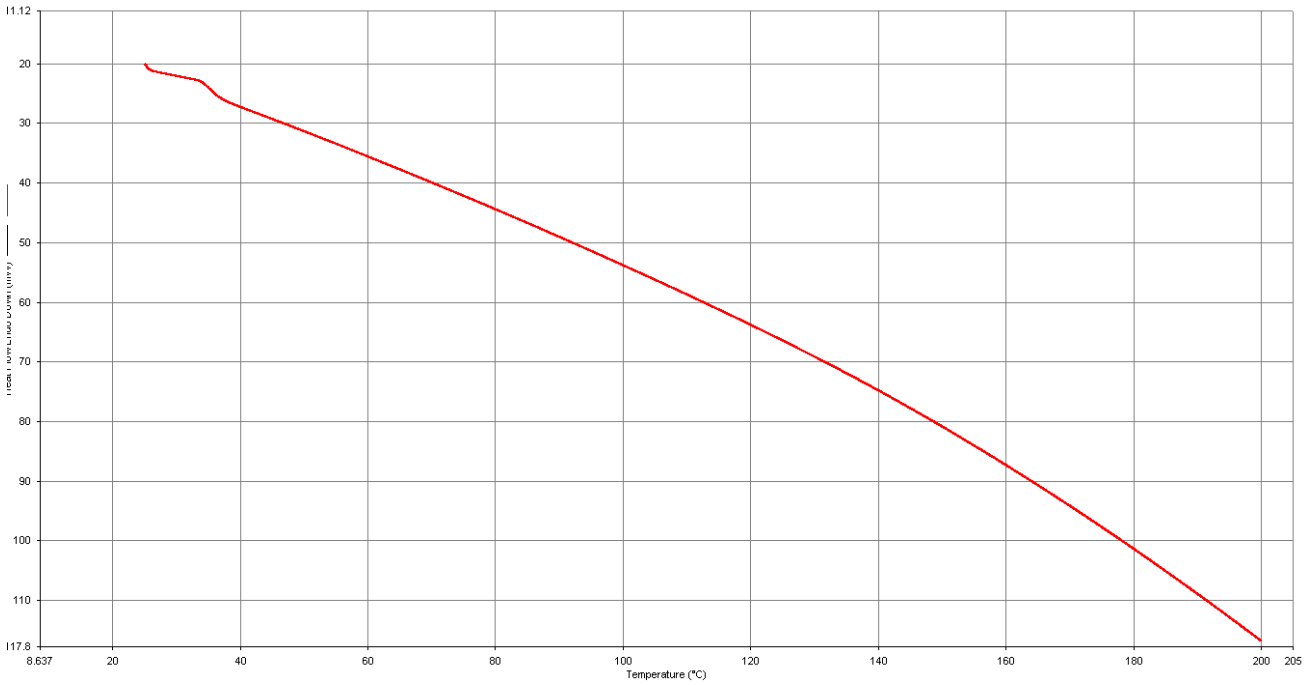


Figura 15. Termograma de matriz sol-gel de Indometacina.

8.5.2 Análisis cromatográfico.

Fue realizada la valoración de las matrices que se obtuvieron con anterioridad, con la metodología descrita para las condiciones de equipo así como para la extracción del fármaco. Se observó un pico en 2.82 min, que corresponde a la Indometacina y no se observaron otros picos atribuibles a algún producto de degradación o contaminante, lo que confirmó que el fármaco no presentó degradación después de la fabricación. Se obtuvo una concentración de 0.027 mg de fármaco por cada mg de matriz.

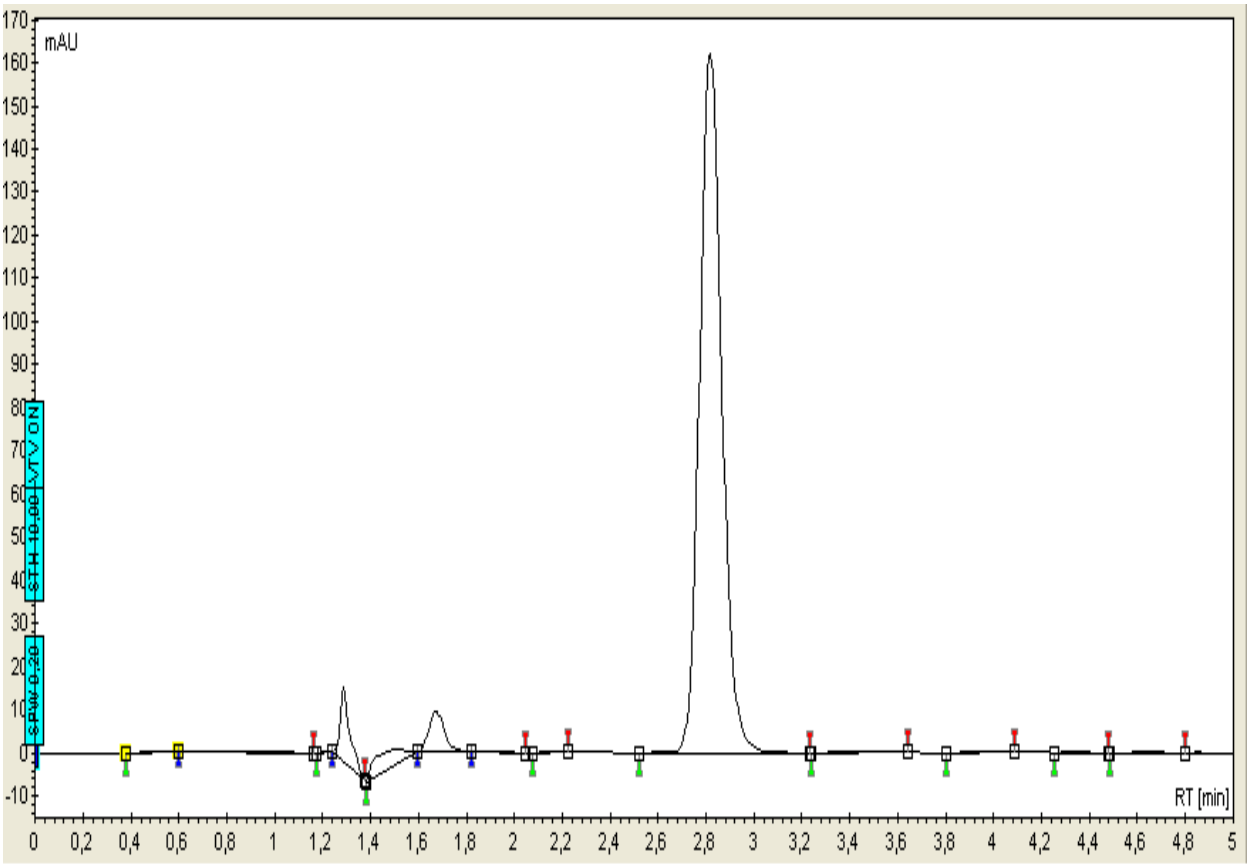


Figura 15. Cromatograma de matriz sol-gel de Indometacina valoración inicial.

8.5.3 Análisis infrarrojo.

También se realizó un análisis de la matriz de Indometacina y se observó el comportamiento del fármaco encapsulado dentro de la matriz.

En el análisis del infrarrojo obtenido (figura 17) se observó, al igual que en infrarrojo obtenido de la matriz sol-gel placebo casi las mismas señales: en la región de 3500-3750 cm^{-1} los enlaces O-H tanto del agua contenida en la matriz, el enlace Si-OH. En la región 455-457 cm^{-1} se encuentra el enlace Si-O-Si, en la parte de 1100cm^{-1} se encuentra el estiramiento del enlace Si-O-Si y en la región de 900-980cm^{-1} el estiramiento del Si-OH[34,35], aunque no se observaron las señales características que marca la literatura para la Indometacina que son 139, 141, 357, 111, 359, 140,

113 y 75 (huella digital del fármaco). Estos resultados confirmaron la encapsulación del fármaco o la inmovilización del mismo ya que el espectro infrarrojo se fundamenta en la capacidad de las moléculas de realizar vibraciones moleculares cuando se irradia una molécula[36].

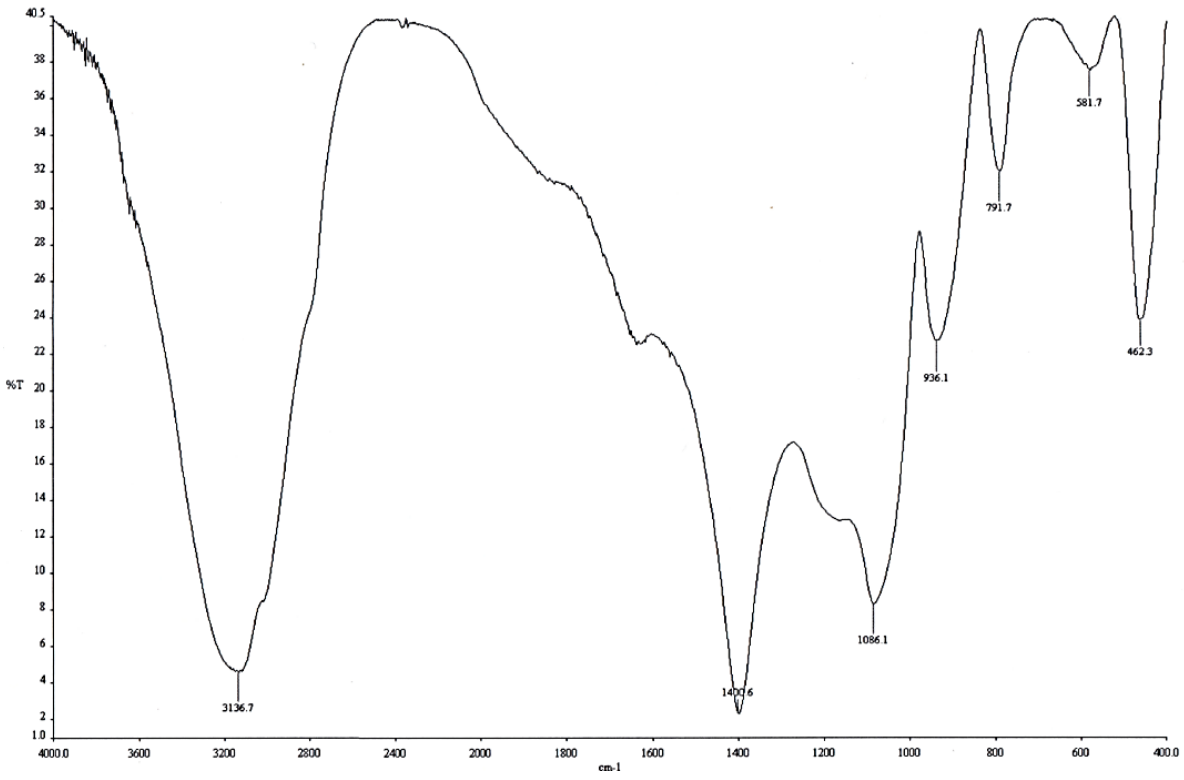


Figura 17. Espectro infrarrojo de matriz de Indometacina

Con las pruebas realizadas anteriormente se observó que el fármaco estaba encapsulado dentro de la matriz y que no presentó cambio alguno después del procedimiento de obtención y se procedió a someter a las matrices a las condiciones descritas.

8.6 Estabilidad de Indometacina y de matrices de Indometacina.

. Se sometieron tanto las matrices de Indometacina como al fármaco en estado libre a las condiciones descritas en 7.2.3; los resultados fueron los siguientes (tabla 1):

Factor evaluado	Resultado	Interpretación
Adición NaOH a la Indometacina	Cambio de coloración en la Indometacina.	Formación de posible producto de degradación.
Adición NaOH a la matriz de Indometacina.	Cambio de coloración en la matriz de Indometacina. Formación de sedimento duro.	Formación de posible producto de degradación. Cambio físico visible.
Adición de HCl a la matriz de Indometacina.	Formación de sedimento duro.	Cambio físico visible.

Tabla 1. Resultados observados durante la estabilidad de las matrices de Indometacina e Indometacina.

En la evaluación de las matrices que estaban en condición de hidrólisis básica, se observó un pico en el minuto 1.49 y otro en el minuto 1.85 (figura 18) desde la primera semana, los cuales no se observaron en la valoración inicial y desapareciendo el pico representativo de la Indometacina, cuyo tiempo de retención aproximado fue de 2.6min., lo que indicó que hubo degradación química de la Indometacina contenida en la matriz, no se pudo evaluar a que producto correspondió dicha señal ya que existen varios productos de degradación de la Indometacina[38,39] y no se contó con estándar de alguno de ellos.

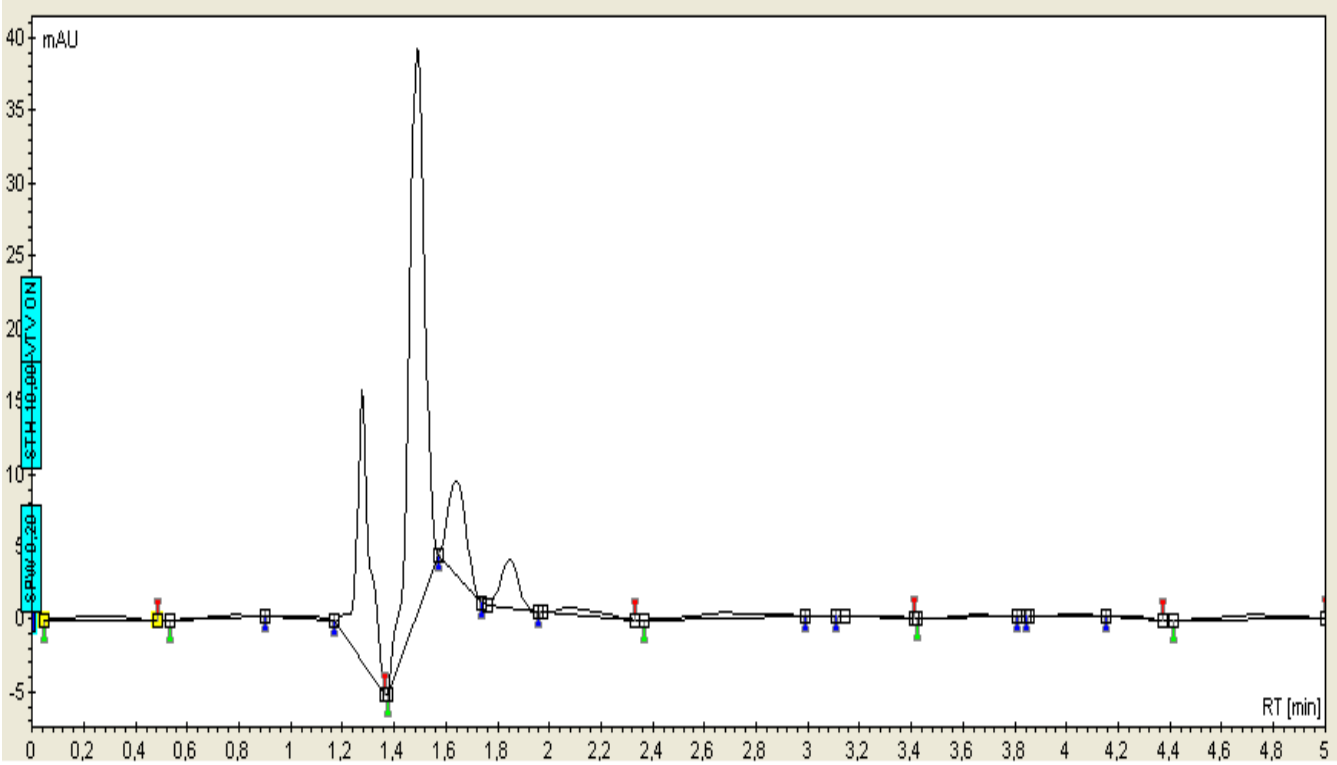


Figura 18. Cromatograma de matriz indometacina en hidrólisis básica durante 8 días.

En la evaluación de la Indometacina en la condición de hidrólisis básica se observó de igual manera que en la matriz un pico en el minuto 1.5 y otro en 2.86 (figura 19), aunque el área bajo la curva de dichos picos fue mucho menor en comparación con los obtenidos en la matriz, además que se siguió observando el pico característico de la Indometacina en 2.6 min, mientras que en la matriz ya no se observó.

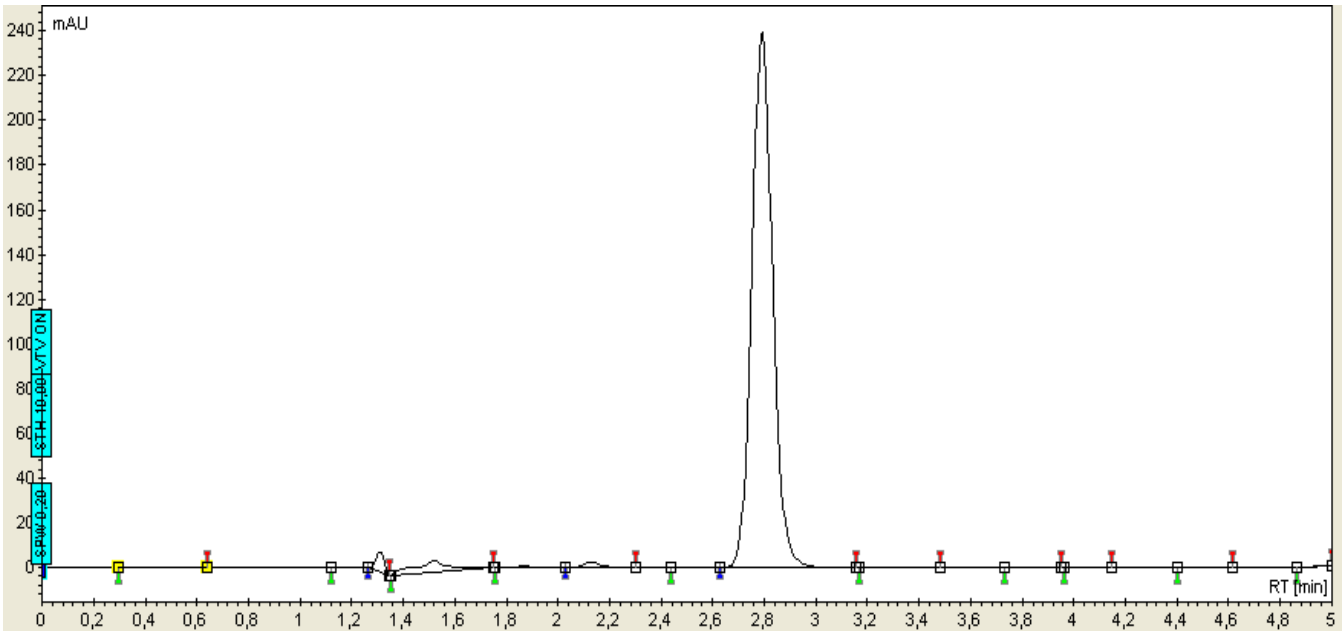


Figura 19. Cromatograma de Indometacina en hidrólisis básica.

Al medir el pH de las soluciones en las que se encontraban las muestras tanto de Indometacina como de las matrices de Indometacina, se encontró que el pH de la solución con matriz era de 13,

mientras que la del fármaco era de 8, lo cual pudo explicar la diferencia entre las cantidades tanto de los productos de degradación así como el que no hubo cuantificación de Indometacina en las matrices. La disminución en el pH de la Indometacina pudo deberse a la formación de productos de degradación que tienen carácter ácido[15] lo que pudo disminuir el pH de la solución.

Cuando se realizó la evaluación de la hidrólisis alcalina con NaOH 3 N y se realizó la neutralización con HCl se formó un gel a los 5 minutos aproximadamente. La matriz en pH bajo es estable mientras que en pH alto se desintegra, lo que provoca que el fármaco encapsulado sea liberado[37], y al momento de realizar la neutralización se vuelve a formar la estructura cristalina volviendo a encapsular el fármaco pero de forma degradada se demuestra en el termograma.

Una pequeña muestra de la matriz neutralizada se evaluó en CDB (figura 20), observando un pequeño pico a una temperatura de 172.5°C con lo que se pudo observar: el fármaco no fue encapsulado en su totalidad ya que, si así fuera, no se vería ningún pico como en el termograma de la matriz con Indometacina. La cantidad de humedad es mucho menor comparada con la matriz del lote inicial, y se observó un posible producto de degradación de la Indometacina.

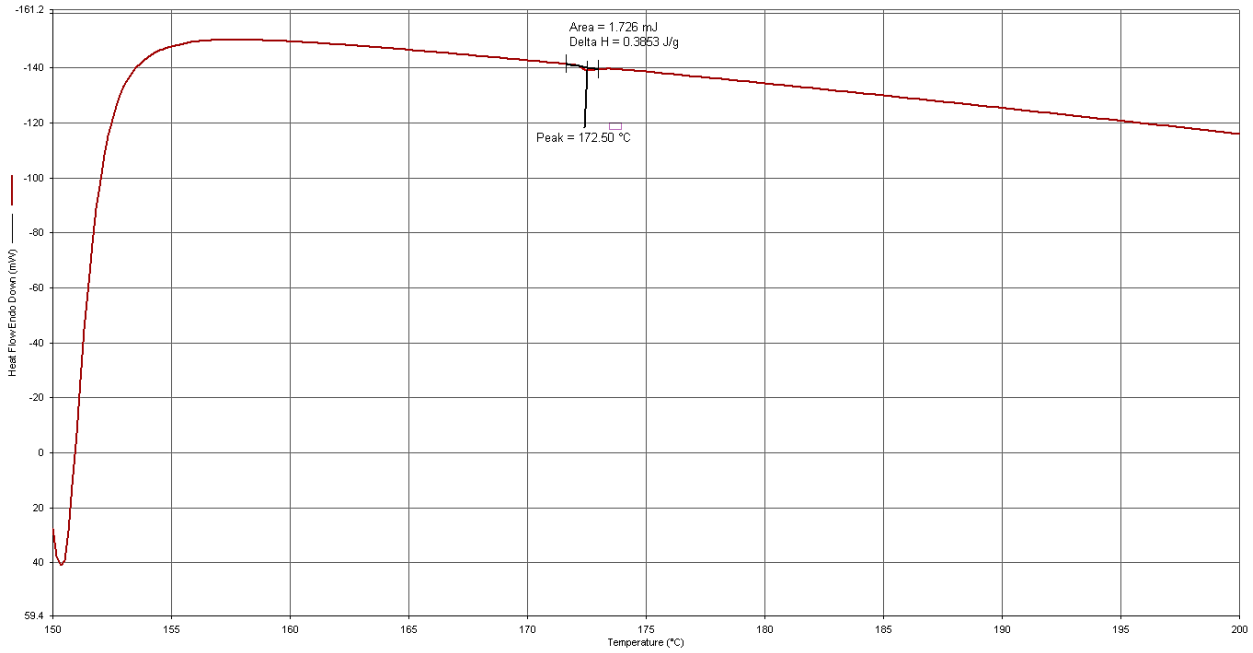


Figura 20. Termograma matriz Indometacina en hidrólisis básica durante 24hrs

En el cromatograma de Indometacina (figura 21) se observaron dos picos en el tiempo de retención 1.4 min y otro en 3.1 min que no se observaron en la valoración inicial de la Indometacina indicativo de inestabilidad a la primera hora de la condición y se realizó la comparación con la matriz.

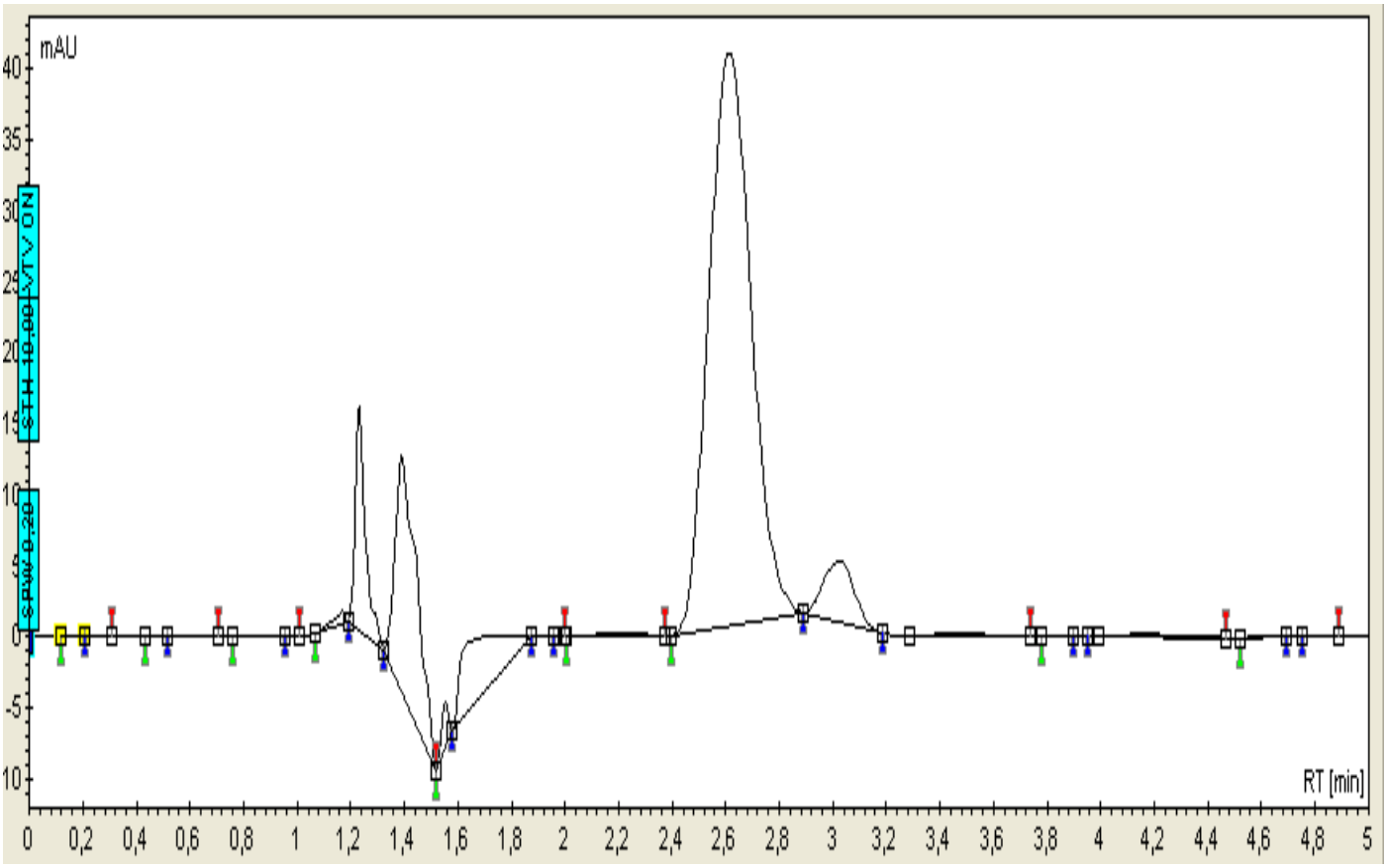


Figura 21. Cromatograma de Indometacina en hidrólisis básica con amortiguador pH 7.2 durante 1 hora

En el cromatograma obtenido (figura 22) se observó el pico característico de Indometacina, cuyo tiempo de retención es 3 min y el estándar interno ketorolaco cuyo tiempo de retención fue 1.6 min y en comparación con el cromatograma de la Indometacina a las mismas condiciones no se encontraron los picos en los tiempos de retención 3.1 min o 1.4 min.

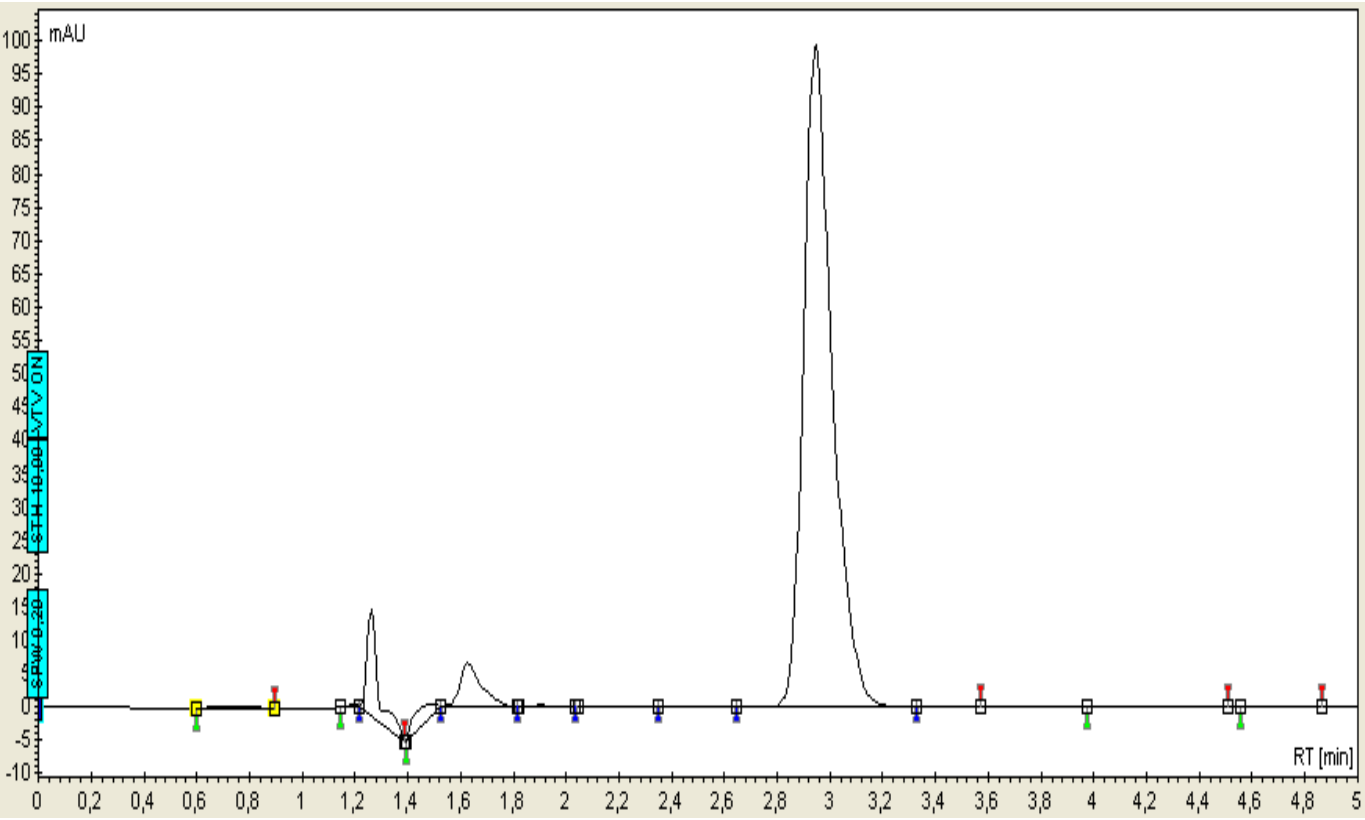


Figura 22. Cromatograma de matriz de Indometacina en hidrólisis durante 1 hora con amortiguador pH 7.2

Únicamente se evaluó en estas condiciones durante 3 horas obteniendo prácticamente los mismos resultados lo cual indica la inestabilidad del fármaco, no así el fármaco contenido en la matriz al menos durante 3 horas.

Una vez que fueron sometidas las matrices a las condiciones descritas anteriormente, con los resultados obtenidos se realizaron las gráficas correspondientes graficando tiempo contra % fármaco y se procedió a determinar la cinética de las degradaciones.

	Condición	Orden de cinética
Matriz de Indometacina	Estufa 40°C 75%HR	2
	Estufa 60°C	2
	Estufa 80°C	2
	Hidrólisis ácida	2
	Hidrólisis básica	1
Indometacina	Estufa 40°C 75%HR	2
	Estufa 60°C	2
	Estufa 80°C	2
	Hidrólisis ácida	2
	Hidrólisis básica	1

Tabla 2. Cinéticas de degradación.

Con los resultados obtenidos y con las gráficas(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), se observó que la matriz protege al fármaco encapsulado, ya que no se observó producto de degradación en las matrices de hidrólisis básica con amortiguador pH 7.2, mientras que se observó degradación en el fármaco sólo.

A pesar de que en algunas gráficas (1,3,5,7,9) se observa una menor concentración de fármaco contenido en la matriz que en estado libre no es del todo indicativo de inestabilidad, ya que la menor concentración de fármaco en la matriz pudo deberse a algunos factores: el tamaño y el tipo de poro, cambiando la naturaleza hidrofílica/hidrofóbica del poro; esto pudo cambiar durante el tiempo en el que se sometieron las matrices. No existe algún estudio que haya evaluado el tipo y el tamaño de poro durante el tiempo o si éste se modifica con ciertas condiciones; los estudios que se han realizado utilizan otro tipo de moléculas para ayudar a liberar el fármaco, enzima, proteína dependiendo el tipo de precursores que se hayan utilizado otro factor que puede afectar es el procedimiento de extracción, ya que a pesar de que es eficiente como se observó en la valoración inicial de las matrices no se sabe la eficiencia después de someter las matrices a dichas condiciones, así mismo el tamaño de la molécula es importante, así como la masa molecular, que en muchos de los casos rige la cantidad y eficiencia de encapsulación de la misma, la cantidad de hidrógenos que tiene la molécula que puede formar puentes de hidrógeno con los grupos silanol de la matriz que impediría una difusión completa del fármaco fuera de la matriz. Como también se marca en la literatura en algunos casos las proteínas pueden quedar retenidas en el interior de los poros o por impedimento estérico, lo cual podría ser el caso de los fármacos utilizados[29]. En muchas de las referencias coinciden que la efectividad en la liberación de la molécula encapsulada así como la eficiencia del efecto de la misma se ve influenciada por la estructura de la matriz[23,,29,41] lo que sí es más significativo es la aparición de los productos de degradación.

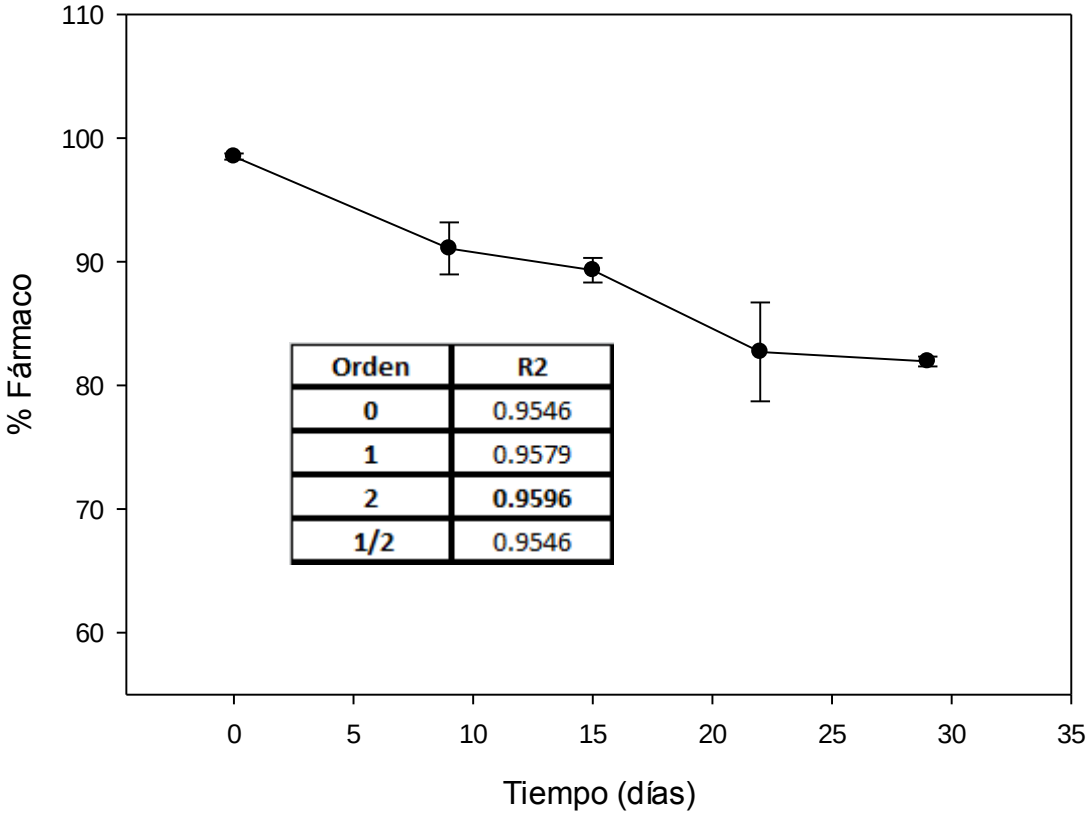
La diferencia de cinéticas pudo deberse al tipo de condición a la que fueron sometidas las matrices, ya que se sabe que la matriz es estable a condiciones térmicas diferentes[23,41], se sabe que no lo es a cambios de pH[37] y ya que la cinética de degradación se realiza midiendo la concentración de fármaco con respecto al tiempo, se podría esperar que hubiera un ligero cambio

ya que como se mencionó anteriormente es mayor el cambio de la estructura de la matriz en esta condición lo que afectó la cantidad de fármaco que liberó.

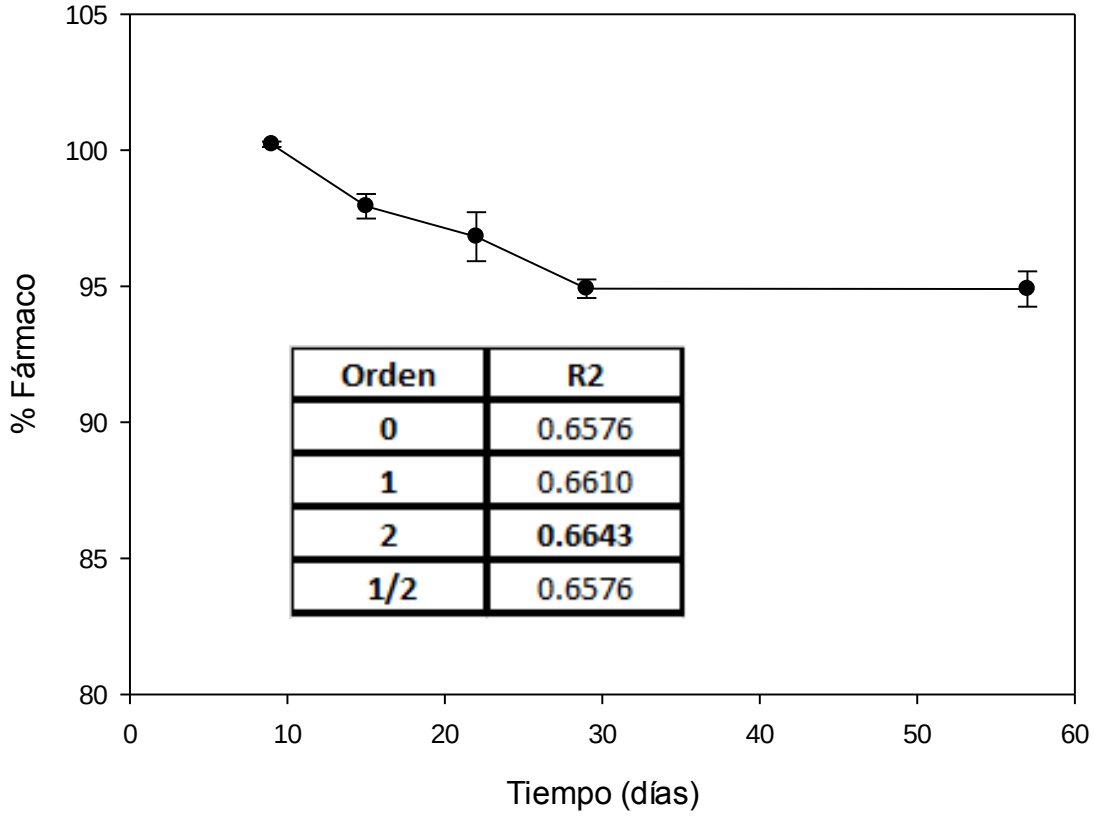
En la tabla 3 se observan las condiciones que se analizaron y en cuales de ellas se encontró producto de degradación del fármaco en estado libre y el contenido en matriz.

	Matriz Indometacina	**Indometacina**
Condición	**Producto de degradación**	**Producto de degradación**
Estufa 40°C 75%HR	**-**	**-**
Estufa 60°C	**-**	**-**
Estufa 80°C	**-**	**-**
Hidrólisis ácida	**-**	**-**
Hidrólisis básica	**-**	**++**

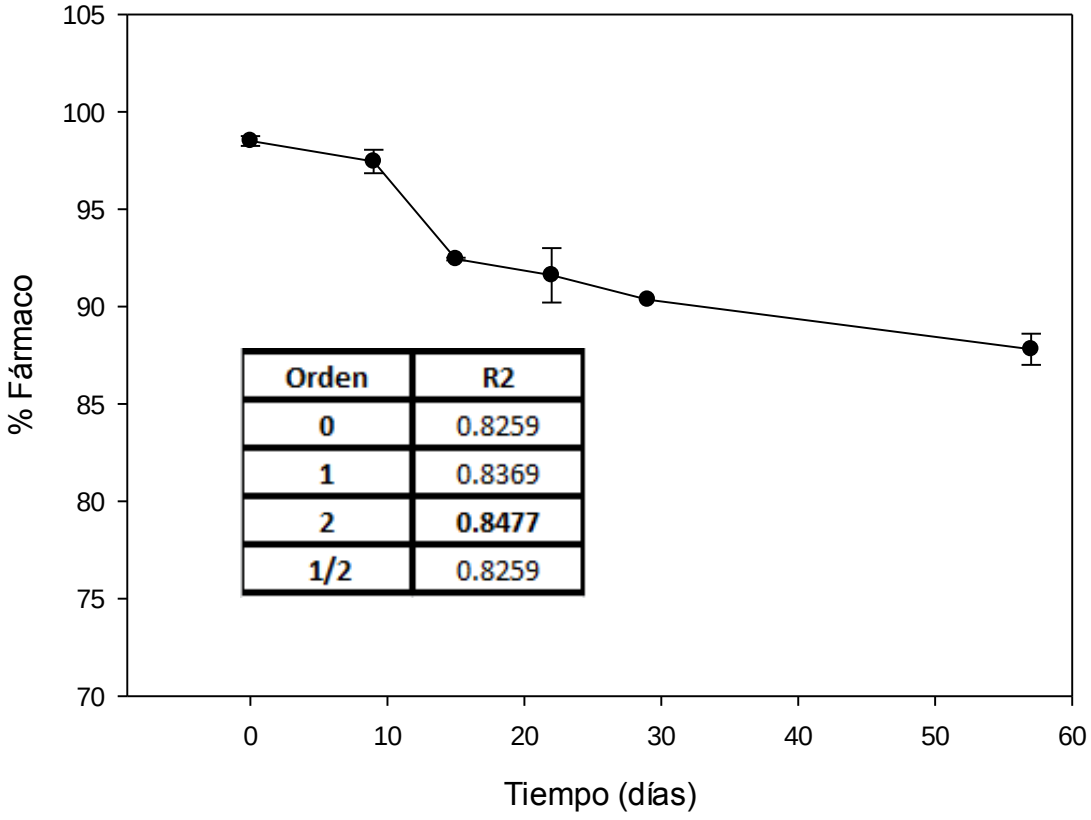
Tabla 3. Interpretación (-) ausencia de producto de degradación, (+) producto de degradación (++) mayor cantidad de producto de degradación.



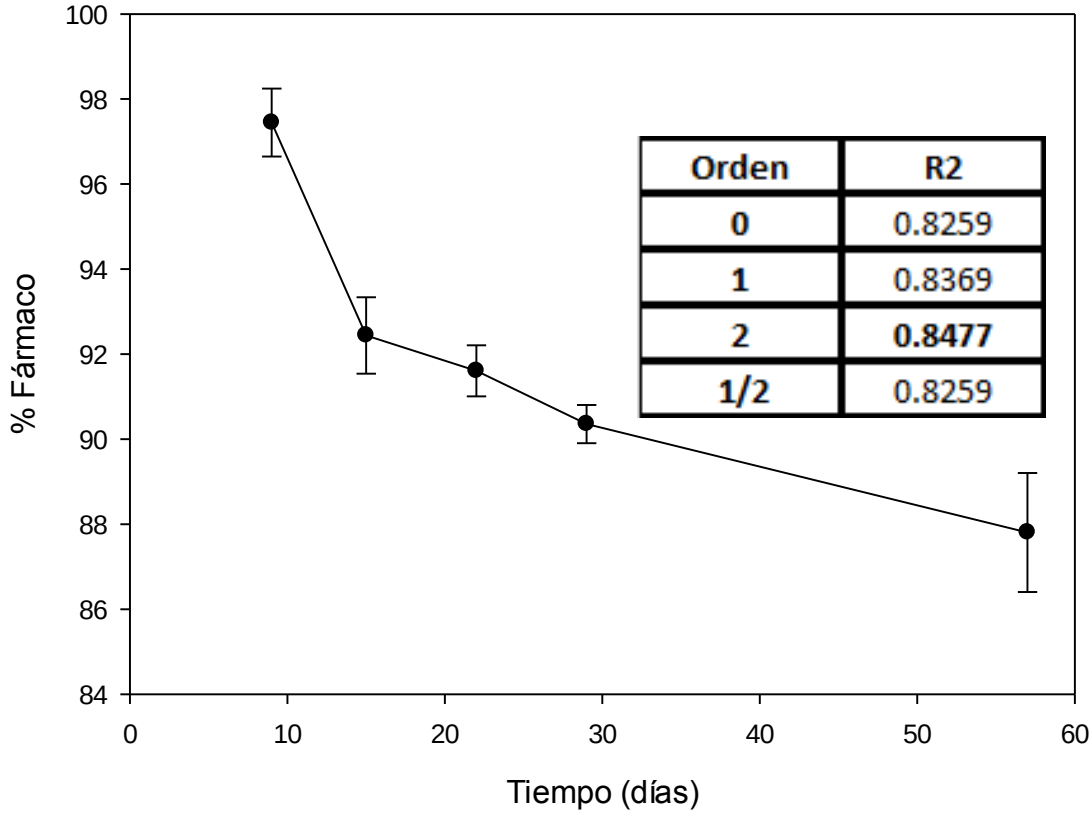
Gráfica 1. Estabilidad de matriz Indometacina estufa 40°C HR 75% durante 29 días



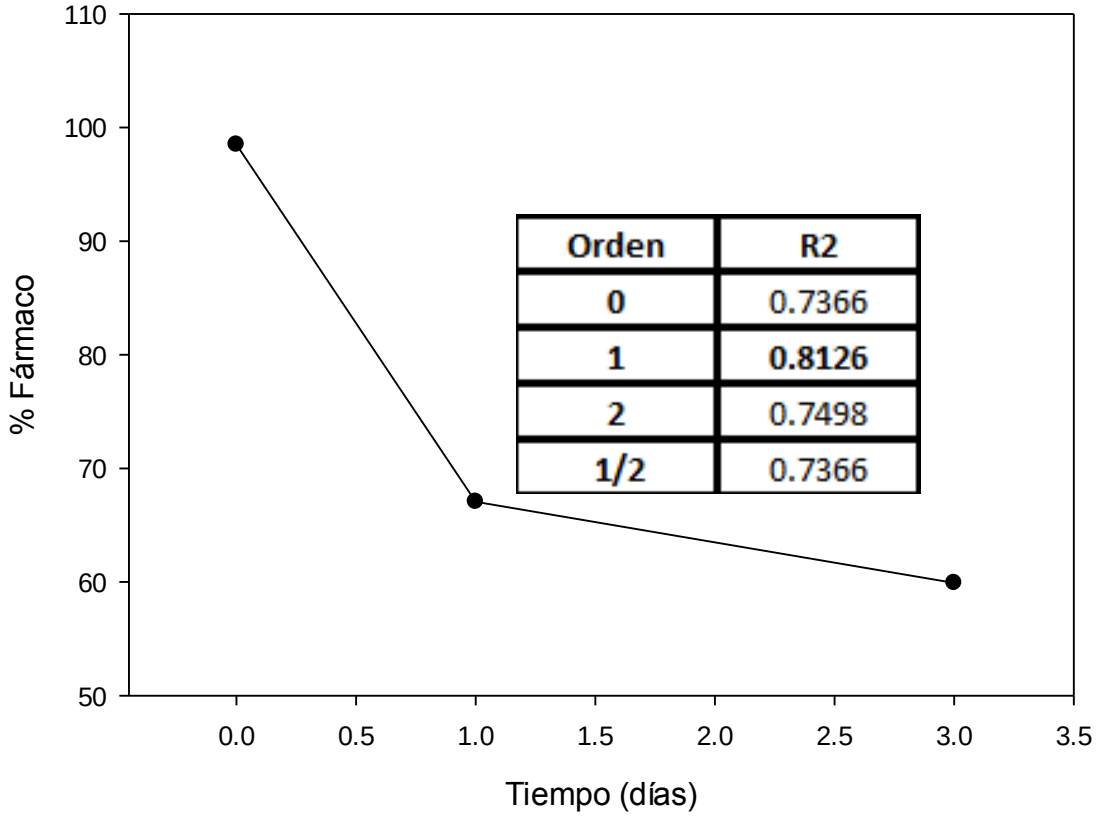
Gráfica 2. Estabilidad Indometacina estufa 40°C HR 75% 57días



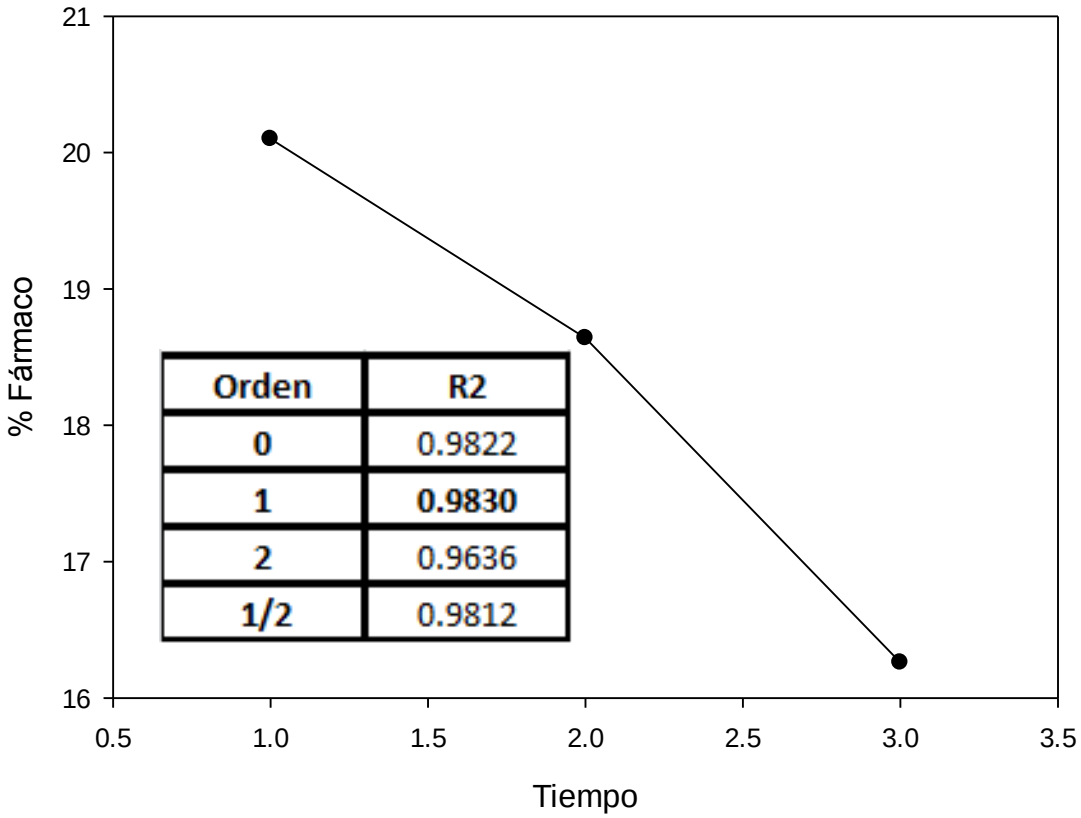
Gráfica 3. Estabilidad de matriz Indometacina estufa 80°C 57 días.



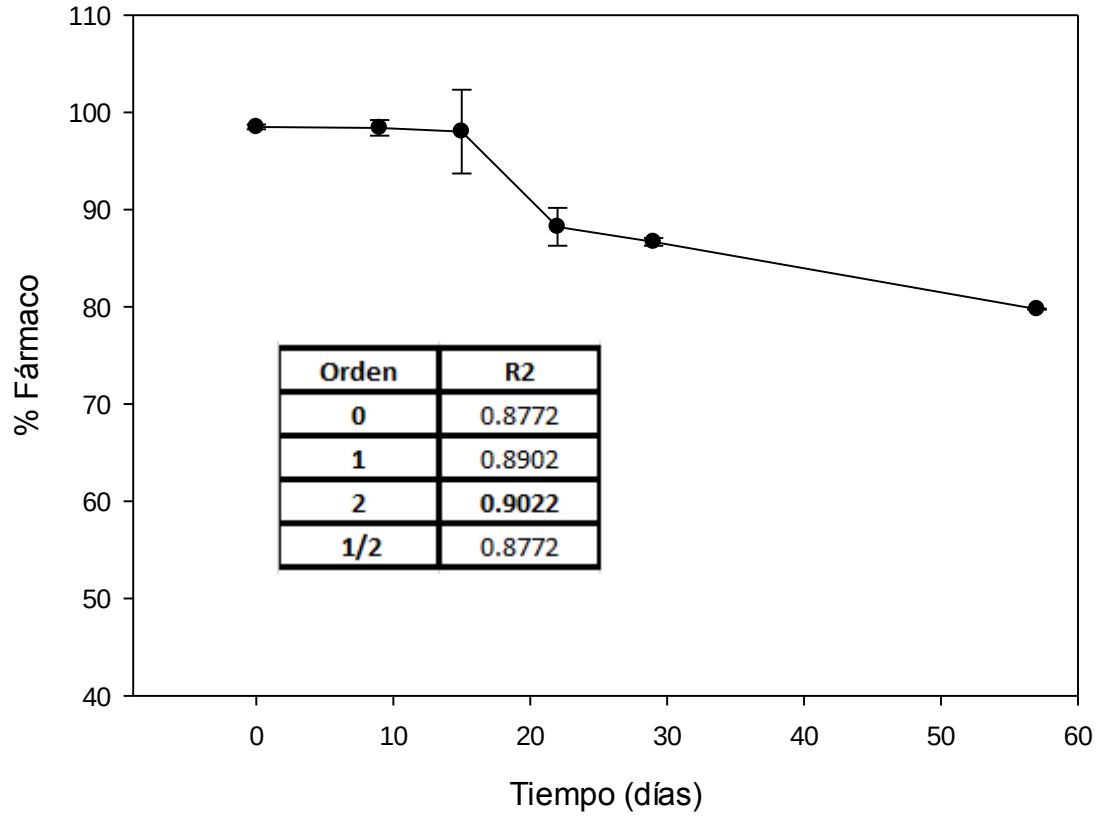
Gráfica 4. Estabilidad Indometacina estufa 80°C 57días



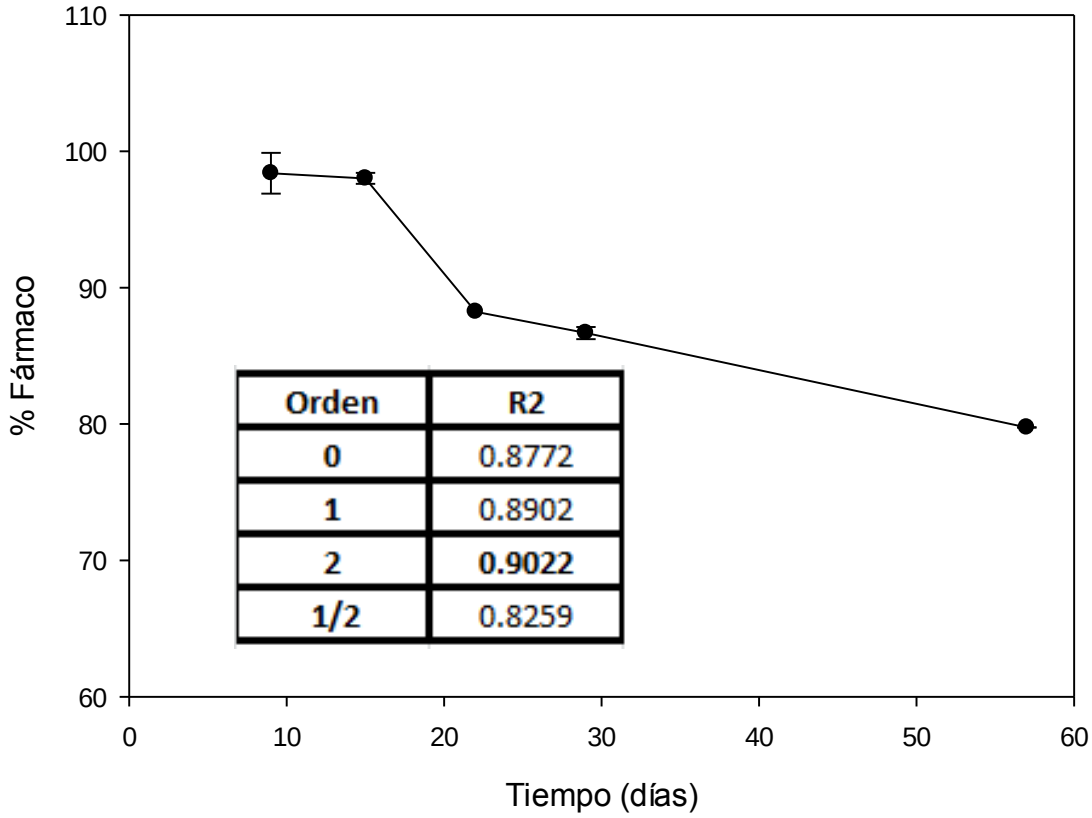
Gráfica 5. Estabilidad matriz Indometacina hidrólisis básica 3 horas



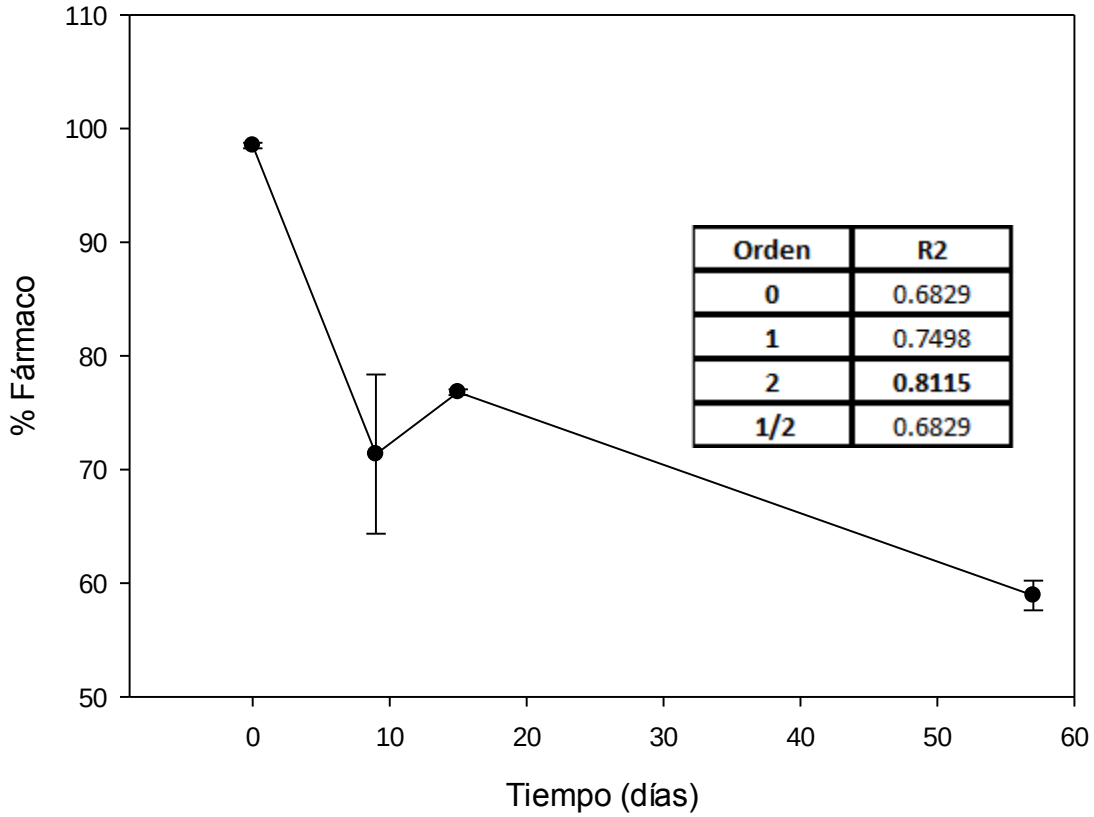
Gráfica 6. Estabilidad Indometacina hidrólisis básica 3 horas



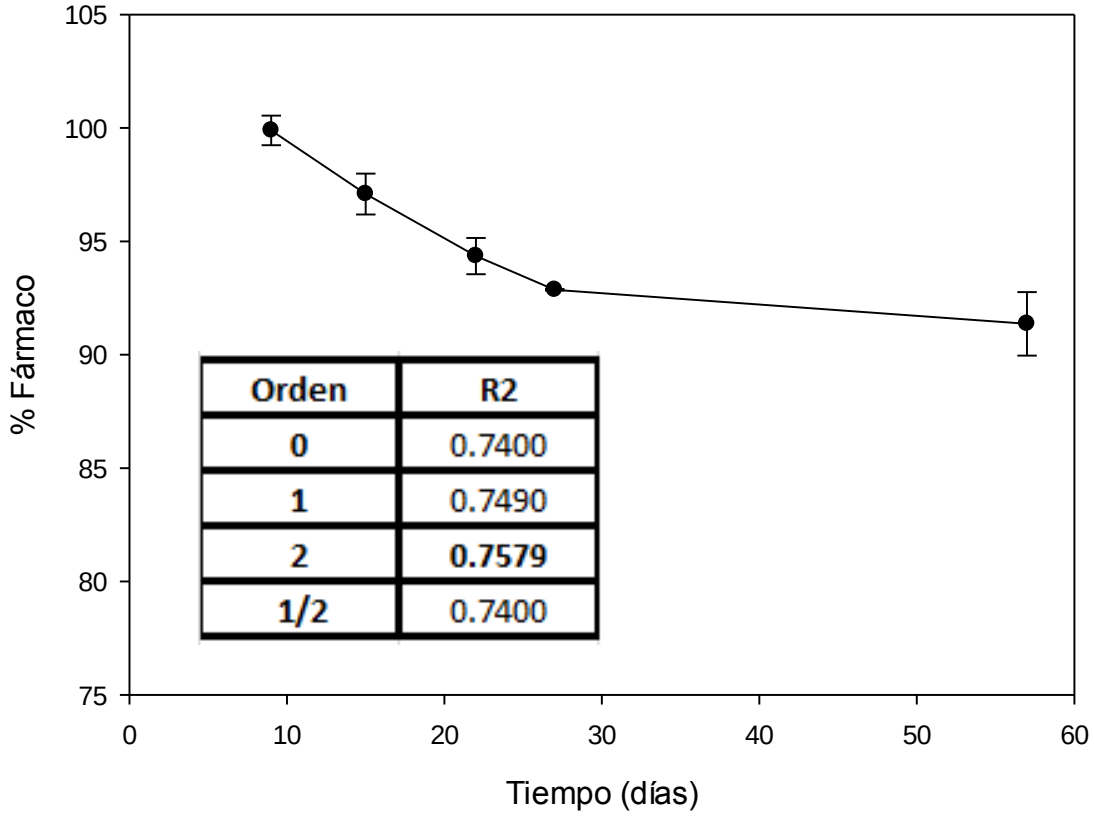
Gráfica 7. Estabilidad de matriz Indometacina estufa 60°C 57días



Gráfica 8. Estabilidad Indometacina estufa 60°C 57días



Gráfica 9. Estabilidad matriz Indometacina hidrólisis ácida 57días



Gráfica 10. Estabilidad Indometacina hidrólisis ácida 57días

8.7 Control de calidad de las matrices de Ibuprofeno.

Al igual que como con las matrices de Indometacina fue necesario realizar la extracción del fármaco encapsulado. El ultrasonido fue un paso crítico en el procedimiento ya que no se conoce la cantidad de fármaco que se liberó con dicho método. Se realizó con este método que fue el mejor, ya que se probó con diferentes amortiguadores en diferentes pH, así como con metanol y etanol, así como diferentes cantidades, se demostró que el método descrito extrae la mayor cantidad de fármaco dentro de las matrices[20].

8.7.1 Análisis cromatográfico.

Se realizó la valoración de las matrices de Ibuprofeno fabricadas. En el cromatograma (figura 23) no se observó ningún otro pico más que los característicos del Ibuprofeno (min 4.08) y de ketorolaco (min. 1.7) por lo que no se observó algún producto de degradación o alguna otra señal que presentó alguna impureza.

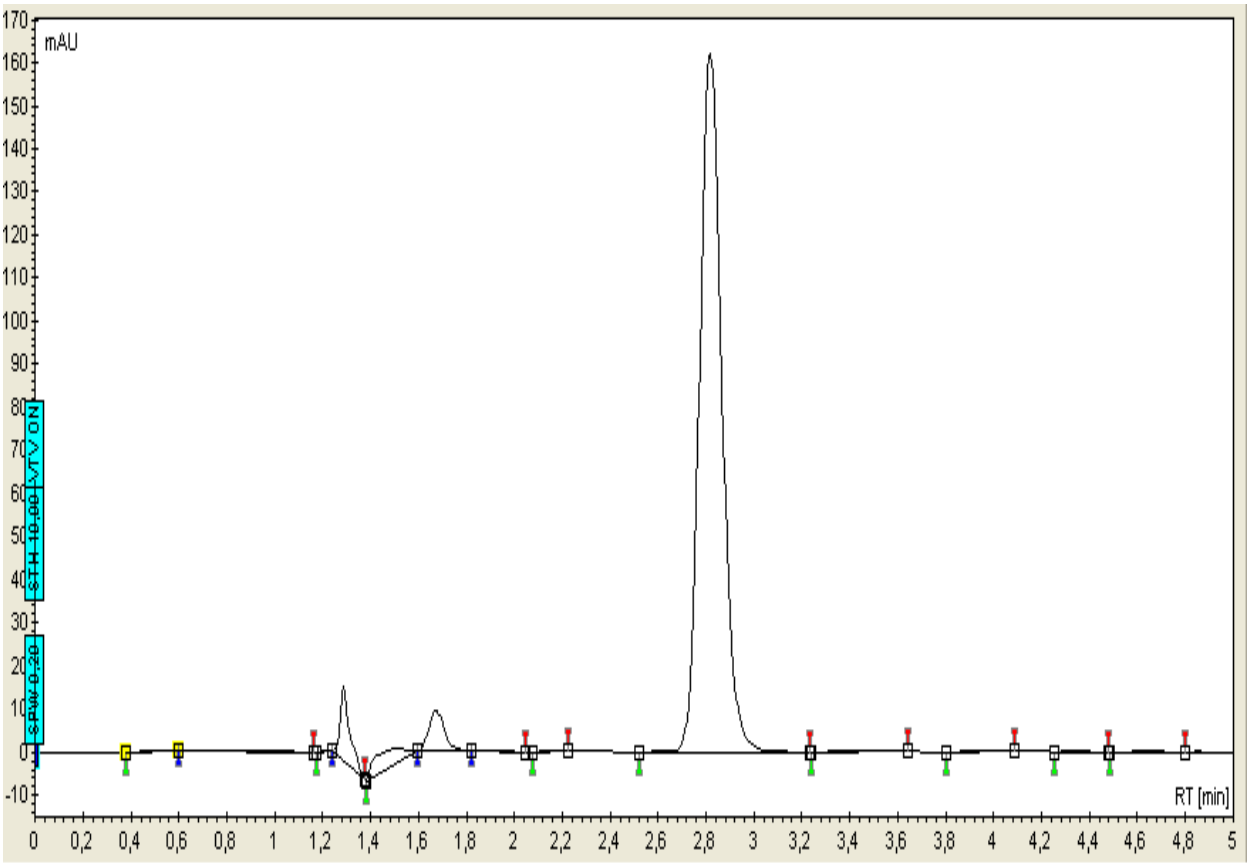


Figura 23. Cromatograma de matriz sol-gel de Ibuprofeno valoración inicial.

8.7.2 Análisis térmico.

Se analizó una muestra de matriz de Ibuprofeno (figura 24) bajo las mismas condiciones del equipo descritas para las matrices placebo. Al igual que con las matrices placebo analizadas con anterioridad sólo se observó la pérdida de humedad retenida por la matriz, no se observó el punto de fusión del Ibuprofeno por lo que se confirmó la encapsulación del fármaco dentro de la matriz.

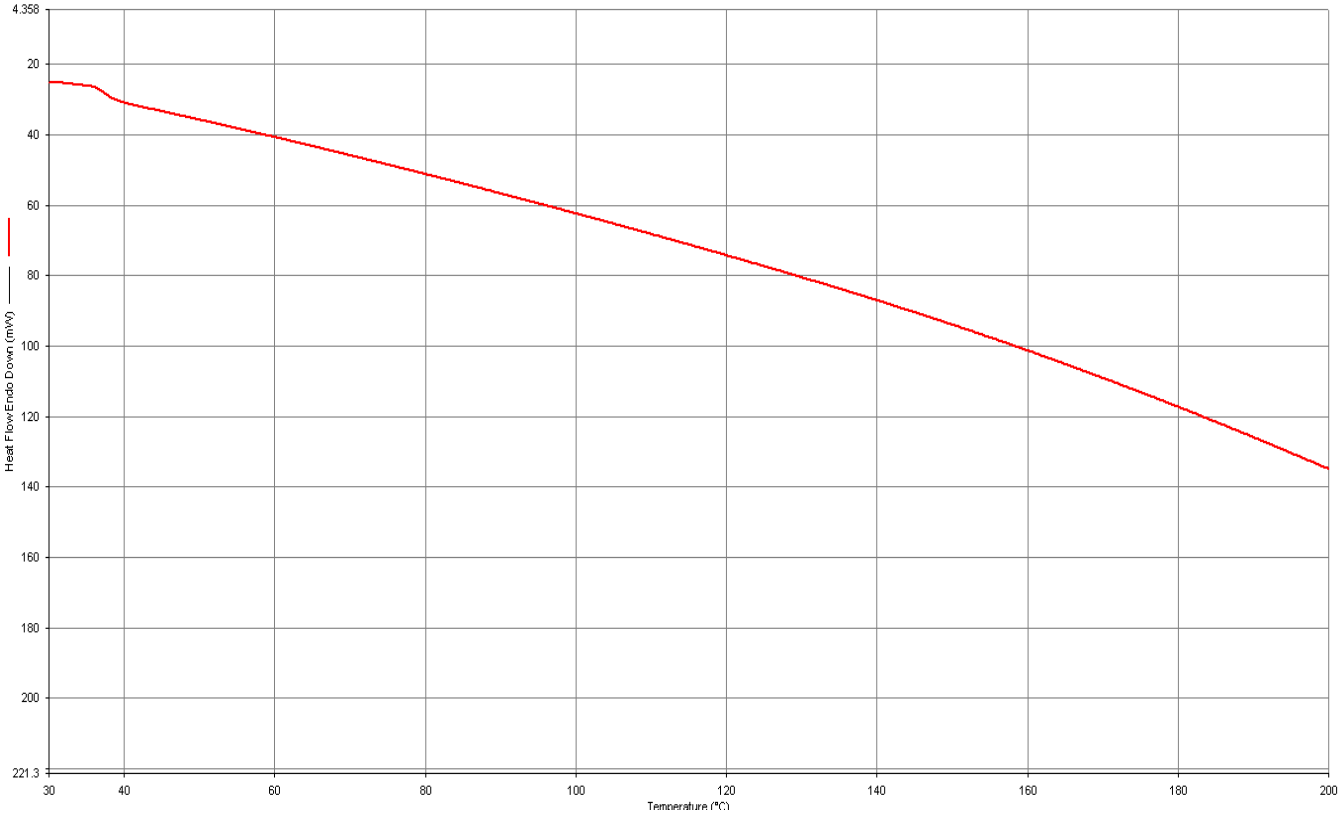


Figura 24. Termograma de matriz sol-gel de Ibuprofeno.

8.7.3 Análisis infrarrojo.

En el espectro (figura 25) se observó en la región de 3500-3750 cm^{-1} los enlaces O-H tanto del agua contenida en la matriz, el enlace Si-OH. En la región 455-457 cm^{-1} se encuentra el enlace Si-O-Si, en la parte de 1100cm^{-1} se encuentra el estiramiento del enlace Si-O-Si y en la región de 900-980cm^{-1} el estiramiento del Si-OH[34,35]. Cabe mencionar que no se encontraron las señales 1229,1269, 1180, 866, y 778 (huella digital del compuesto) según lo reportado en la literatura[26,35,36], que fue indicativo de la encapsulación del fármaco dentro de la matriz,

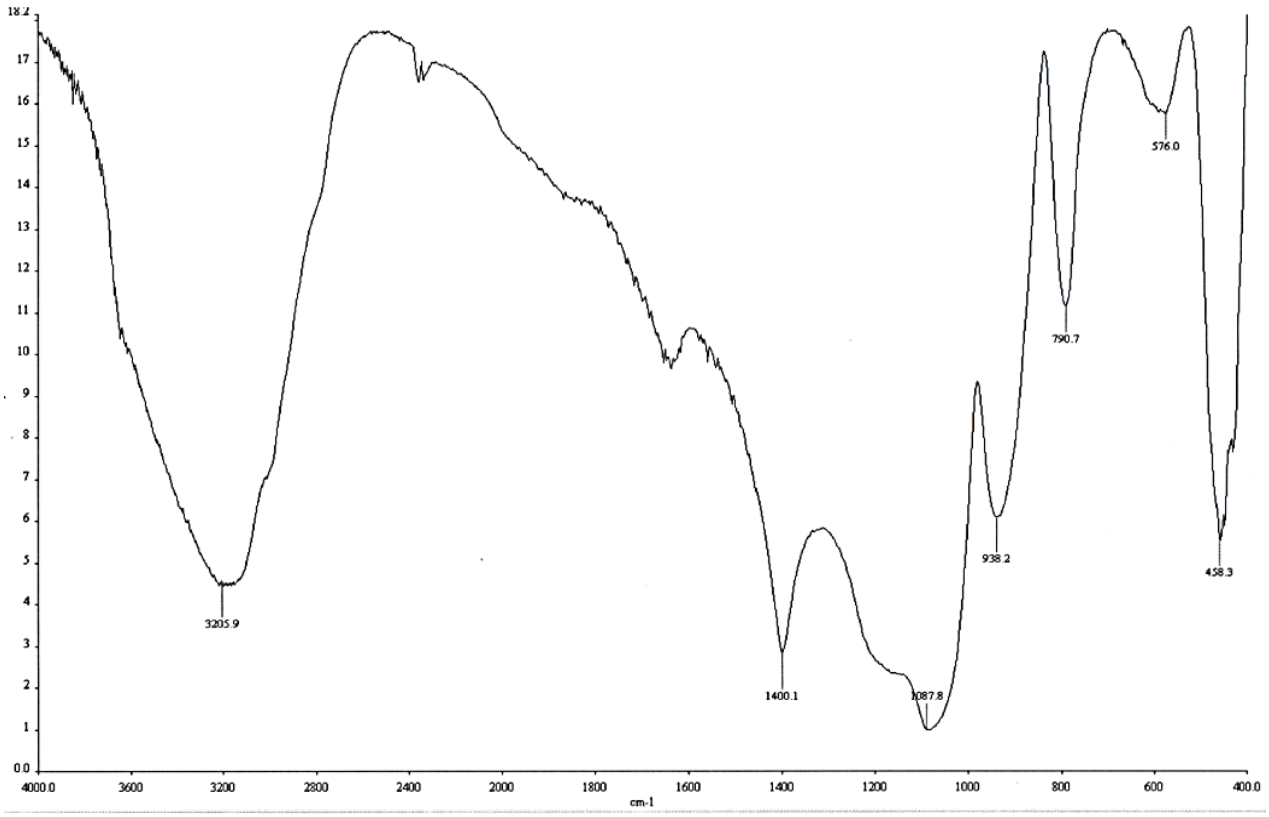


Figura 25. Espectro Infrarrojo de matriz sol-gel de Ibuprofeno.

Con los datos obtenidos de la CDB, CLAR e IR, se pudo confirmar tanto la encapsulación del fármaco así como la estabilidad inicial del fármaco y que las matrices no contenían ninguna otra impureza por lo que se pudo proseguir con el proyecto sometiendo las matrices de Ibuprofeno a las condiciones descritas con anterioridad.

8.8 Estabilidad de matrices Ibuprofeno y fármaco sólo.

Una vez que se realizó el control de calidad a las matrices fabricadas se obtuvo un lote de 70.96 g contiendo 0.99 g de fármaco.

Se observaron algunos cambios tanto en matriz de Ibuprofeno como en el fármaco (tabla 4).

En cuanto a las matrices que se les agregó el HCl después de un par de días se observó que las matrices formaron un sedimento duro.

Con respecto a los fármacos se observó que a los pocos días en los que se agregó el ácido las muestras presentaban un aspecto parecido a una pasta. La muestra de Ibuprofeno fundió a las pocas horas de someterse a la estufa de 80°C (punto de fusión 75°C-78°C) [26], por lo que presentó inestabilidad física, cosa que no sucedió con las matrices a la misma condición.

Para la toma de muestra de las matrices como el fármaco sometidos a hidrólisis fue necesaria su previa neutralización y evaporación del ácido o base usada. Este procedimiento también presentó inconveniente al momento de realizar la pesada ya que cuando se evaporó el líquido, el precipitado resultante tenía una consistencia parecida al de una pasta.

Factor evaluado	Resultado	Interpretación
Estufa 80°C Ibuprofeno.	Fusión del Ibuprofeno.	Cambio físico del Ibuprofeno.
Adición de HCl a la matriz de Ibuprofeno.	Formación de sedimento duro.	Se observó un cambio físico al pasar de un polvo fino a un sedimento

Tabla 4. Resultados observados durante la estabilidad de las matrices de Ibuprofeno e Ibuprofeno.

Al analizar los cromatogramas de la matriz de Ibuprofeno (figura 26) y el de fármaco sólo (figura 27) obtenidos se encontró que en el tiempo de 39 días en la condición de hidrólisis ácida un pico correspondiente a un producto de degradación tanto en la matriz como en el fármaco sólo. Sin embargo se observó que la cantidad de producto de degradación es mayor en el fármaco sólo comparado con el contenido en las matrices.

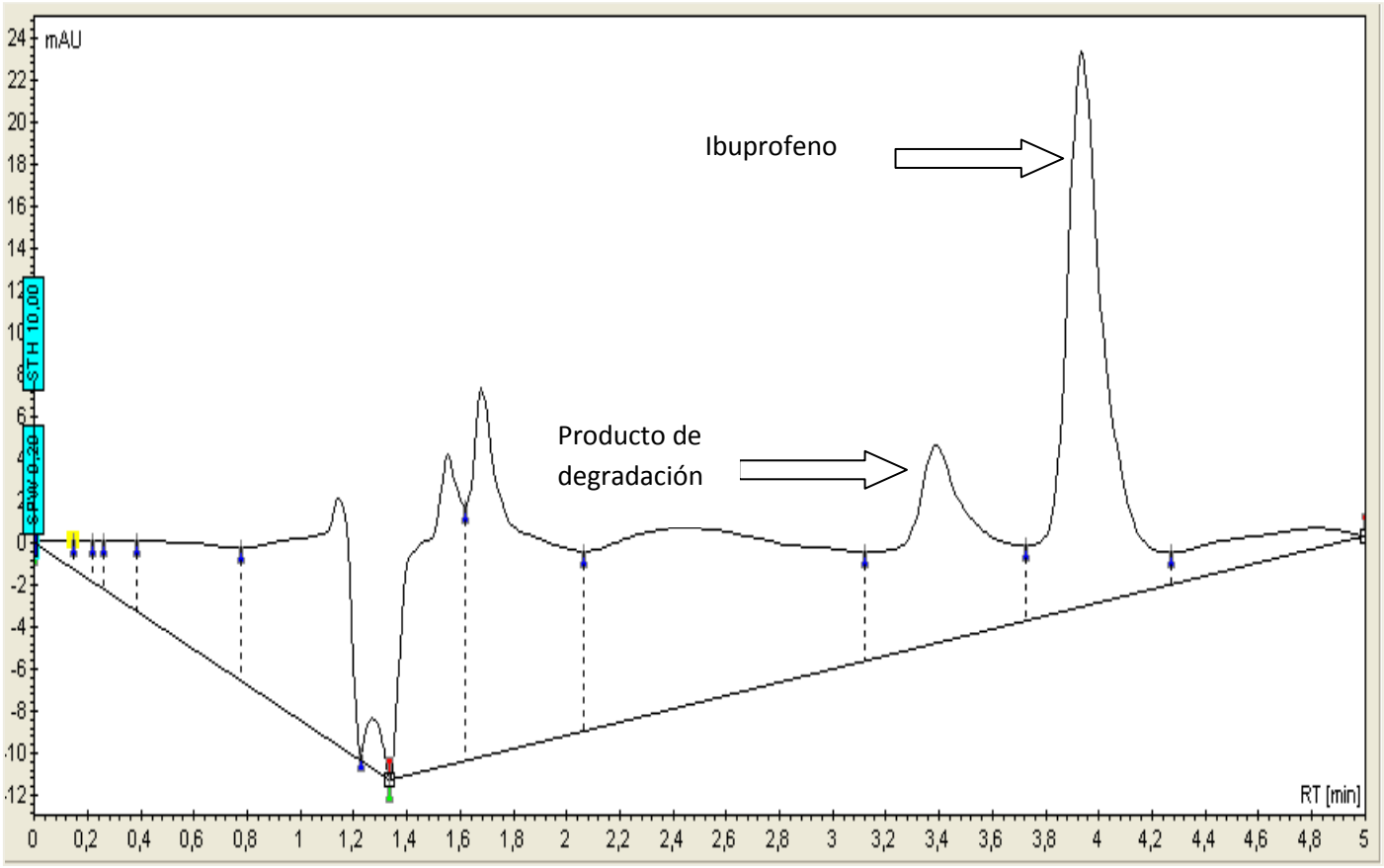


Figura 26. Cromatograma de matriz de Ibuprofeno en hidrólisis ácida durante 74 días.

Se observó en el minuto 4 el pico característico del Ibuprofeno en el min 3.4 se observó un pico que no aparecía con anterioridad, que se pudo deber a un producto de degradación.

Se observó el pico de un posible producto de degradación del Ibuprofeno en el minuto 3.4 al igual que en la matriz y se observó el pico de Ibuprofeno en el minuto 4, la altura del pico del posible producto de degradación es alta en comparación con el pico de Ibuprofeno y en comparación con el de la matriz.

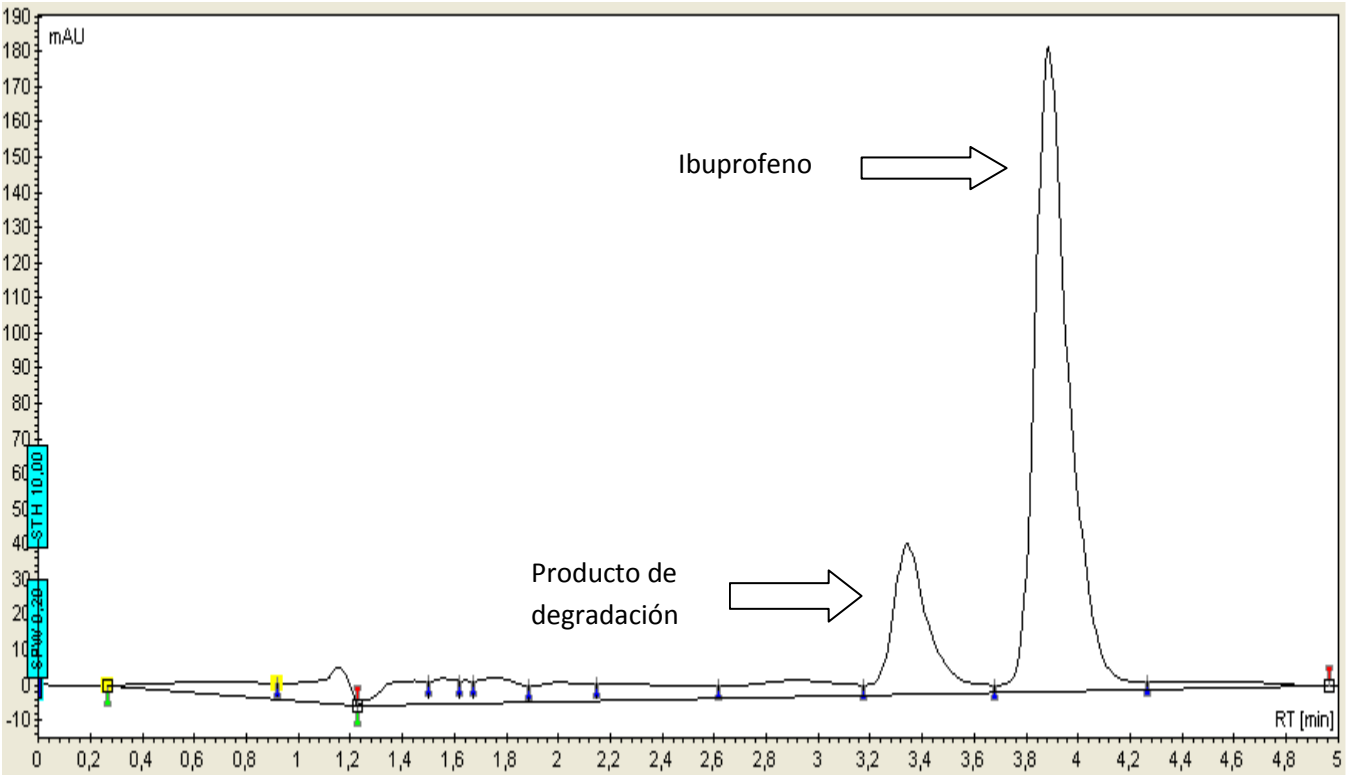


Figura 27. Cromatograma de Ibuprofeno en hidrólisis ácida durante 74 días.

Con el análisis de los resultados obtenidos con anterioridad se demostró que la matriz protege al fármaco de la degradación, ya que como se dijo anteriormente el Ibuprofeno sometido a la estufa de 80°C presentó una degradación física (fusión), mientras que la matriz no presentó esa degradación. Por otra parte en cuanto a la hidrólisis ácida en donde se observó un producto de degradación tanto como en la matriz como en el fármaco en estado libre no fue posible cuantificar la cantidad de producto de degradación obtenido.

Una vez que fueron sometidas las matrices a las condiciones descritas anteriormente, con los resultados obtenidos fueron realizadas las gráficas correspondientes, graficando tiempo contra % fármaco y se procedió a determinar la cinética de las degradaciones, que en todos los casos tanto de matriz (gráfica 11, 13, 15, 17 y 19) como del fármaco sólo (gráfica 12, 14, 16, 18 y 20) presentaron una degradación de segundo orden para las condiciones de estufa, mientras que las muestras sometidas a hidrólisis presentaron una degradación de primer orden (tabla 5).

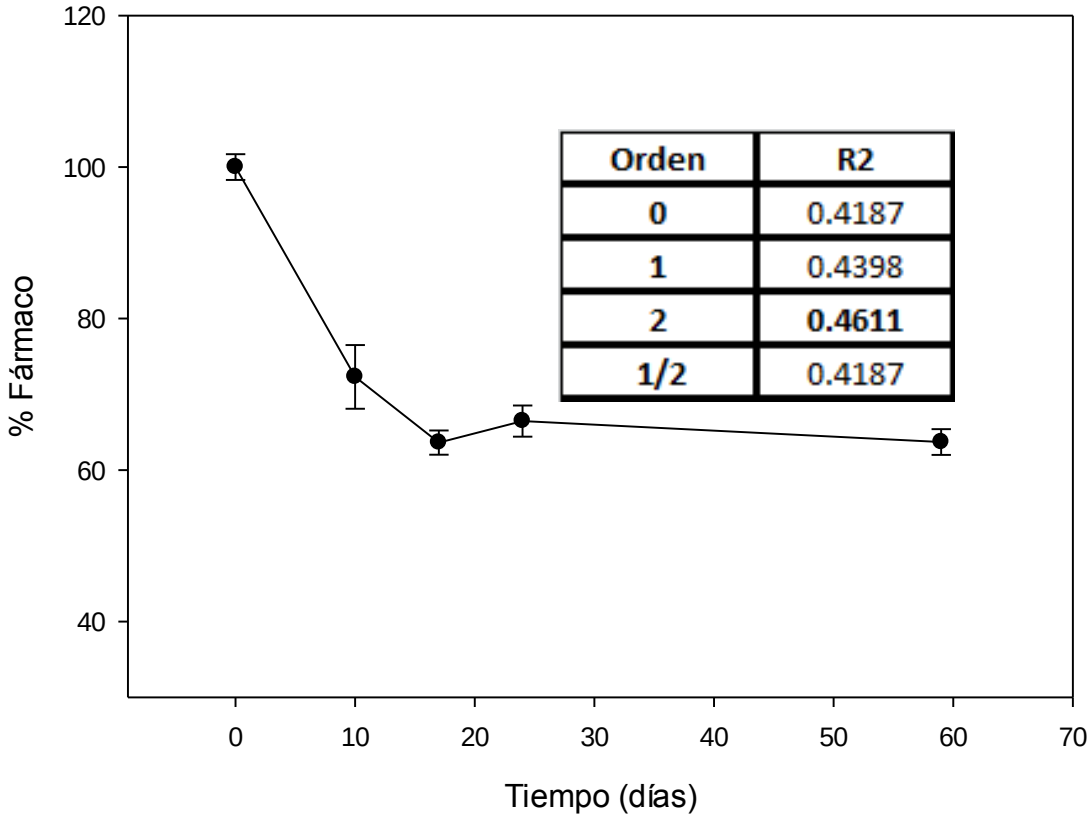
	Condición	Orden de cinética
Matriz de Ibuprofeno	Estufa 40°C 75%HR	2
	Estufa 60°C	2
	Estufa 80°C	2
	Hidrólisis ácida	1
	Hidrólisis básica	1
Ibuprofeno	Estufa 40°C 75%HR	2
	Estufa 60°C	2
	Estufa 80°C	2
	Hidrólisis ácida	1
	Hidrólisis básica	1

Tabla 5. Cinética de degradación.

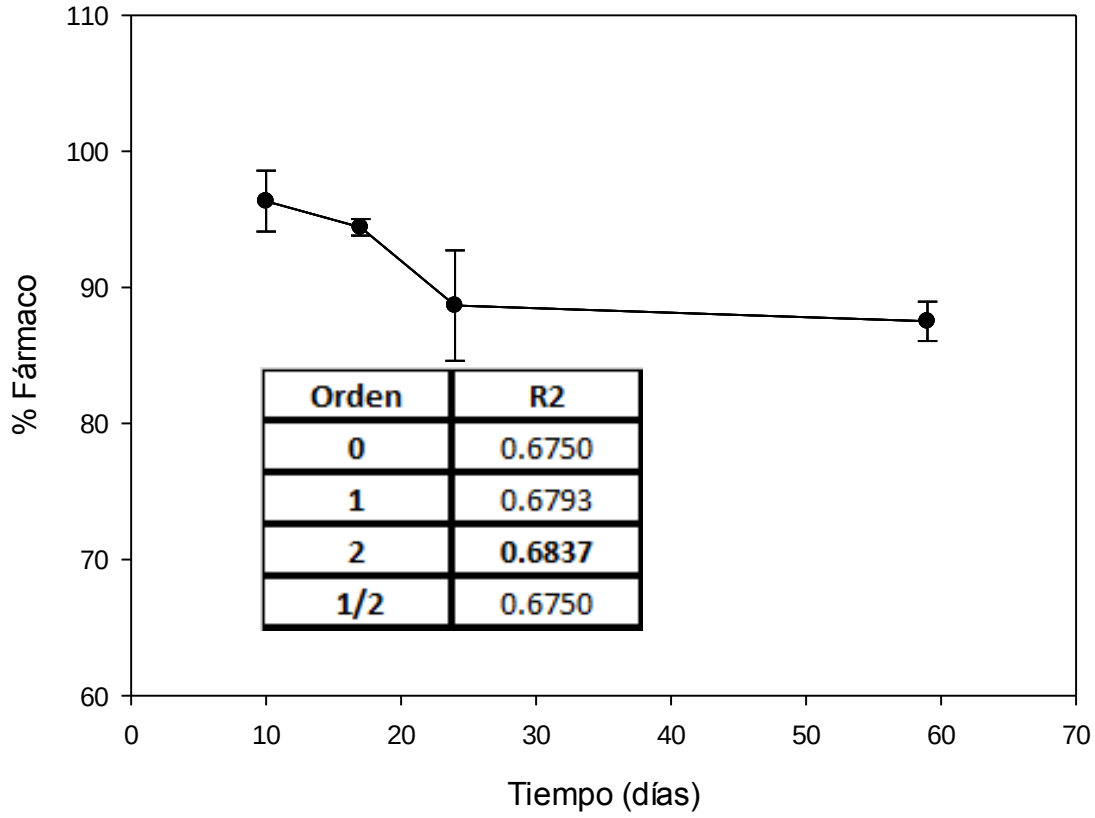
En la tabla 6 se observan las condiciones que se analizaron y en cuales de ellas se encontró producto de degradación del fármaco en estado libre y el contenido en matriz.

	Matriz Ibuprofeno	Ibuprofeno
Condición	Producto de degradación	Producto de degradación
Estufa 40°C 75%HR	-	+
Estufa 60°C	-	-
Estufa 80°C	+	+
Hidrólisis ácida	+	++
Hidrólisis básica	+	++

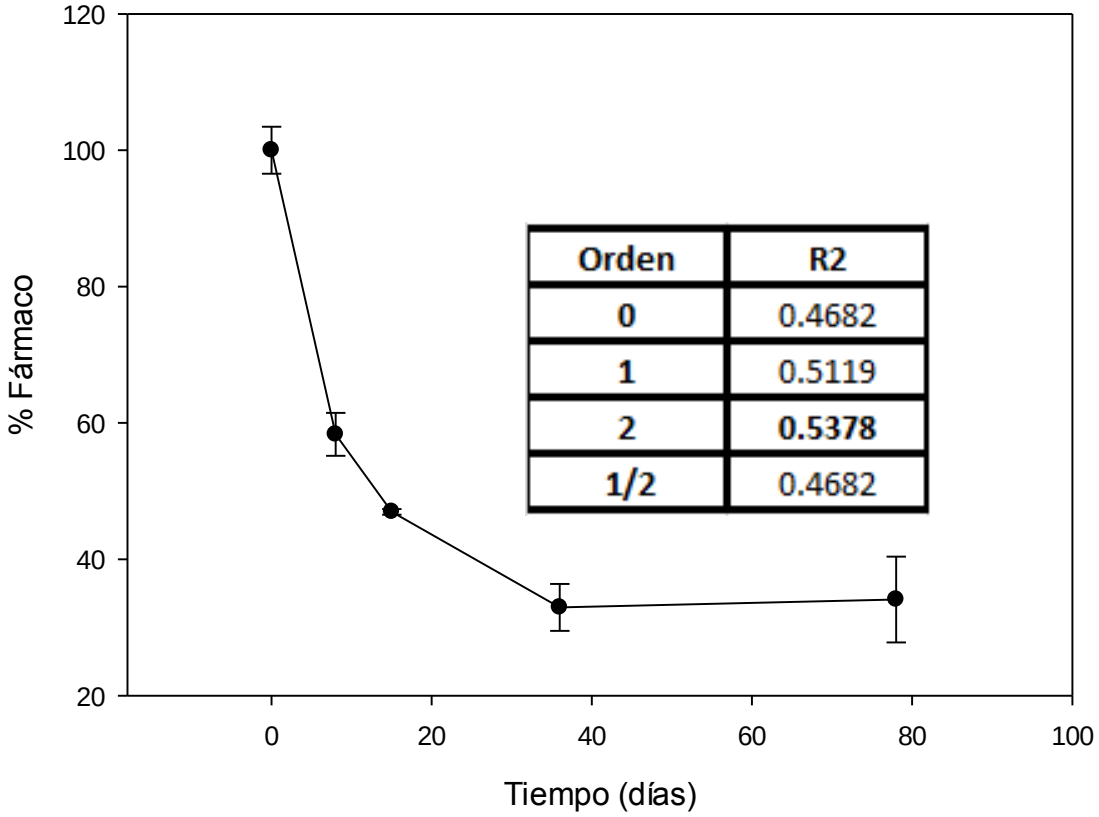
Tabla 6. Interpretación (-) ausencia de producto de degradación, (+) producto de degradación (++) mayor cantidad de producto de degradación.



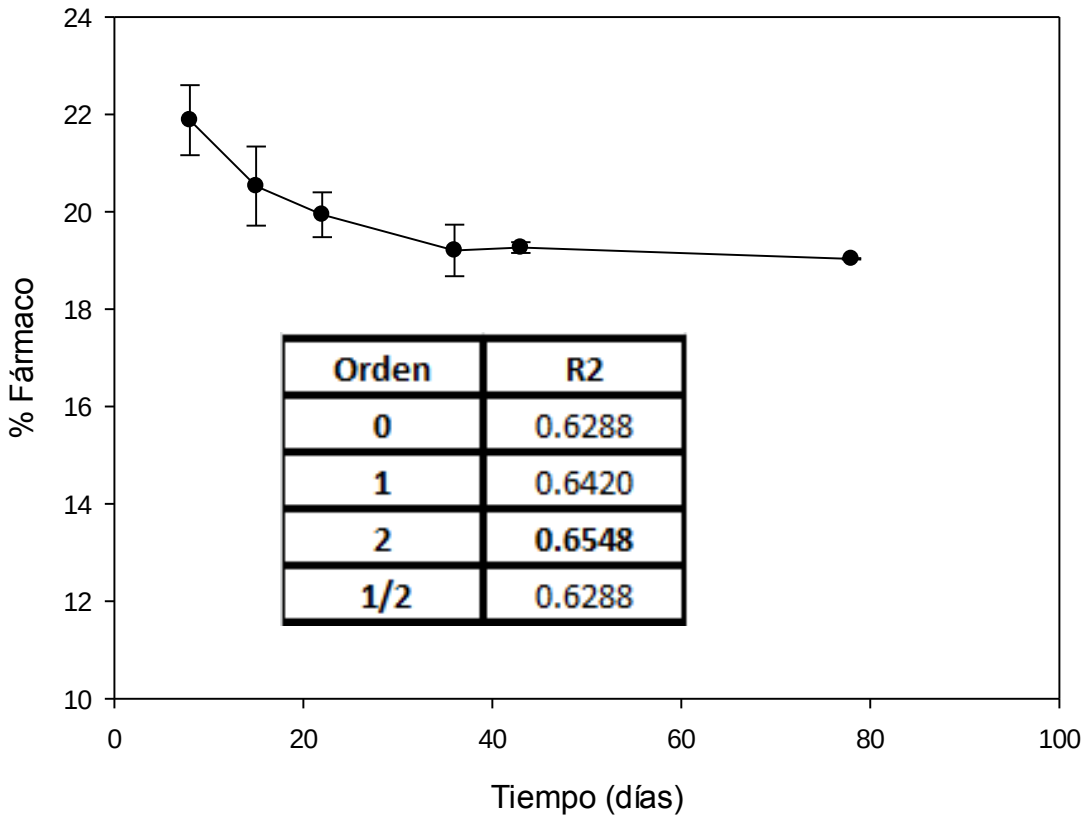
Gráfica 11. Estabilidad matriz Ibuprofeno estufa 40°C HR 75% 59 días.



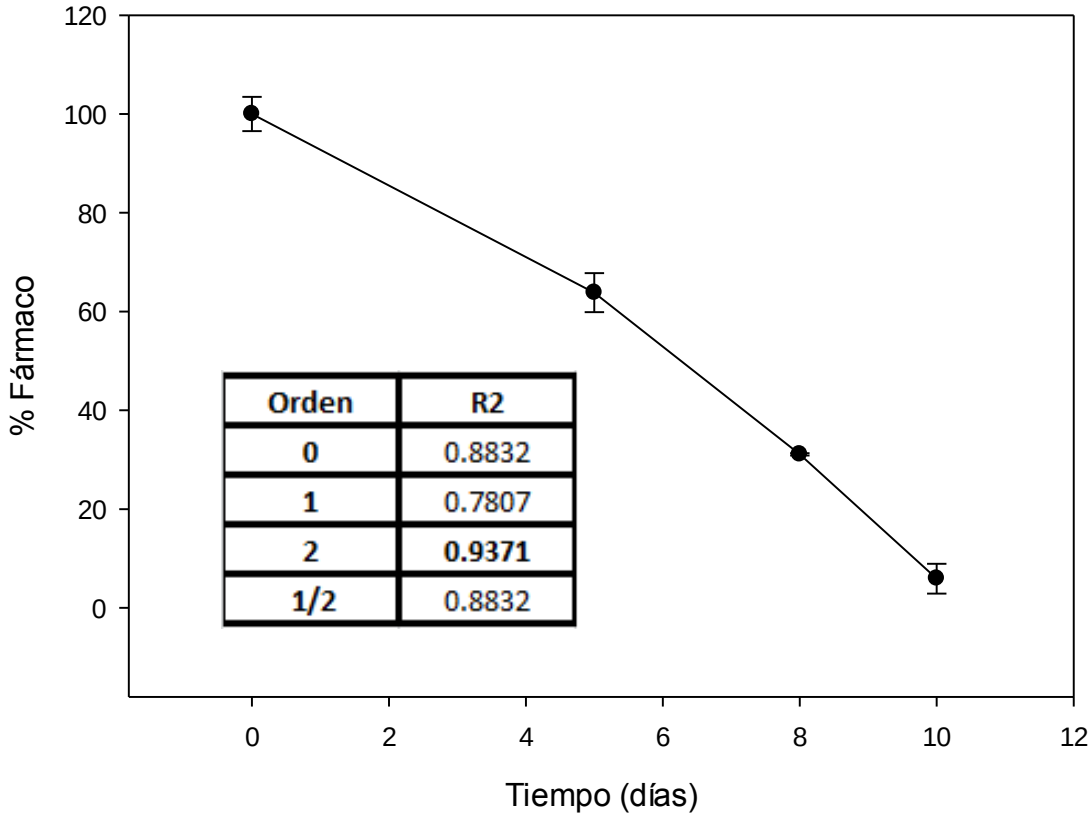
Gráfica 12. Estabilidad Ibuprofeno estufa 40°C HR 75% 59 días.



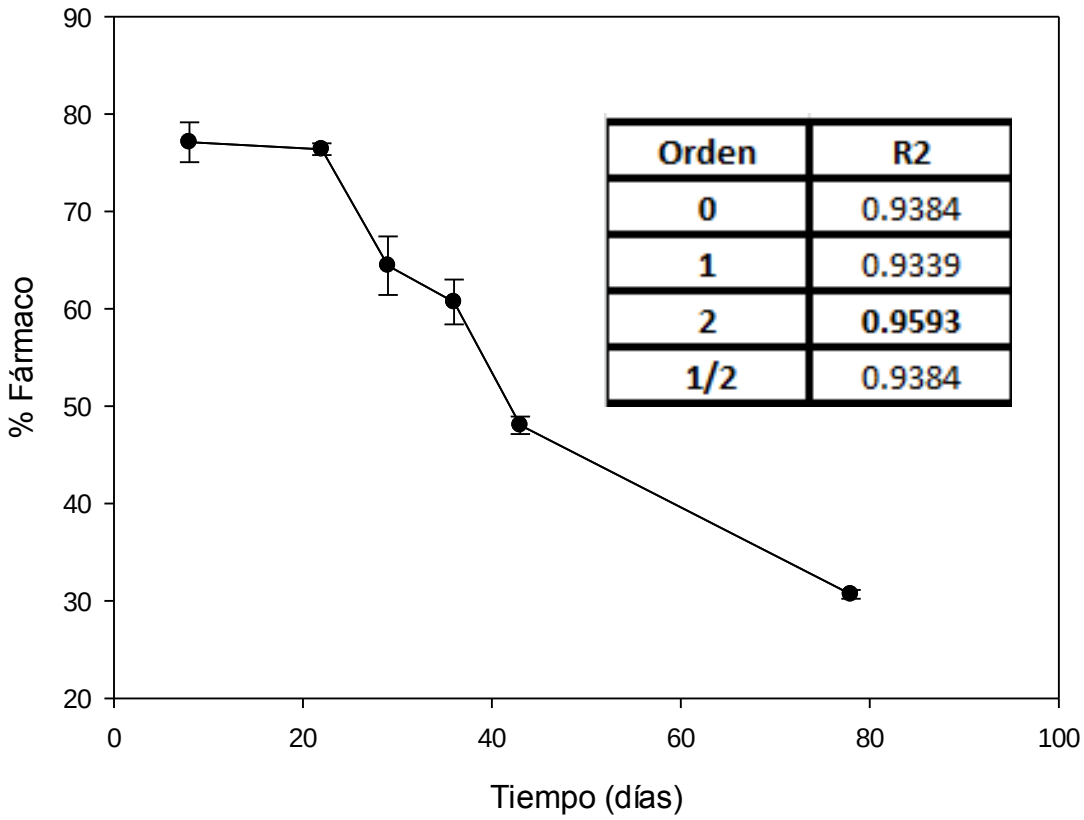
Gráfica 13. Estabilidad matriz Ibuprofeno estufa 60°C 78 días.



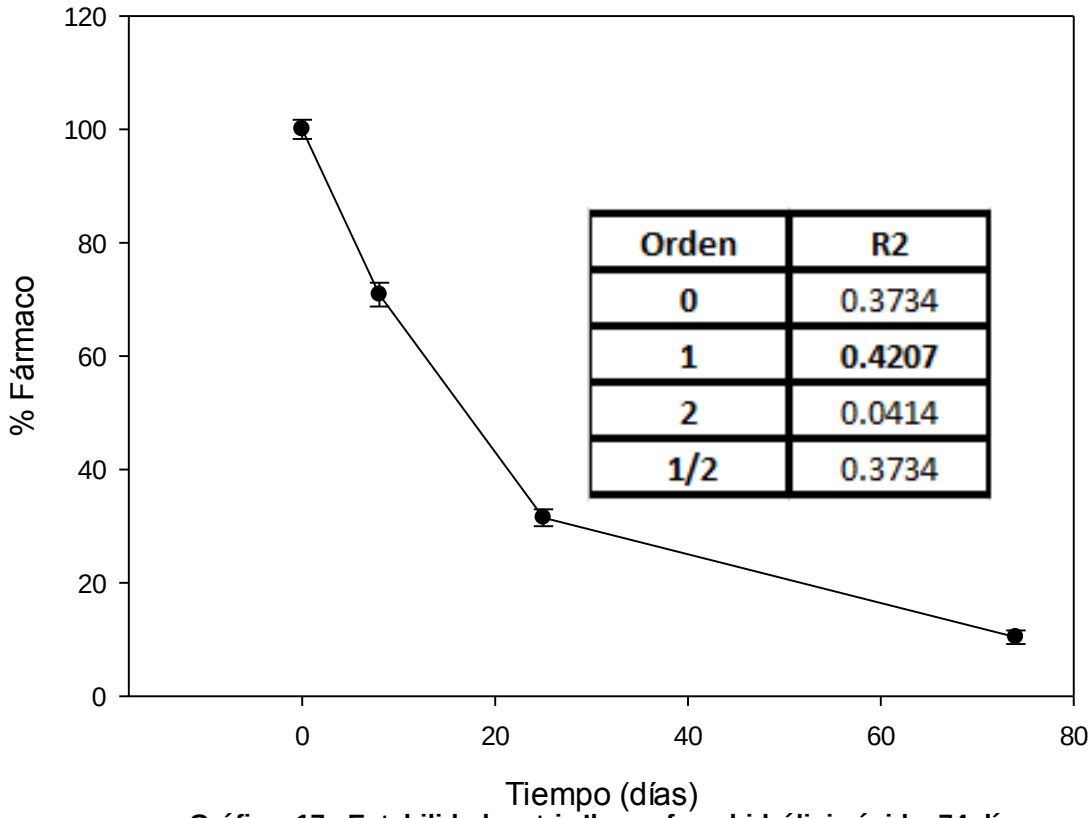
Gráfica 14. Estabilidad Ibuprofeno estufa 60°C 78 días.



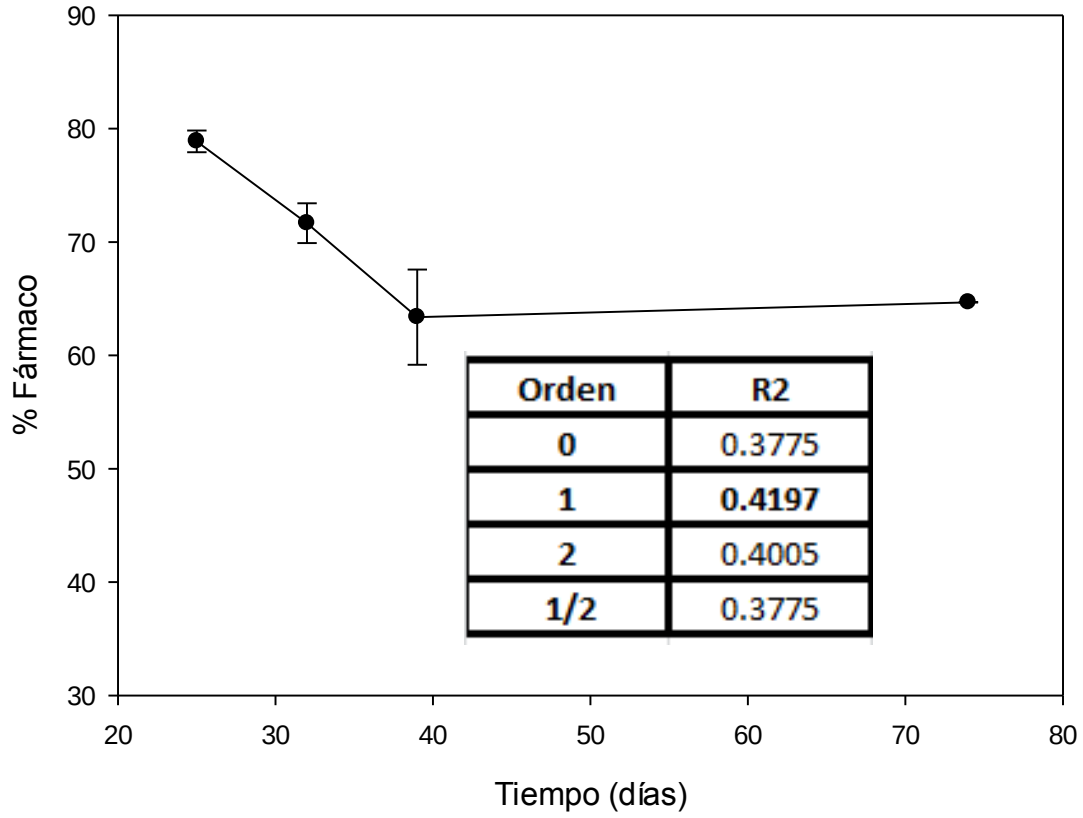
Gráfica 15. Estabilidad matriz Ibuprofeno estufa 60°C 10 días.



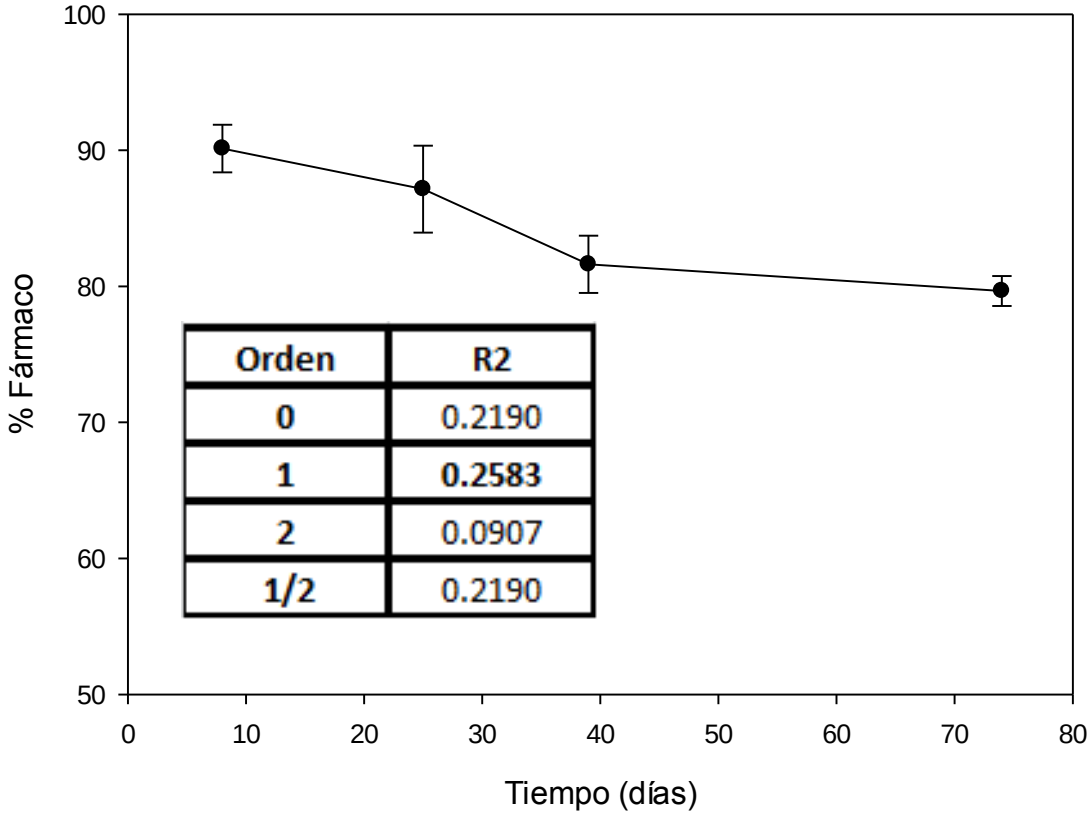
Gráfica 17. Estabilidad Ibuprofeno estufa 80°C 78 días.



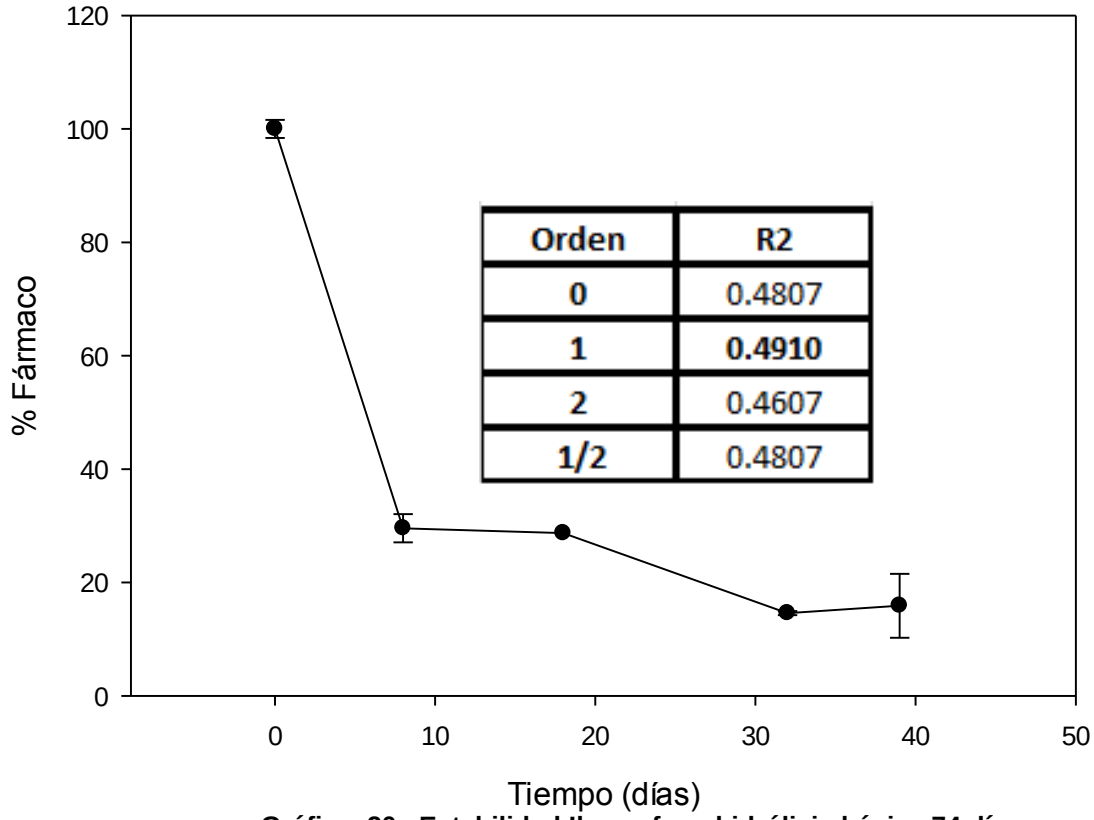
Gráfica 17. Estabilidad matriz Ibuprofeno hidrólisis ácida 74 días.



Gráfica 18. Estabilidad Ibuprofeno hidrólisis ácida 74 días.



Gráfica 19. Estabilidad matriz Ibuprofeno hidrólisis básica 39 días.



Gráfica 20. Estabilidad Ibuprofeno hidrólisis básica 74 días.

9. Conclusiones.

La matriz sol-gel fabricada en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica mejora la estabilidad de los fármacos que son encapsulados comparados con los fármacos que no lo están. Bajo las condiciones y tiempos descritos anteriormente, ya que se observaron productos de degradación en los fármacos no encapsulados y no se encontraron o se encontraron en menor proporción en los fármacos encapsulados en las matrices sol-gel.

10. Referencias.

1. Martínez Díaz A., Sánchez Flores A. Desarrollo de una estrategia experimental para la preparación del sistema polimérico Al_2O_3-SiO_2-TiO_2 obtenido a partir del proceso sol-gel. México: UNAM FES Zaragoza; 2001.
2. Jeffrey Brinker C., W. Scherer G. Sol-gel science: The physics and chemistry of sol-gel processing, Academic Press Inc. United States of America: San Diego. 1990.
3. L. Hench L., K. West J. The sol-gel process. Chem Rev. 1990, 90, 33-72.
4. Vásquez López A. Síntesis de óxido de titanio, por el método de sol-gel para degradación de azul de metileno. México: UNAM FES Cuautitlán: 2007.
5. K. Joseph Lyjo Optical and thermal characterization of dye intercalated montmorillonites and rare earth doped materials. (doctoral thesis) India: Cochin University 2009.
6. Ramírez Palma M., Huirache Acuña R., Espinosa Acosta G, Hernández Padrón G Estado del arte del proceso sol-gel en México. Espacio del divulgador. México 2010.
7. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Stability testing of new drug substances and products Q1A (R2). USA. 2003
8. Yoshioka S, J. Estella V. Stability of drugs and dosage forms New York: Kluwer Academic Publishers; 2002.
9. Huynh-Ba K, editor. Handbook of sability testing in pharmaceutical development New York: Springer; 2008.
10. R. Matkovi S, M. Valle G, E. Briand L. Quantitative analysis of ibuprofen in pharmaceutical formulations through FTIR spectroscopy. Latin American Applied Research. 2005; 35:189-195.
11. Hernández Abad V.J. Evaluación biofarmacéutica del ibuprofenato de ibuprofilo, un nuevo profármaco del Ibuprofeno. México: UNAM Facultad de Química; 1999
12. Motola Marlton S, G. Blank R, R. Branfman A, Hill C, inventors; Inhibition of thermal degradation of ibuprofen. United States patent 5,185,373. 1993 February 9.

13. Tita B, Fulias A, Tita D. Kinetic study of indomethacin under isothermal conditions. Rev. Chim. 2010; 61(11)
14. Moreno Cerezo J.M. Nuevos diseños galénicos de comprimidos de Indometacina y tetraciclina con agentes hidrotrópicos y de inclusión para mejorar la velocidad de disolución y su estabilidad. (tesis doctoral) España: Universidad Complutense de Madrid 2004.
15. Tsvetkova B, Pencheva I, Zlatkov A, Peikov P. High performance liquid chromatographic assay of indomethacin and its related substances in tablet dosage forms. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2012 March; 4(3).
16. T. Cartensen J, Rhodes C, editors. Drugs stability: pinciples and practices. third ed. North Carolina; 2000
17. A. Skoog D, James Holler F, A. Nieman T. Principios de análisis instrumental. quinta ed. Madrid: McGraw-Hill; 2001.
18. C. Harris D. Análisis químico cuantitativo. tercera ed. Barcelona: Reverté; 2007.
19. Salvador A.N. Preparación de matrices de liberación modificada de AINE's fabricadas por el método sol-gel. México: UNAM Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2013
20. Rodríguez Gaspar H.D. Determinación por CLAR de la valoración y uniformidad de contenido de Indometacina en matrices sol-gel. UNAM Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2013.
21. J. Barb C, Kong L, S. Finnie K, Calleja S, V. Hanna J, Drabarek E, et al. Sol-gel matrices for controlled release: from macro to nano using emulsion polymerisation. J. Sol-Gel Sci Technol. 2008 February; 10(10971-008-1721-4).
22. Avnir D, Coradin T, Ley O, Livage J. Recent bio-applications of sol-gel materials. Journal of materials Chemistry. 2005 October; 10.1039(b512706h).
23. Coradin T, Boissiére M, Livage J. Sol-gel Chemistry in Medicinal Science. Current Medicinal Chemistry. 2006; 13(000-000).
24. Dave BC, Miller JM, Dunn B, Vakentine JS, Zink JI. Encapsulation of proteins in Bulk and Thin Film Sol-Gel Matrices. Journal of Sol-Gel Science and Technology. 1997; 8(629-634).

25. López ea. Treatment of Parkinson's disease: nanostructured sol–gel silica–dopamine reservoirs for controlled drug release in the central nervous system. International Journal of Nanomedicine. 2010 December; 1(6).
26. Clarke EGC. Clarke's Isolation and Identification of Drugs. 2nd ed. London: The Pharmaceutical Press; 1986.
27. Gi Yi H, Hyuk Chi M, Kim Yl, Soo Woo J, Park ES. Formulation of an extended release tablet containing dexibuprofen. Archives of Pharmacal Research. 2008 December 2008; 31(12).
28. Rimple B. Bhatia, Brinker C. Jeffrey. Aqueous Sol-Gel Process for Protein Encapsulation Chem. Mater. 2000, 12, 2434-2441.
29. Ursoiu A, Paul C., Kurtán T., Péter F. Sol-gel Entrapped Candida antarctica lipase B — A Biocatalyst with Excellent Stability for Kinetic Resolution of Secondary Alcohols Molecules 2012, 17, 13045-13061.
30. Klotz M., Ayral A., Guizard C., and Cot L. Tailoring of the Porosity in Sol-Gel Derived Silica Thin Layers Korean Chem. Soc. 1999, Vol. 20, No. 8 879-884.
31. Bauer J, Ulatowska-Jarża A. *et al*. Influence of heating temperature on structural properties of sol-gel materials Optical Applicata, Vol. XXXV, No. 4, 2005.
32. Radin S., Chen T., Ducheyne P. The controlled release of drugs from emulsified, sol gel processed silica microspheres Biomaterials 2008.
33. Ahola M., Fagerholm H. et al. Óxidos solubles para aplicaciones biológicas. España patente No. 2244998 Diciembre 2005.
34. Gonzáles J., Pérez J., Ruiz F., .Martínez J, "Vidrios SiO_2 nanocompuestos preparados por sol-gel: revisión," Superficies y Vacío,vol.11,pp.1–16,2000.
35. López T. M. et al Obtaining of Sol-Gel Ketorolac-Silica Nanoparticles: Characterization and Drug Release Kinetics Journal of Nanomaterials Volume 2013, Article ID 450483, 9 pages.
36. McMurry J. Química Orgánica Octava ed. Editorial Cenegage Learning 2012.
37. Moolman, F.S., P.W. Labuschagne, M.S. Thantsa, T.L. Van Der Merwe, H. Rolfesc and T.E. Cloete, 2006. Encapsulating probiotics with an interpolymer complex in supercritical carbon dioxide. South African J. Sci., Vol. 102(7/8), pp: 349-354.

38. R. Kennedy, N. Sherwood and A. Slavin. Structure reports 5-Methoxy-2,3-dimethylindole. Acta Crystallographica Section E organic papers 2002.
39. Backensfeld T., W. Müller , Wiese M., K. Seydel. Effect of Cyclodextrin Derivatives on Indomethacin Stability in Aqueous Solution Pharmaceutical Research May 1990, Volume 7, Issue 5, pp 484-490.
40. Ramírez D. Estudios de interacción fármaco-excipiente de antiinflamatorios no esteroideos formulados en matrices sol-gel por calorimetría diferencial de barrido.
41. Sieminska L., Ferguson M., Diffusion of Steroids in Porous Sol-Gel Glass: Application in Slow Drug Delivery Journal of Sol-Gel Science and Technology 8, 1105-1109 (1997).