



UNIVERSIDAD DE CHILE

**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica
Laboratorio de Bioelectroquímica**

**“ESTUDIO ELECTROQUÍMICO Y CROMATOGRÁFICO
DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN
ESTRONA/CICLODEXTRINA”**

Profesor Patrocinante

Prof. Juan Arturo Squella Serrano

Director de Memoria

Dra. Claudia Andrea Yáñez Soto

Memoria para optar al Título Profesional de Químico

JULIO MANUEL BASUALDO LEGÜE

Santiago, Chile

2006

RESUMEN

La presente tesis contempla el estudio electroquímico y cromatográfico de la interacción de estrona con β -ciclodextrina (β -CD) y sulfobutileter- β -ciclodextrina (SBE- β -CD) en solución. El estudio se efectuó en un medio mixto haciendo uso de técnicas electroquímicas como voltametría de pulso diferencial (VPD) y voltametría cíclica y técnicas cromatográficas como cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

La estrona presentó una respuesta anódica correspondiente a su oxidación electroquímica en medio mixto (EtOH:Buffer fosfato 0,1M / 25:75) con la transferencia de 2 electrones. La intensidad de corriente disminuyó a medida que aumentó la concentración de las ciclodextrinas (CDs) lo que evidenció la formación de un complejo de inclusión. La variación de la corriente asociada a la concentración de las CDs permitió obtener las constantes de formación del complejo de inclusión y obtener los parámetros termodinámicos que dan cuenta de las interacciones entre estrona y las dos ciclodextrinas utilizadas en este estudio.

La formación del complejo de inclusión también se evidenció en los resultados obtenidos mediante HPLC, los que mostraron una disminución del tiempo de retención de la estrona a medida que aumentó la concentración de β -CD en la fase móvil. Esto es debido a la formación de un complejo de inclusión entre la ciclodextrina y el analito que está siendo cromatografiado. Las variaciones observadas en el tiempo de retención fueron utilizadas para calcular la constante de formación del complejo de inclusión y obtener parámetros termodinámicos de formación.

La estrona mostró una menor afinidad por la β -CD, lo que se refleja en los valores inferiores de constante de formación en comparación con la SBE- β -CD. Para el complejo de inclusión de estrona con β -CD, los parámetros indicaron que la contribución principal a la formación del complejo se debe a las interacciones de tipo van der Waals. En el caso de estrona con SBE- β -CD, es probable que exista una mayor contribución de interacciones de tipo hidrofóbicas. Sin embargo, el análisis es más complejo debido a que no se observa un efecto claro de la temperatura en la constante de formación de este complejo de inclusión.

Electrochemical and chromatographic study of inclusion complexes estrone/cyclodextrin

SUMMARY

In the present thesis, the electrochemical and chromatographic behaviour of estrone-cyclodextrin inclusion complexes was studied. β -cyclodextrin and sulfobutylether- β -cyclodextrin were used. The electrochemical study was carried out in mixed media using differential pulse voltammetry (DPV) and cyclic voltammetry (CV). In addition, high performance liquid chromatography (HPLC) was used.

The electrochemical oxidation of estrone on glassy carbon electrode in mixed media (EtOH:Phosphate buffer 0.1M / 25:75) was observed. The addition of β -CD to the aqueous solution causes changes in the voltammograms. With the increase of the amount of β -CD, the anodic peak current (I_{pa}) decreased. These results were ascribed to the formation of the inclusion complexes. The decrease of peak currents with the increase of concentrations of β -CD was used to apply the current titration procedure in order to calculate the formation constants. Also, the effect of the temperature on the inclusion complexes was studied and thermodynamic parameters were obtained

The results obtained using HPLC are an evidence of an inclusion complex between estrone and cyclodextrin. Using phase mobile containing CD, a decrease of retention time in according to cyclodextrin concentration increase was observed. The formation of inclusion complex increased the solubility in mobile phase, this way, a decrease in residence time in column was observed.

These changes were useful to obtain formation constant and thermodynamics parameters.

Estrone showed an affinity to β -cyclodextrin smaller than sulfobutylether- β -cyclodextrin, because of smaller values of formation constants were obtained. Thermodynamics parameters indicated that van der Waals forces are the main contribution to formation of inclusion complexes between estrone and β -CD. Apparently, hydrophobic interaction is the main contribution in estrone/SBE- β -CD complexes. However, it was concluded that enthalpy and entropy changes were not a good criteria because there is no clear effect of the temperature on the system.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo General	8
2.2 Objetivos Específicos	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1 Materiales	9
3.1.1 Reactivos y Solventes	9
3.1.2 Equipos	10
3.1.2.1 Equipos de uso general	10
3.1.2.2 Sistema Cromatográfico	10
3.1.2.3 Sistema Electroquímico	10
3.1.3 Tampón	11
3.1.4 Material de Vidrio	11
3.2 Métodos	11
3.2.1 Preparación de Soluciones	11
3.2.2 Voltametría de Pulso Diferencial	12
3.2.3 Voltametría Cíclica	14
3.2.4 Cromatografía HPLC	16

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	18
4.1 Comportamiento Electroquímico de Estrona en medio EtOH:Buffer Fosfato	18
4.1.1 Efecto de pH	20
4.1.2 Efecto del porcentaje de etanol en el medio	22
4.1.3 Efecto de la velocidad de barrido	24
4.2 Comportamiento Electroquímico de Complejos de Inclusión β -CD y SBE- β -CD con Estrona	26
4.2.1 Efecto de la concentración de β -CD y SBE- β -CD	26
4.2.2 Efecto de la temperatura	31
4.3 Comportamiento Cromatográfico de Estrona en fase móvil Acetonitrilo:Agua	37
4.3.1 Efecto de la concentración de β -CD	37
4.3.2 Efecto de la temperatura sobre el factor de capacidad del complejo de inclusión estrona/ β -CD	38
5. CONCLUSIONES	42
6. REFERENCIAS	43

1. INTRODUCCIÓN

Las ciclodextrinas (CDs, figura 1.1 A) son un grupo de oligosacáridos cíclicos obtenidos a partir de la degradación enzimática del almidón [1]. El almidón es tratado con un tipo de amilasa, llamado ciclo transglucosilasa, obtenido de la bacteria *Bacillus Macerans* [2], éste es hidrolizado y los grupos finales del fragmento obtenido son enlazados para dar origen a una molécula cíclica.

Las ciclodextrinas están constituidas por unidades de α -D-glucopiranosas unidas entre sí por enlaces α -(1 \rightarrow 4), como se muestra en la figura 1.1 B:

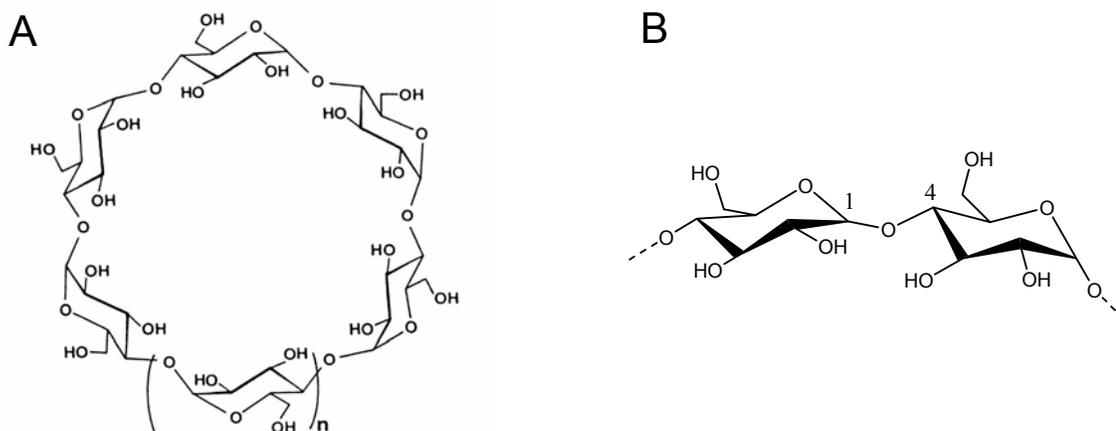


Figura 1.1 (A) Estructura química de CD (n= 6, 7 ó 8, para α -CD, β -CD y γ -CD, respectivamente). (B) Representación del enlace α -(1 \rightarrow 4) de la CD.

Debido a la inespecificidad de las enzimas en relación al sitio de hidrólisis, se han obtenido ciclos que contienen de 6 a 12 unidades de glucosa, siendo las más importantes: α -CD, β -CD y γ -CD, que contienen 6, 7 y 8

unidades, respectivamente. Las tres CDs difieren no solamente en su diámetro, relacionado directamente con el número de unidades de glucosa, sino también en su solubilidad en agua y peso molecular [3]. Sin duda, la más estudiada es la β -CD, porque presenta el tamaño y forma apropiada para interactuar eficientemente con numerosos fármacos.

La geometría de las CDs es parecida a un cono truncado con un lado más ancho formado por los grupos hidroxilos secundarios de los C-2 y C-3 de las unidades de glucosa y un lado más estrecho debido al hidroxilo primario del C-6, como se aprecia en la figura 1.2 A:

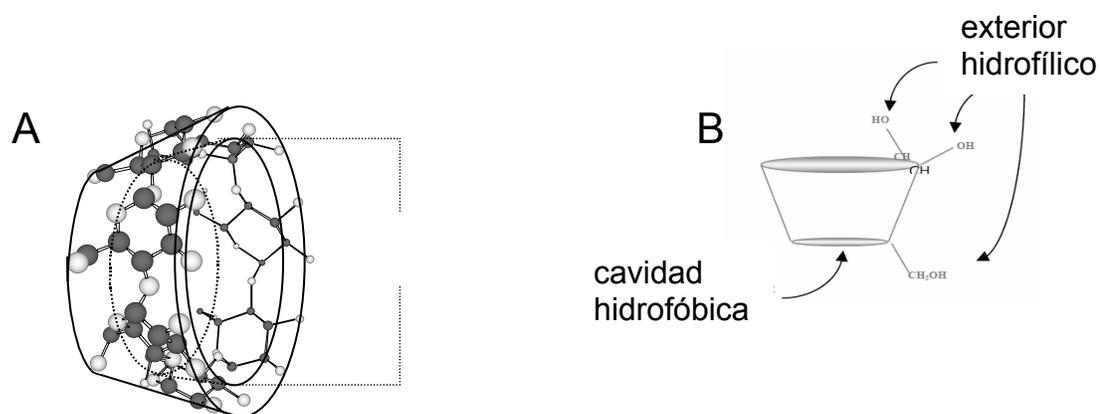


Figura 1.2: (A) Forma toroidal (cono truncado) de la molécula de β -CD y (B) Representación esquemática de la orientación de los grupos hidroxilos de una CD.

La cavidad está formada por los átomos de hidrógeno metilénicos y oxígenos glicosídicos. Los pares de electrones no enlazantes del oxígeno glicosídico están orientados al interior de la cavidad lo que otorga una alta densidad electrónica y le confieren algún carácter de base de Lewis, haciendo que la cavidad sea relativamente hidrofóbica respecto del agua comparada con su cara externa más hidrofílica, debido a los hidroxilos en las posiciones 2, 3 y 6 [4].

Una de las características más importantes de las CDs es su capacidad para formar complejos de inclusión con una gran variedad de moléculas ya sea orgánicas e inorgánicas llamadas moléculas “huésped” (se define molécula huésped a la molécula que ingresa en la cavidad de la CD). La formación del complejo de inclusión es un proceso de equilibrio dinámico y la estabilidad de este complejo puede ser descrito en términos de una constante de formación (K_f) o una constante de disociación (K_d), como se muestra en la figura 1.3. Es importante destacar que no hay enlaces covalentes en la formación del complejo de inclusión.

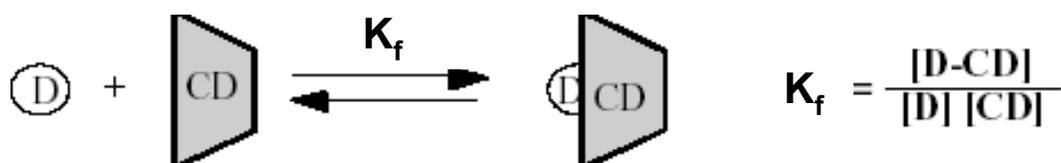


Figura 1.3: Representación esquemática de la formación y disociación del complejo de inclusión estrona/ β -CD y expresión general de la constante de formación (K_f).

La determinación de la constante de formación (K_f) del complejo de inclusión es importante ya que da cuenta de cambios en las propiedades fisicoquímicas de la molécula al ser incluida. La mayoría de los métodos para obtener los valores de constante de formación están relacionados con el estudio de cambios en las propiedades fisicoquímicas de las moléculas huésped, y luego estimar las dependencias con la concentración. Varias técnicas han sido aplicadas con el fin de determinar la constante de formación de un amplio número de complejos de inclusión: absorción UV-visible [5], H-NMR [6], fluorescencia [7], dicroísmo circular [8], HPLC [9,10] y métodos electroquímicos [11,12].

Las técnicas electroquímicas ofrecen una nueva alternativa, mostrando ser lo suficientemente sensibles para bajas concentraciones de diversas especies electroactivas, combinando rapidez de medición y selectividad. Aplicando estas técnicas se puede determinar la constante de formación del complejo de inclusión CD-esteroide y los parámetros termodinámicos que permitan entender las interacciones involucradas en la formación del complejo [9].

En los estudios de complejo de inclusión mediante HPLC, las CDs pueden ser usadas de dos maneras diferentes: incorporando CD en la fase móvil o bien, enlazando CD de manera covalente a la fase estacionaria. La complejación de una molécula dada con la CD produce cambios considerables en las propiedades de dicha molécula. Por otra parte en las últimas décadas, las CDs y algunos de sus derivados han tenido una creciente aceptación y aplicación en muchos campos de la cromatografía. Se han desarrollado algunas columnas con CD unidas para separar, por ejemplo, esteroides que no pueden ser bien resueltos en columnas más tradicionales [13].

Desde el punto de vista fisicoquímico, se han llevado a cabo distintos estudios de manera de dilucidar las fuerzas de enlace en la interacción CD-fármaco, considerándose que interacciones hidrofóbicas, dipolo-dipolo, fuerzas de Van der Waals [14,15] y formación de puentes de hidrógeno influyen en la intensidad de la interacción CD-fármaco [16,17].

Desde el punto de vista de la toxicidad, se han realizado varios estudios y se ha demostrado que prácticamente no presentan toxicidad cuando se administran oralmente debido a la falta de adsorción en el tracto gastrointestinal. β -CD es de tamaño y forma apropiada para interactuar

eficientemente con numerosos fármacos, pero, debido a su relativamente baja solubilidad en solución acuosa comparada con sus derivados, hidroxipropil- β CD o sulfoalquileter- β CD, presenta cierta toxicidad renal cuando se administra vía parenteral (sanguínea) [18]. Como consecuencia, varias nuevas formulaciones utilizando sulfoalquileter β CD han sido propuestas [19,20,21]. Sin embargo, la afinidad hacia ciertos sustratos, es decir, el valor de la constante de formación depende de la longitud de la cadena alquílica y del grado de sustitución [22].

Los sulfoalquileter- β -CD derivados son el resultado de la modificación química en las posiciones de los hidroxilos 2, 3 y 6, donde la sustitución por cadenas de diversa longitud le proporcionan nuevas características a las CDs, por ejemplo, exhiben una alta solubilidad en agua como resultado de la ionización de la porción sulfonato, mostrando una toxicidad decreciente cuando son administrados por vía parenteral [23]. Uno de estos derivados es la sulfobutyleter- β -CD (SBE- β -CD), figura 1.4:

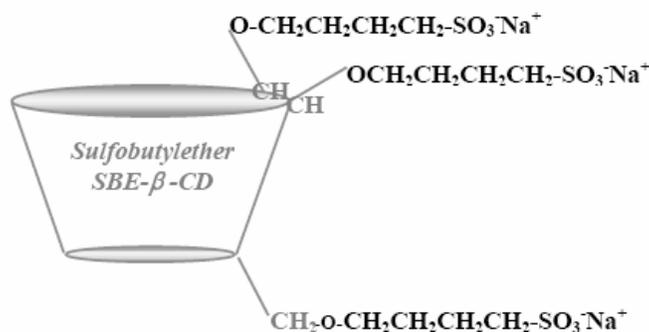


Figura 1.4: Representación esquemática de la sulfobutyleter- β -CD.

En el proceso de obtención de la SBE- β -CD la sustitución esta bien controlada, logrando una distribución característica y reproducible, que se traduce en una mezcla homogénea que presenta entre 1 y 10 sustituyentes, lo que representa una sustitución promedio de siete posiciones.

La capacidad de las CDs de formar complejos de inclusión sin la formación de enlaces covalentes ha sido aprovechada en el ámbito de la industria farmacéutica. Debido a sus características de bioadaptabilidad y multifuncionalidad, las CDs pueden ser usadas en varias rutas de administración a través de la formación de complejos de inclusión. Así, por ejemplo, las CDs y sus derivados permiten una efectiva administración oral de esteroides [24] y aumentan su biodisponibilidad oral [25]. Además, reducen los efectos laterales [26] y aumentan su liberación desde ungüentos [27].

Debido a que los esteroides juegan un rol fisiológico relevante y tienen varias aplicaciones terapéuticas [28,29], la interacción entre CDs y esteroides ha despertado gran interés. El uso terapéutico de los esteroides se encuentra en extremo difundido y sus efectos farmacológicos reflejan en gran parte las extensiones de sus acciones fisiológicas. Dentro del grupo de compuestos conocidos como esteroides están los estrógenos. Los estrógenos (estradiol, estrona y estriol), además de regular los ciclos reproductivos, desempeñan muchas otras funciones en diversos órganos y sistemas. Es así como determinan la maduración y formación esquelética durante los años de desarrollo sexual de la mujer, pues estimulan, junto con otras hormonas, la formación y la mineralización óseas. También inhiben el proceso de resorción del hueso, mediante su interacción con múltiples factores hormonales y no hormonales, lo que garantiza la integridad de la masa esquelética. La falta de la acción estrogénica, además de conducir a la aparición de síntomas clínicos característicos, se traduce en pérdida de masa ósea, incremento en la

mortalidad por todas las causas, aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares, mayor número de consultas médicas, incremento de las afecciones neuropsicológicas (por ejemplo: depresión, ansiedad, problemas de concentración, pérdida de la memoria de fijación, disminución de la capacidad de aprendizaje y cambios bruscos del estado de ánimo), así como aumento en la incidencia de síntomas urogenitales e infecciones del tracto urinario. La suplencia hormonal con estrógenos permite controlar efectivamente los síntomas menopáusicos.

De esta manera, en este trabajo de tesis se estudiará la interacción en solución entre estrona, uno de los estrógenos más importantes (figura 1.5) y dos tipos de ciclodextrina: β -CD natural y un derivado, SBE- β -CD, haciendo uso de técnicas electroquímicas y cromatográficas con el fin de describir el comportamiento fisicoquímico de dicha interacción.

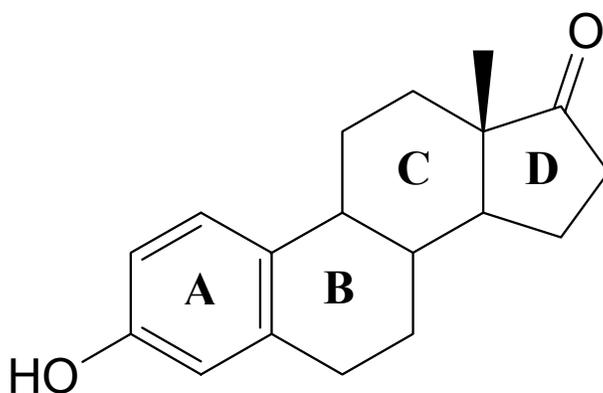


Figura 1.5: Estructura química de estrona. Se han indicado los anillos A, B, C y D del ciclo pentano perhidrofenantreno.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

El objetivo de esta tesis es clarificar el tipo de interacciones involucradas entre las CDs y la estrona, mediante la obtención de la constante de formación del complejo de inclusión, tomando en cuenta los parámetros termodinámicos que permitan interpretar la afinidad existente entre ambas moléculas.

2.2 Objetivos Específicos.

Para llevar a cabo el objetivo general hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la interacción entre las CDs (β -CD y SBE- β -CD) y estrona mediante técnicas electroquímicas. Se determinará condiciones y efectos de pH, velocidad de barrido y respuesta de la intensidad de corriente en función de diferentes concentraciones de CDs, con el fin de obtener las constantes de formación para el complejo de inclusión.
- Determinar los valores de constantes de formación a distintas temperaturas para el complejo de inclusión, y con ello se determinarán los parámetros termodinámicos.
- Determinar las constantes de formación haciendo uso de la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), como una manera de comparar los resultados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos y Solventes.

- β -Ciclodextrina 99.9%, CALBIOCHEM.
- Sulfobutileter- β -Ciclodextrina.
- Estrona 98%, SIGMA.
- Acetonitrilo (ACN) grado HPLC, MERCK.
- Etanol (EtOH) (99,8%) p.a, MERCK.
- Fosfato de sodio monobásico, J.T BAKER.
- Metanol grado HPLC, MERCK.
- Agua pureza Milli-Q (18,2M Ω cm).
- Ácido fosfórico (85%).
- Nitrógeno extra puro (99,9%) AGA Chile S.A.
- Helio.
- Alúminas de 0,3 y 0,05 μ m.

3.1.2 Equipos

3.1.2.1 Equipos de uso general

- Balanza de precisión, Precisa 40 SM-200, sensibilidad 0,01 mg.
- Agitador magnético, Heidolph modelo MR 3002.
- Medidor de pH WTW modelo pMx 3000.
- Sistema purificador de agua Milli-Q Ultra-Pure Water System.
- Sonicator Branson Branson 2210.

3.1.2.2 Sistema Cromatográfico

- Cromatógrafo HPLC Waters modelo 600, controlador de bomba Waters 600E, acoplado a un detector de arreglo de diodos Waters modelo 996 y a un detector electroquímico Waters modelo 464. La adquisición y tratamiento de datos se realizó mediante software Millenium 3.2. Se utilizó una columna cromatográfica Symmetry C-18 (3,9 mm x 150 mm; tamaño de partícula: 5 μm).
- Jeringa Hamilton 100 μL .

3.1.2.3. Sistema Electroquímico

- Analizador voltamétrico automatizado BAS 100W, conectado a un PC para la adquisición y tratamiento de datos mediante software BAS 100W versión 2.3.
- Baño termostático Haake.
- Celda electroquímica termostática.
- Electrodo de trabajo: carbón vítreo.
- Electrodo de referencia: Ag/AgCl.
- Electrodo auxiliar: alambre de platino.

3.1.3 Tampón

- Buffer fosfato 0,1M.

3.1.4 Material de vidrio

- Todo el material utilizado fue clase A.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparación de Soluciones.

- Solución Stock de Estrona.
 - Se preparó una solución stock de estrona de una concentración 1×10^{-2} M en EtOH, la que se mantuvo refrigerada.
- Solución tampón (buffer fosfato 0,1M).
 - En un matraz de 500 mL se agregó 7,098g de Na_2HPO_4 , para luego aforar con agua Milli-Q. El pH se ajustó adicionando lentamente alícuotas de ácido ortofosfórico.
- Solución de Trabajo EtOH:Buffer Fosfato 0,1M (25:75).
 - Se toma una alícuota de la solución stock de estrona, se lleva a un matraz de 100 mL y se agrega el volumen necesario de EtOH para completar el 25%. Finalmente, se afora con el buffer fosfato 0,1M hasta completar un volumen de 100 mL.

3.2.2 Voltametría de pulso diferencial.

Para el desarrollo de estos estudios se prepararon soluciones de trabajo de concentración $1,0 \times 10^{-4}$ M de estrona (10 mL), se introdujeron en una celda electroquímica termorregulada formada por un electrodo de carbón vítreo como electrodo de trabajo, un electrodo Ag/AgCl_(sat) como electrodo de referencia y alambre de platino como electrodo auxiliar. Para cada solución de trabajo, se burbujeó N₂ extra puro durante 5 minutos. El ajuste de pH se realizó mediante adiciones de pequeñas alícuotas de NaOH_{conc.} o HCl_{conc.} El electrodo de trabajo se limpió mediante pulido manual utilizando alúminas de 0,3 y 0,05 μm . El electrodo se limpiaba entre cada medida.

El estudio contempló variar el porcentaje de EtOH en la solución en presencia de estrona. Por otra parte, consideró observar el comportamiento a diferentes pHs entre 6 y 9, en ambos casos se puede apreciar el efecto de estos cambios sobre la señal de oxidación. Ambas experiencias permitieron elegir las condiciones más adecuadas para realizar el estudio del efecto de la concentración de las CDs (β -CD y SBE- β -CD) sobre la corriente de pico anódico (I_{pa}). Finalmente se procedió con el estudio del efecto de la temperatura sobre la formación del complejo de inclusión. La adición de ambas CDs a la solución implicaba la solubilización en ella, para lo cual se estandarizó el procedimiento agitando durante 10 minutos todas las soluciones de trabajo.

A partir de los valores de corriente en función de la concentración de las CDs es posible obtener las constantes de formación de los complejos de inclusión CD-estróna, mediante la siguiente relación [30,31]:

$$\frac{1}{[CD]} = K_f \frac{[1-A]}{1-I/I_0} - K_f \quad (\text{Ec. 3.1})$$

K_f = constante de formación.

I_0 = corriente de pico en ausencia de CD.

I = corriente de pico en presencia de CD.

A = factor de proporcionalidad.

Para obtener los parámetros termodinámicos (ΔH y ΔS), y relacionarlos con la constante de formación del complejo de inclusión, se utilizaron las siguientes relaciones:

$$\Delta G = -n RT \ln K_f \quad (\text{Ec. 3.2})$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Ec. 3.3})$$

R = constante universal de los gases.

T = temperatura en °K

ΔG = energía libre estándar

ΔH = cambio de entalpía

ΔS = cambio de entropía

n = número de mol

3.2.3 Voltametría cíclica.

Se trabajó con soluciones de estrona de una concentración $1,5 \times 10^{-4}$ M. Se estudió el comportamiento que presentó la corriente y el potencial en los picos voltamétricos con respecto a la velocidad de barrido. Cada solución de trabajo se burbujeó durante 5 minutos con N_2 extra puro. A partir del análisis de los valores de I_{pa} en función de la velocidad de barrido es posible distinguir si el proceso en cuestión es controlado por difusión y/o adsorción. Para procesos irreversibles las ecuaciones 4 y 5 dan cuenta de aquellos procesos controlados por difusión y adsorción, respectivamente.

$$I_p = 2.99 \cdot 10^5 \cdot n \cdot (\alpha \cdot n_a)^{1/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot C^0 \cdot v^{1/2} \quad (\text{Ec. 3.4})$$

$$I_p = 2.99 \cdot 10^5 \cdot n \cdot (\alpha \cdot n_a)^{1/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot C^0 \cdot v \quad (\text{Ec. 3.5})$$

I_p = Intensidad de corriente de pico

C = concentración de la especie electroactiva

A = área del electrodo

D = coeficiente de difusión

v = velocidad de barrido

n = número de electrones transferidos finales

n_a = número de electrones transferidos antes de la etapa determinante

Al buscar en ambas ecuaciones las relaciones logarítmicas y seguidamente aplicando el diferencial a las ecuaciones con respecto a la velocidad de barrido, es posible encontrar el valor de pendiente para el proceso en estudio. A modo de ejemplo para el proceso controlado por difusión estaría dado por:

$$\log I_p = \log k + \frac{1}{2} \log v \quad (\text{Ec. 3.4a})$$

$$\frac{\partial \log I_p}{\partial \log v} = 0,5 \quad (\text{Ec. 3.4b})$$

De este modo, un valor de pendiente 0,5 de la ecuación 3.4b, indica que el proceso es controlado por difusión.

Por otro parte al homologar el tratamiento para la ecuación 3.5, obtendremos una pendiente igual a 1, lo que indica que el proceso esta controlado por adsorción.

3.2.3 Cromatografía HPLC.

Fase móvil.

Se trabajó con soluciones de diferentes concentraciones de β -CD (2, 4, 6, 8 y 10 mM), que se prepararon en agua. Se utilizó una fase móvil de acetonitrilo:agua (con y sin β -CD) en una relación 35/65, con un flujo de 1mL/min. Se registraron los tiempos de retención de la estrona en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de β -CD. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

Entre los parámetros esenciales para determinar la afinidad CD/estrona está la constante de formación (K_f), la cual se determinó por HPLC a distintas temperaturas. El método para determinar la constante de formación viene dado por la ecuación 3.6 [13].

$$\frac{1}{k'} = \frac{K_f [\beta - CD]}{k_0} + \frac{1}{k_0} \quad (\text{Ec. 3.6})$$

k' = factor de capacidad

k_0 = factor de capacidad en ausencia de β -CD en la fase móvil

$[\beta\text{-CD}]$ = concentración de β -CD en la fase móvil

K_f = constante de formación del complejo de inclusión

Este procedimiento se repitió a diferentes temperaturas en un rango desde los 20° hasta 40°C, con intervalos de 5°C. Luego se calcularon las constantes de formación del complejo de inclusión a cada temperatura, las cuales se obtuvieron de la pendiente de la ecuación 3.6. Posteriormente éstas fueron utilizadas para el cálculo de parámetros termodinámicos utilizando las ecuaciones 3.2 y 3.3 mencionadas anteriormente.

El valor k' es el factor de capacidad que se obtiene de:

$$k' = (t_r - t_m)/t_m \quad (\text{Ec. 3.7})$$

Donde “ t_r ” es el tiempo de retención de la muestra en estudio (estróna) y “ t_m ” corresponde al tiempo muerto. Para conocer el tiempo muerto o volumen muerto de la columna, se inyectó metanol (MeOH) y se registró el tiempo al que aparece en el cromatograma. Este procedimiento se realizó para cada una de las concentraciones de β -CD a las distintas temperaturas de trabajo.

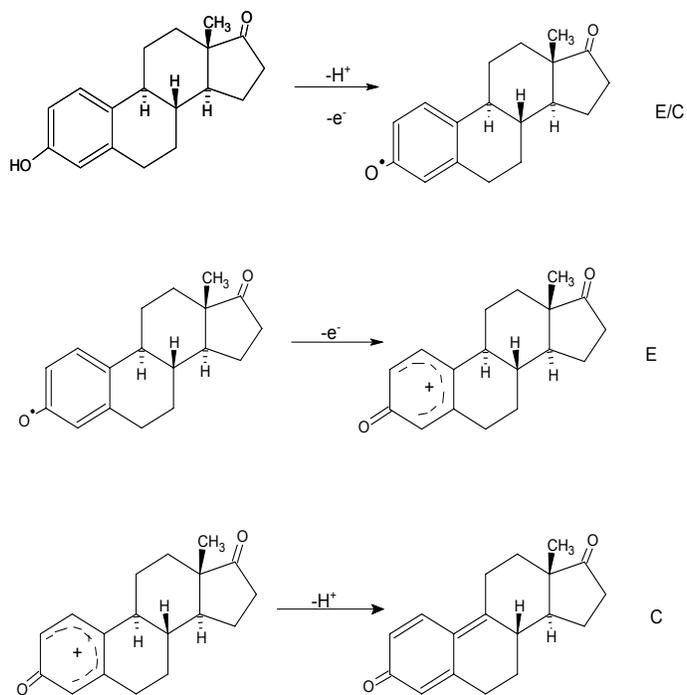
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Comportamiento electroquímico de estrona en medio Etanol/buffer fosfato.

El estudio de la oxidación electroquímica de estrona sobre electrodo de carbón vítreo fue realizado en medio EtOH:buffer fosfato 30:70 a distintos pHs y porcentajes de etanol, con el objeto de definir las condiciones adecuadas para realizar el estudio en presencia de β -ciclodextrina (β -CD) y sulfobutileter- β -ciclodextrina (SBE- β -CD). Posteriormente, el estudio en presencia de ciclodextrinas se realiza con un menor porcentaje de etanol, de manera de disminuir la competencia del co-solvente por las cavidades de las ciclodextrinas.

Los resultados muestran una única señal de oxidación de estrona sobre carbón vítreo, cuyo potencial depende del pH del medio.

El mecanismo de la oxidación electroquímica de estrona vía dos electrones ha sido propuesto por Ngundi y col [32], que plantean que la primera etapa consiste en la formación de un radical fenoxi, el que posteriormente se oxida al ion fenoxonium. Después de la oxidación al ion fenoxonium, sigue una etapa química para formar una quinona, lo que se resume en un mecanismo de reacción EC-EC, como se observa en el esquema 4.1.



Esquema 4.1: Mecanismo de reacción propuesto para la oxidación electroquímica de la estrona.

4.1.1 Efecto de pH.

Mediante voltametría de pulso diferencial se realizó el estudio de la oxidación de estrona a diferentes pHs. En la figura 4.1 se observan los voltamogramas de pulso diferencial obtenidos para estrona $1,0 \times 10^{-4}$ M en EtOH:buffer fosfato 0,1M (30:70) a temperatura ambiente. Se obtiene una única señal de oxidación que se desplaza a potenciales menores a medida que aumenta el pH, mostrando que el aumento de pH facilita la oxidación de la estrona, lo que concuerda con el mecanismo planteado previamente. Se observa el desplazamiento de los potenciales de pico anódicos (E_{pa}), desde los 612 a los 460 mV entre pH 6 y 9, respectivamente. No se observa la aparición de nuevas señales.

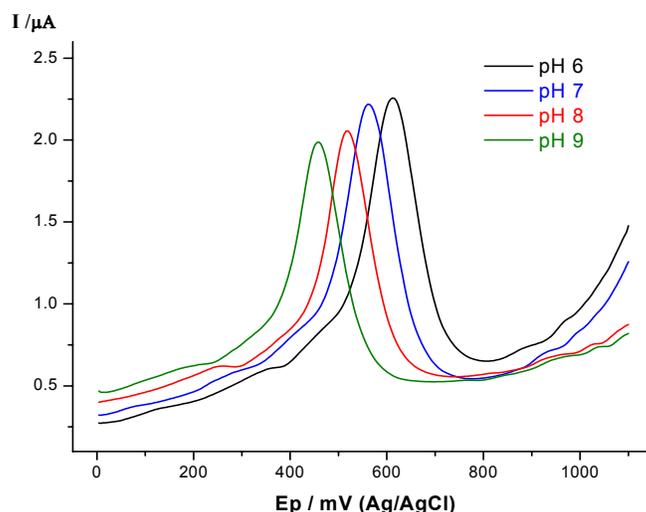


Figura 4.1: Voltamogramas de pulso diferencial de estrona $1,0 \times 10^{-4}$ M en EtOH:buffer fosfato 0,1M (30:70), temperatura 20°C a diferentes pHs.

A pH 8 se observa una señal bien definida y una adecuada separación de la corriente de oxidación y la descarga de solvente comparado con pHs menores, por lo que todo el estudio se realizó a este pH.

La figura 4.2 muestra el desplazamiento de los E_{pa} a diferentes pHs, dicha variación está reflejada en el valor de la pendiente que es de 50 mV por unidad de pH, es decir la variación del potencial de pico al aumentar en una unidad de pH es aproximadamente 50mV. Para valores de pH menores que 6 y mayores que 9, no es adecuado en este caso realizar mediciones, ya que, el buffer deja de actuar como tal fuera de estos valores de pH.

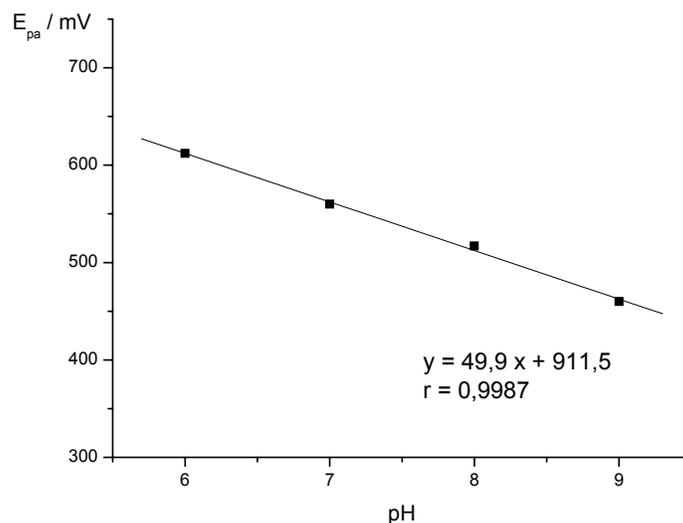


Figura 4.2: Potenciales de pico anódico de estrona 1×10^{-4} M en EtOH:buffer fosfato 0,1M (30:70), a diferentes pHs.

4.1.2 Efecto del porcentaje de Etanol presente en el medio acuoso.

La solubilidad de la estrona en agua es baja, a 25°C es aproximadamente 0,03g/L y en alcohol a 15°C es 4,00g/L, por lo que la adición de alcohol al sistema facilita el estudio a mayores concentraciones. Existen antecedentes de que moléculas orgánicas pueden competir por la cavidad que ofrece la β -CD, sin embargo, se ha informado que metanol y etanol muestran una baja afinidad por la cavidad, por lo que son buenos solventes. Sin embargo, es conveniente trabajar con bajos porcentajes de co-solvente de manera de minimizar el efecto de competencia por la cavidad.

El comportamiento de estrona en presencia de distintos porcentajes de etanol (EtOH) en el medio es observado en la figura 4.3. Se aprecia que a bajos porcentajes de EtOH en la mezcla, la intensidad de la señal de oxidación disminuye, esto se explica porque al disminuir el porcentaje de EtOH no hay una adecuada solubilidad de estrona. La constitución del medio mixto se hace necesaria para poder estudiar a la estrona en solución. Se observa además, que el potencial de pico anódico (E_{pa}) permanece prácticamente constante frente a las soluciones de EtOH:buffer fosfato 0,1M.

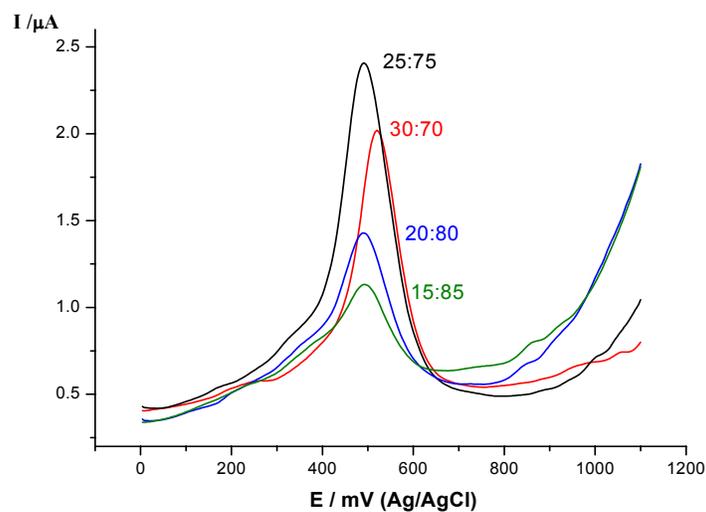


Figura 4.3: Voltamogramas de pulso diferencial de estrona $1,0 \times 10^{-4}$ M a pH 8 para diferentes razones de EtOH:buffer fosfato 0,1M a 20°C.

La mezcla elegida para realizar los estudios en presencia de ciclodextrinas es 25:75 EtOH:buffer fosfato 0,1M a pH 8. La elección de esta mezcla se basa en el hecho que se observa una señal bien definida de alta intensidad de corriente.

4.1.3 Efecto de la velocidad de barrido.

Mediante voltametría cíclica, se analizó una solución de estrona $1,5 \times 10^{-4}$ M, en medio mixto EtOH:buffer fosfato 0,1M (25:75) a pH 8. La figura 4.4 muestra los voltamogramas cíclicos a diferentes velocidades de barrido entre 100 y 5000 mV/s, donde es posible apreciar el aumento de la corriente de pico anódica (I_{pa}). Se aprecia un solo pico irreversible a todas las velocidades de barrido estudiadas. Este pico se desplaza hacia potenciales más positivos con el aumento de la velocidad de barrido, lo que se aprecia en la figura 4.5

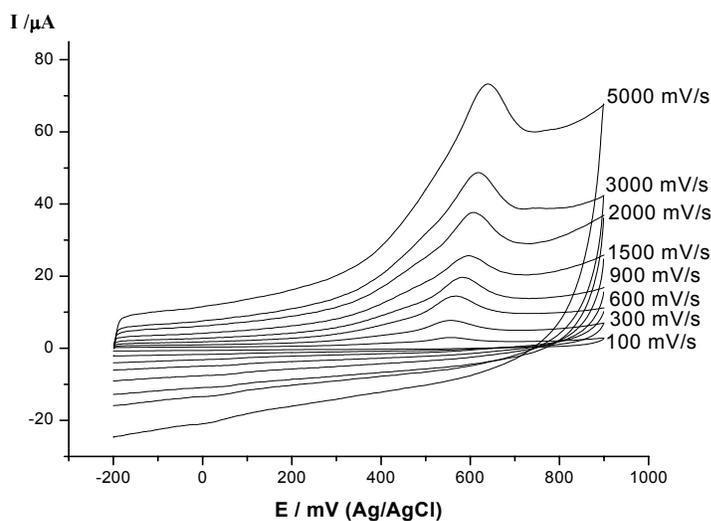


Figura 4.4: Voltamogramas cíclicos para estrona en EtOH:buffer fosfato 0,1M (25:75), pH 8 a diferentes velocidades de barrido.

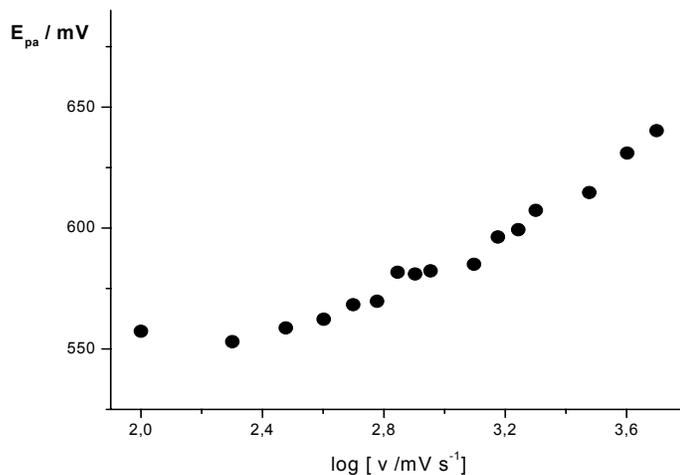


Figura 4.5: Dependencia del potencial de pico con la velocidad de barrido para estrona a 20°C, en EtOH:buffer fosfato 0,1M (25:75).

En la figura 4.6 se observa la relación logarítmica entre la corriente de pico (I_{pa}) y la velocidad de barrido (v). Una relación lineal con pendiente igual a 0,8 indica que existe un control mixto, es decir, un proceso con control mixto: difusión y adsorción.

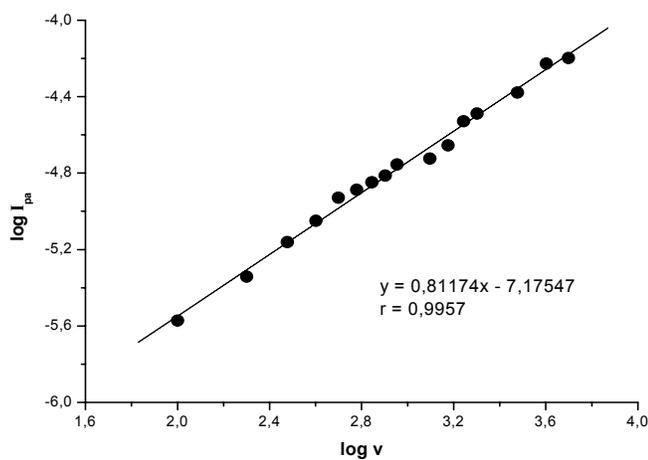


Figura 4.6: Dependencia de la corriente de pico con la velocidad de barrido, para estrona a 20°C, en medio EtOH:buffer fosfato 0,1M (25:75).

4.2 Comportamiento electroquímico de complejos de inclusión estrona/ β -CD y estrona/SBE- β -CD.

4.2.1 Efecto de la concentración de β -CD y SBE- β -CD.

Las mediciones fueron realizadas mediante voltametría de pulso diferencial para una solución de estrona $1,0 \times 10^{-4}$ M en EtOH:buffer fosfato 0,1M (25:75) a pH 8,0 en ausencia y en presencia de β -CD y SBE- β -CD a 20°C. La adición de β -CD y SBE- β -CD en la solución acuosa no produce cambios en la forma de los voltamogramas, pero provoca una disminución de la corriente de oxidación (figura 4.7). La disminución de I_{pa} a medida que aumenta la concentración de CDs, evidencia la existencia de la formación del complejo de inclusión.

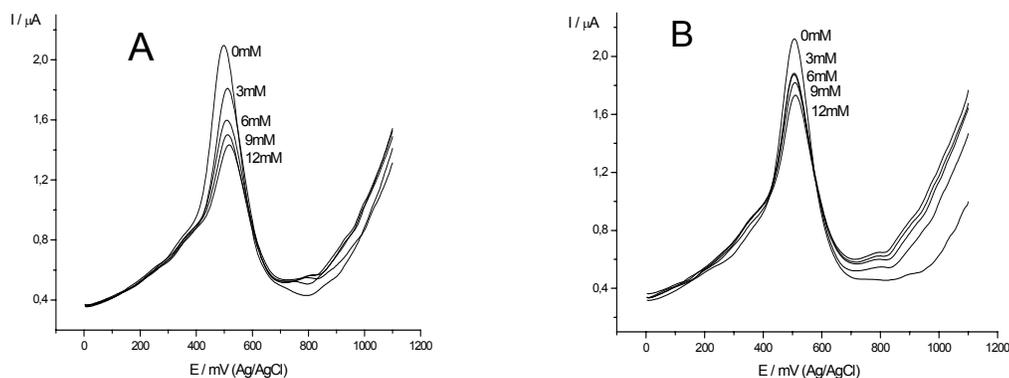


Figura 4.7 : Voltamogramas de pulso diferencial de estrona $1,0 \times 10^{-4}$ M en EtOH:buffer fosfato 0,1M (25:75), para diferentes concentraciones de (A) β -CD y (B) SBE- β -CD a 20°C.

Para representar de manera más clara el efecto de la concentración de ciclodextrina, se graficó la corriente de pico en función la concentración de las CDs en la solución (figura 4.8). En el caso de β -CD existe una mayor disminución de I_{pa} en comparación a SBE- β -CD.

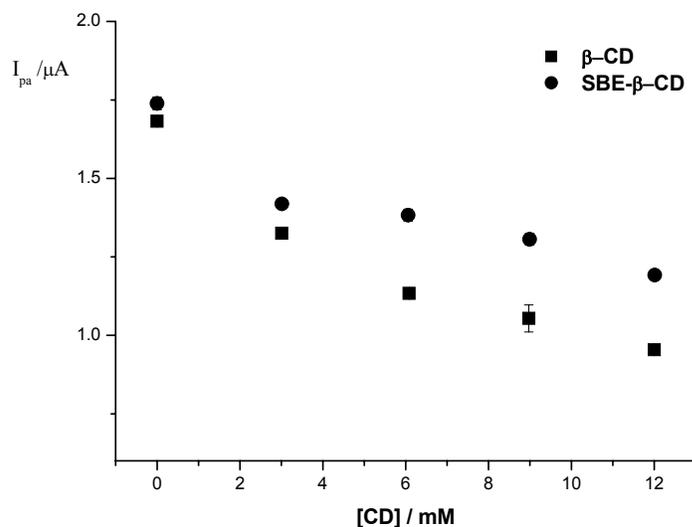


Figura 4.8: Efecto de la concentración sobre la corriente de pico a 20°C, para estrona en medio EtOH:buffer fosfato 0,1M (25:75) a pH 8.

La disminución de la corriente sería consecuencia de un menor coeficiente de difusión aparente del complejo con respecto al coeficiente de difusión de la molécula que se incluye. Esta diferencia en el coeficiente de difusión ha sido estudiada por Yáñez y colaboradores mediante cronocoulombimetría [33]. Esto se explica, precisando que el aumento de la concentración de CD provoca un desplazamiento hacia la formación del complejo de inclusión en el equilibrio mostrado en el esquema de la figura 1.3, es decir, hay una mayor concentración de estrona incluida en la CD, que presenta un menor coeficiente de difusión, lo que resulta en una disminución de la corriente observada.

Por otra parte cabe mencionar que no se observan variaciones significativas en los potenciales de pico en presencia de las distintas concentraciones de β -CD o SBE- β -CD. El mayor cambio de potencial

observado en ambos casos no excede los 50mV entre la estrona sola y la estrona con la máxima concentración de β -CD o SBE- β -CD, que en ambos casos es 12mM, es decir, el E_{pa} es prácticamente independiente de la concentración de las CDs (Figura 4.9).

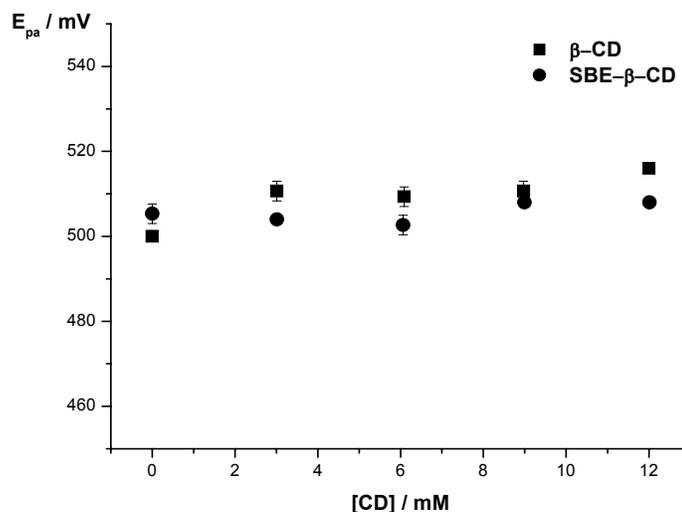


Figura 4.9: Efecto de la concentración sobre el potencial de pico a 20°C, para estrona en medio EtOH:buffer fosfato 0,1M (25:75) a pH 8.

Este resultado podría indicar que la inclusión no está ocurriendo por el anillo fenólico (anillo A), ya que de ser así, las CDs protegerían y en parte estabilizarían el anillo fenólico, por lo cual se requerirá mayor energía para lograr la oxidación de la estrona. Este tipo de efectos en el potencial han sido descritos en presencia de ciclodextrinas [12]. Cabe destacar que este resultado es solo una primera aproximación al tipo de interacción observada, pero nos da un indicio de la forma en que estrona puede estar interactuando con las CDs.

El estudio del efecto de la concentración de las CDs sobre las corrientes de pico, permite calcular las constantes de formación de los complejos de inclusión que se están formando a una temperatura determinada. Mediante la ecuación 3.1, de la gráfica $1/[CD]$ v/s $1/(1-I/I_0)$ se obtienen del intercepto la K_f (figura 4.10).

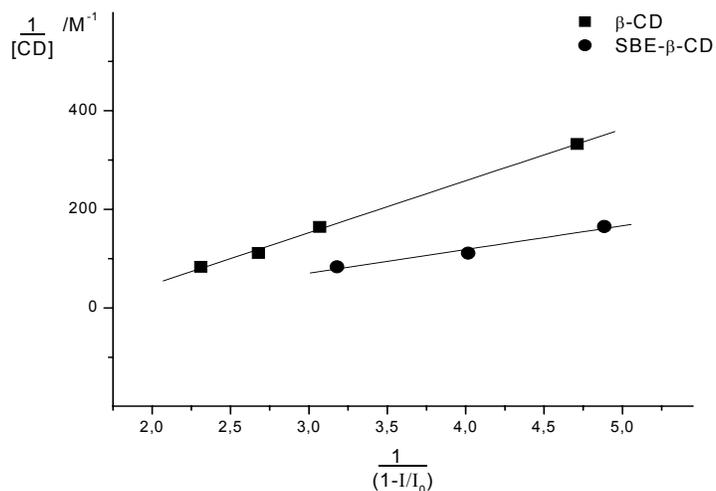


Figura 4.10: $1/[CDs]$ v/s $1/(1-I/I_0)$ a 20°C para estrona para diferentes concentraciones de β -CD y SBE- β -CD.

Los valores de constante obtenidos son 163 y $73 M^{-1}$ para β -CD y SBE- β -CD, respectivamente. Se aprecia que a esta temperatura existe una mayor afinidad de estrona a formar complejo de inclusión con la β -CD que con SBE- β -CD.

SBE- β -CD presenta cadenas de cuatro átomos de carbono y grupos sulfonato cargados que proporcionan una terminación cargada junto a una cadena con características más bien hidrofóbicas que están unidas a la cavidad de la ciclodextrina. Se ha encontrado que dependiendo de las características de la molécula huésped, la habilidad de acomplejar de la SBE- β -CD puede ser mayor o menor que la β -CD natural [20]. La disminución de la afinidad ha sido asociada con cambios en la hidrofobicidad de la zona más cercana a la cavidad (lo que podemos llamar “la entrada” a la cavidad) y/o cambios en la geometría del complejo de inclusión. Pese a que existe una significativa separación de los grupos sulfonato cargados respecto a la cavidad de la CD, lo que en muchos casos resulta en un aumento de la interacción con la molécula huésped, en este caso, con estrona, se obtuvo una menor constante de formación.

Es probable entonces, que la menor constante de formación esté relacionada con un cambio en la hidrofobicidad de la “entrada” junto con la interacción de los grupos sulfonato cargados con el grupo carbonilo del anillo D o el anillo aromático (anillo A) (figura 1.5) produzca algo de repulsión y debilite la interacción o bien, cambie la orientación de la estrona en el complejo de inclusión.

4.2.2 Efecto de la temperatura sobre la formación de los complejos de inclusión, estrona con β -Ciclodextrina y Sulfobutileter- β -Ciclodextrina.

La formación de los complejos de inclusión se ve afectada por diversas variables entre ellas la temperatura. Por lo cual es de interés saber como la temperatura incide sobre este proceso, de manera tal que permita obtener los parámetros termodinámicos que reflejan el tipo de interacciones involucradas en la formación del complejo. Para ello se trabajó con solución $1,0 \times 10^{-4}$ M de estrona en EtOH:buffer fosfato 0,1M (25:75) a pH 8 y mediante voltametría de pulso diferencial se obtuvieron voltamogramas para estrona en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de β -CD y SBE- β -CD a diferentes temperaturas que van desde los 20 hasta los 40°C con intervalos de 5°C.

Las figuras 4.11 y 4.12 muestran el efecto de la concentración de las CDs sobre la corriente de pico anódica a 20° y 30°C. Se han representado solo dos temperaturas para mostrar con más claridad el efecto de la temperatura. Se observa que la disminución de la corriente en presencia de CDs presenta pendientes distintas que dependen ligeramente de la temperatura, lo que se traduce en distintos valores de constante. Utilizando la ecuación 3.1, es posible obtener los valores de las K_f a las diferentes temperaturas, dichos valores se muestran en la tabla 4.1

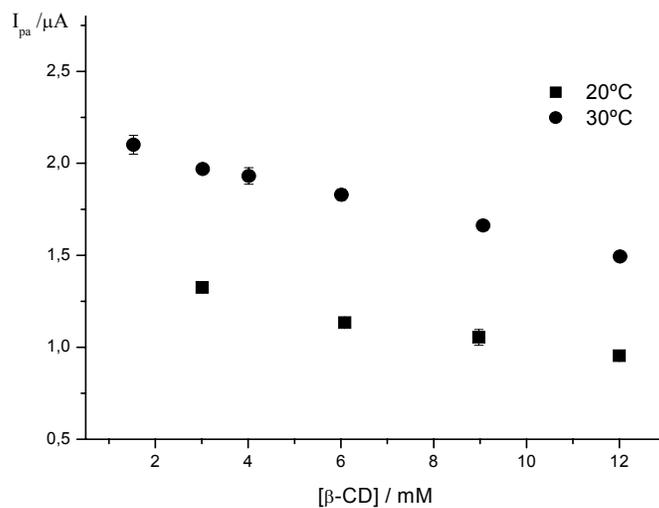


Figura 4.11: Efecto de la concentración de $\beta\text{-CD}$ sobre la corriente de pico, para estrona en medio EtOH:buffer fosfato 0,1M (25:75) a 20 y 30°C.

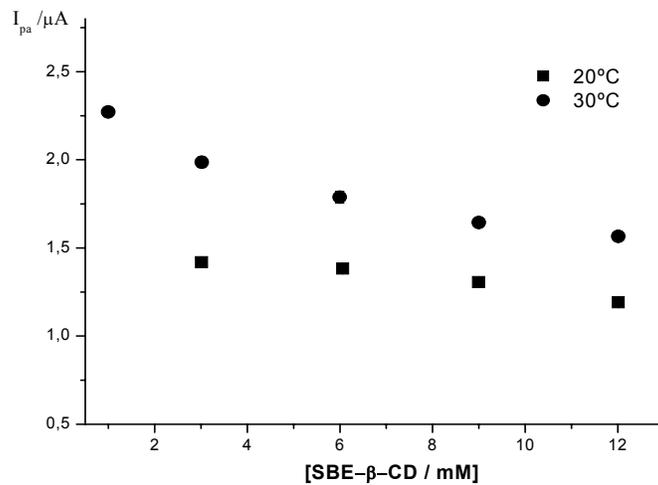


Figura 4.12: Efecto de la concentración de SBE- $\beta\text{-CD}$ sobre la corriente de pico, para estrona en medio EtOH:buffer fosfato 0,1M (25:75) a 20 y 30°C.

En la tabla 4.1 se aprecia que para β -CD, la constante de formación del complejo disminuye a medida que aumenta la temperatura, es decir, el equilibrio se desplaza hacia la disociación del complejo. El efecto para SBE- β -CD no es muy claro, hay un ligero aumento de la constante de formación con la temperatura entre 20° y 25°C, pero se mantiene prácticamente constante con la temperatura.

Tabla 4.1: Constantes de formación para β -CD y SBE- β -CD a diferentes temperaturas para voltametría de pulso diferencial.

Temperatura (°K)	K_f (M^{-1}) β -CD	K_f (M^{-1}) SBE- β -CD
293	163	73
298	155	136
303	123	119
308	92	118
313	75	136

Hay un aspecto que se debe destacar: es sabido que el aumento de la temperatura produce un aumento de la solubilidad del esteroide. Sin embargo, en presencia de CD existe un efecto de la temperatura que afecta el equilibrio de la formación del complejo. De manera sencilla: la formación del complejo de inclusión involucra un equilibrio dinámico entre las especies libres (estróna y CD) y el complejo de inclusión que se puede expresar en la siguiente ecuación:



En general, el aumento de la temperatura produce un desplazamiento de este equilibrio dinámico hacia las especies libres, lo que implica que los valores de constante sean menores a mayores temperaturas, según se aprecia para la

β -CD en la tabla 4.1. En el caso de la SBE- β -CD, inicialmente existe un aumento del valor de la constante, para posteriormente mantenerse más o menos constante a temperaturas mayores.

La posibilidad de disponer de valores de constantes de formación a una temperatura, permite calcular el cambio de entalpía (ΔH) y entropía (ΔS) respectivamente, mediante el uso combinado de las ecuaciones 3.2 y 3.3.

En la figura 4.13 se observa el efecto del inverso de la temperatura sobre el logaritmo natural de la constante de formación. La relación da cuenta del cambio de entalpía (ΔH) y entropía (ΔS) para los complejos de inclusión entre las CDs y la estrona. De la pendiente y el intercepto de la ecuación se obtienen el ΔH y ΔS , respectivamente. Los valores para ambos casos se muestran en la tabla 4.2.

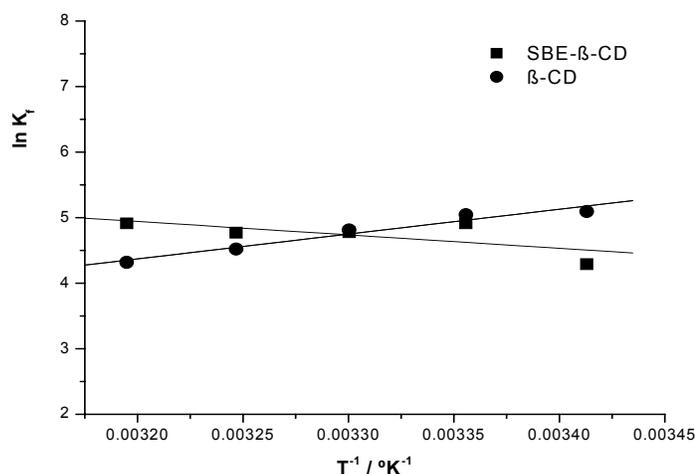


Figura 4.13: Efecto del inverso de la temperatura sobre la constante de formación, para estrona en medio EtOH:buffer fosfato 0,1M (25:75), en presencia de β -CD y SBE- β -CD.

Tabla 4.2: Cambio de entalpía y entropía para los complejos de inclusión estrona/ β -CD y estrona/SBE- β -CD.

CD	ΔH (KJ/mol)	ΔS (KJ/mol $^{\circ}$ K)	r	SD
β -CD	-31,5	-0,065	0,9779	0,0806
SBE- β -CD	17,0	0,096	0,7870	0,2162

Las fuerzas que conducen a la formación de los complejos de inclusión han sido descritas por diferentes autores. Dentro de ellas están: interacciones electrostáticas, de van der Waals, hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, pérdida de tensión conformacional, pérdida de moléculas de agua de alta energía e interacción de transferencia de carga.

Los cambios de entalpía y entropía se relacionan con estas energías y se han definido como un criterio para evaluar qué tipo de contribución está presente o contribuye de manera más importante en la formación del complejo de inclusión. De esta manera, los valores de la tabla 4.2, pueden ser interpretados en función de las fuerzas contribuyentes en la formación del complejo. Como se observa en la tabla, los valores muestran diferencias de magnitud y signo entre ambos complejos de inclusión. Los valores negativos de ΔH obtenidos para el complejo de inclusión estrona/ β -CD indican que la principal contribución a la fuerza que conduce a la formación del complejo es el dominio de interacciones de van der Waals. Los cambios positivos de entalpía y entropía están asociados a interacciones de tipo hidrofóbicas. De esta manera, para el complejo de inclusión entre estrona y SBE- β -CD se podría decir que la mayor contribución a la formación del complejo son las interacciones de tipo hidrofóbicas, lo que tendría relación con lo comentado anteriormente en relación

a la diferencia entre las constantes de formación de β -CD y SBE- β -CD obtenidas a 20 °C.

Sin embargo, se debe tener presente que, en el caso de SBE- β -CD, no hay un claro efecto de la temperatura sobre la constante de formación. De hecho, ya se había comentado anteriormente que el valor de la constante de formación permanece prácticamente constante con el aumento de la temperatura y la recta que se puede trazar para obtener el valor de entalpía muestra un bajo valor de correlación (ver valor de “r” en la tabla 4.2). Por lo tanto, el análisis de las contribuciones principales a la formación del complejo de inclusión no es tan simple, y debe tener involucrada la existencia de una compensación de tipo entálpica-entrópica que se relaciona con una mayor contribución de los otros tipos de interacciones, probablemente un cambio en las características hidrofóbicas debido a la presencia de los grupos sulfonato cargados, cambios en la energía de la exclusión de las moléculas de agua de la cavidad debido a la presencia de los grupos cargados negativos, etc. lo que provoca cambios en la interacción de SBE- β -CD con la molécula de estrona.

4.3 Comportamiento cromatográfico de estrona en fase móvil ACN/H₂O.

El estudio del complejo de inclusión estrona-CD mediante HPLC se realizó para β -CD. El estudio del complejo de inclusión utilizando SBE- β -CD no fue realizado, ya que no se contaba con una columna apropiada.

4.3.1 Efecto de la concentración de β -CD

Se registraron los tiempos de retención de la estrona en ausencia y presencia de β -CD en la fase móvil acetonitrilo/agua (35:65) a 40°C, dichos cromatogramas los podemos observar en la figura 4.14. A medida que aumentó la concentración de ésta en la fase móvil, el tiempo de retención de la estrona fue decreciendo, lo que evidencia una interacción entre ellos.

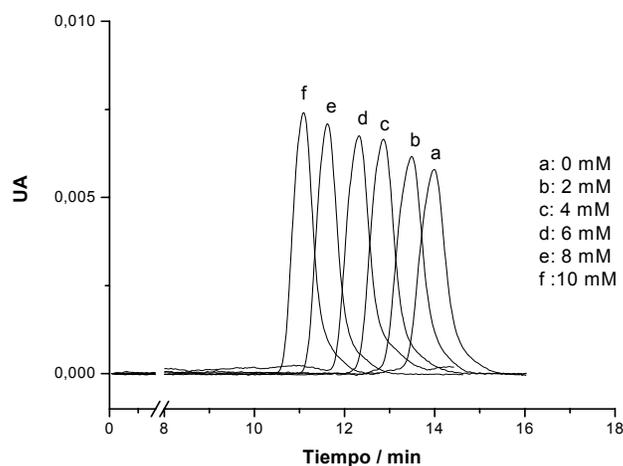


Figura 4.14: Cromatogramas de estrona 1×10^{-4} M a 40°C en presencia de diferentes concentraciones de β -CD; 0mM (a), 2mM (b), 4mM (c), 6mM (d), 8mM (e) y 10mM (f). Fase móvil ACN:Agua 35:65 (v/v), flujo de 1 mL/min.

Utilizando la Ec. 3.5, se calculó la constante de formación del complejo de inclusión a esta temperatura (Fig. 4.15), la cual tuvo un valor de $38,2 \text{ M}^{-1}$.

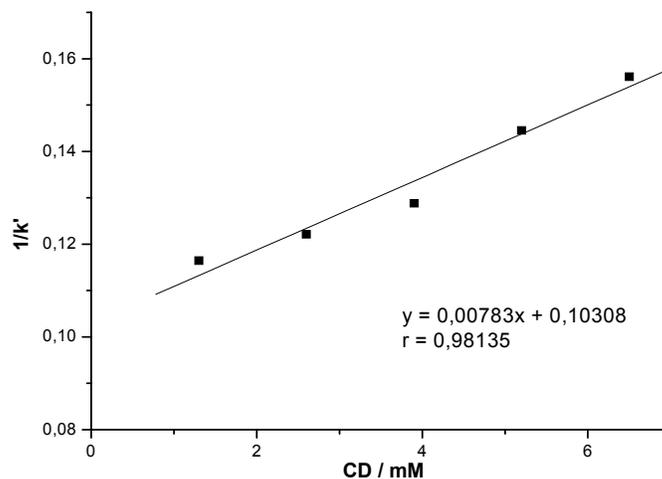


Figura 4.15: Efecto de la concentración de β -CD sobre el factor de capacidad, para estrona a 40°C , en fase móvil ACN:Agua (35:65).

4.3.2 Efecto de la temperatura sobre el factor capacidad del complejo estrona/ β -CD.

El efecto de la temperatura sobre el factor de capacidad de estrona en presencia de distintas concentraciones de β -CD en la fase móvil se aprecia claramente en la figura 4.16. Se ve claramente una disminución de la afinidad por formar complejos de inclusión en la medida que aumenta la temperatura.

Como se comentó anteriormente esto podría deberse a que a una mayor temperatura la estrona presenta una menor interacción con la CD, basado en que el equilibrio entre las especies libres y el complejo en estas condiciones se

ve afectado provocando una favorable tendencia a la disociación del complejo de inclusión.

El procedimiento anteriormente descrito se repitió a diferentes temperaturas, con lo cual fue posible obtener la constante de formación del complejo estrona/ β -CD a todas las temperaturas estudiadas (Fig. 4.16). Se observa que la pendiente del gráfico aumenta a medida que aumenta la temperatura de trabajo, lo que se refleja en una menor constante de formación. Los valores de las constantes de formación a las distintas temperaturas se informan en la tabla 4.3.

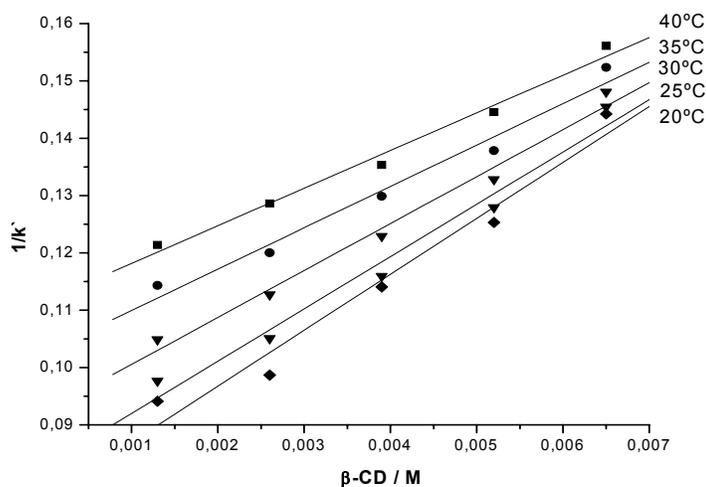


Figura 4.16: Efecto de la concentración de β -CD sobre el inverso del factor de capacidad, para estrona en fase móvil ACN:Agua (35:65) a diferentes temperaturas; 20, 25, 30, 35 y 40°C.

Tabla 4.3: Constantes de formación y para complejo de inclusión β -CD/estrona a diferentes temperaturas, por HPLC.

Temperatura ($^{\circ}$ K)	K_f (M^{-1})
293	95,0
298	71,5
303	57,6
308	45,6
313	38,2

Utilizando los valores de constante de formación obtenidos para el complejo estrona/ β -CD, se graficó el $\ln K_f$ v/s $1/T$. En este gráfico se observó una respuesta lineal. A partir de este gráfico se obtienen los valores del cambio de entalpía en la formación del complejo de inclusión en la fase móvil, ΔH°_f , y el cambio de entropía para el mismo fenómeno, ΔS°_f (figura 4.17)

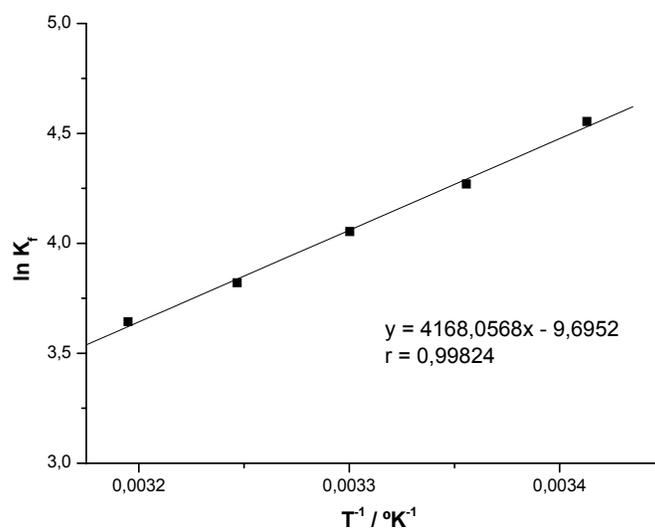


Figura 4.17: Efecto del inverso de la temperatura sobre la constante de formación para complejo estrona/ β -CD, en fase móvil, ACN:Agua (35:65).

De la gráfica se obtienen los siguientes valores termodinámicos:

$\Delta H_f^\circ = -34,7 \text{ KJ/mol } ^\circ\text{K}$ y $\Delta S_f^\circ = -0,081 \text{ KJ/mol } ^\circ\text{K}$. Los valores negativos de entalpía y entropía son interpretados como el reflejo de un fuerte complejo de inclusión en que las interacciones de van der Waals son la principal contribución [34]. Estos valores son el reflejo de un mayor ordenamiento en el sistema y de un proceso espontáneo que libera energía.

Es importante destacar que los valores de constantes de formación obtenidos por ambas técnicas no son iguales. Sin embargo, las constantes disminuyen a medida que aumenta la temperatura como se había explicado anteriormente, por lo que se obtienen valores similares de cambios entálpicos y entrópicos para la formación del complejo de inclusión. La diferencia entre ambas técnicas es el uso de un co-solvente distinto. En el caso de voltametría se utilizó etanol, mientras que en HPLC se utilizó acetonitrilo, los cuales son necesarios debido a la baja solubilidad de la estrona. De esta manera, las diferencias se pueden atribuir a equilibrios competitivos del co-solvente que, aunque en menor medida, tiende a formar complejos de inclusión con la ciclodextrina.

5. CONCLUSIONES

Para el sistema estrona/CD fue posible obtener constantes de formación mediante voltametría de pulso diferencial y HPLC.

Las constantes de formación para el complejo β -CD/estrona disminuyen a medida que aumenta la temperatura, ya que la temperatura afecta el equilibrio de la formación del complejo de inclusión. Para el complejo SBE- β -CD/estrona, no se observa un efecto claro de la temperatura debido a que las cadenas de 4 átomos de carbono que posee la SBE- β -CD acoplado a la repulsión de los grupos terminales con carga negativa producen una menor interacción con estrona.

Los parámetros termodinámicos indican que la mayor contribución a la fuerza que conduce la formación del complejo de inclusión de estrona con β -CD es debida a las interacciones de tipo van der Waals. En el caso del complejo de estrona con SBE- β -CD, podría existir una mayor contribución de interacciones de tipo hidrofóbicas, sin embargo, el análisis es más complejo debido a que no existe un claro efecto de la temperatura sobre la constante de formación, lo que puede deberse a compensación de entalpía y entropía en la formación del complejo de inclusión.

6. REFERENCIAS

- 1.- Z. Borkowska, J. Electroanal. Chem., 294 (1988) 423
- 2.- A.M. Martre, G. Mousset and P.J. Pouillen, J. Electroanal. Chem., 281 (1990) 279
- 3.- R.K. Jaworski, M. Goledzinowski and Z. Galus, J. Electroanal. Chem., 252 (1988) 425
- 4.- J. Szejtli, E. Bolla-Pusztzi, P. Szabo, T. Ferenczy, Pharmacie, 35 (1980) 779
- 5.- F. Cramer, W. Saenger, H. Spatz, JACS, 89 (1967) 14
- 6.- E. Bednarek, W. Bocian, J. Poznanski, J. Sitkowski, N. Sosnowska, L. Kozerski, Perkin Trans. 2, 5 (2002) 999
- 7.- N. Sosnowska, J. of Fluorescence, 7 (1997) 195
- 8.- Y. Liu, B- Li, T. Wada, Y. Inoue, Tetrahedron, 57 (2001) 7153
- 9.- K. Flood, E.Reynolds, N.Snow, J. Chromatogr. A, 903 (2000) 49
- 10.- C. Ravelet, A. Geze, A. Villet, C. Grosset, A. Ravel, D. Wouessidjewe, E.Peyrin, J. Pharm. Biomed Anal., 29 (2002) 425
- 11.- X. Dang, M. Nie, J. Tong, H Li, J. Electroanal. Chem., 448 (1998) 61
- 12.- C.Yáñez, L.Núñez-Vergara, J.A. Squella, Electroanalysis, 15 (2003) 1771
- 13.- D.W. Armstrong, W. DeMond, A. Alak, W.L. Hinze, T.E. Riehl, K.H.Bui, Anal. Chem., 14 (1991) 234
- 14.- B.V. Müller, E. Albers, Int. J. Pharm, 79 (1992) 273
- 15.- M. Suzuki, M. Kajtar, J. Szejtli, M. Vikman, E.Fenyvesi, L.Szente, Carbohydr. Res., 214 (1991) 25
- 16.- J.H. Park, mD.Jang, M.J. Sain, J. Chromatogr., 595 (1992) 45
- 17.- Y. Inoue, Y. Liu, L. -H.Tong, B. -J.Shen, D.-S. Jin, JACS 115 (1993) 10637

- 18.- Loukas, Y. J. Pharm and biomedical análisis, 16 (197) 275
- 19.- H.Ueda, D. Ou, T. Endo, H.Nagase, K.Tomono, T. Nagai, Drug. Dev. Ind. Pharm., 24 (1998) 863
- 20.- V.Zia, R.A. Rajewski, V.J. Stella, Pharm. Res., 18 (2001) 667
- 21.- G.L. Mosher, C.Fulk, AAPSP PharmSci., 3 (2001) 3
- 22.- V. Zia, R. Rajewski, E. Bornancini, E. Luna, V. Stella, J. Pharm. Sci., 86 (1997) 220.
- 23.- V. Zia, R. A. Rajewski, E. R. Bornancini, E. A. Luna, V. J. Stella, J. Pharm. Sci. 86 (1997) 223
- 24.- J. Pitha, S.M. Harman, M.E. Michel, J. Pharm. Sci., 75 (1986) 165
- 25.- K. Uekama, M. Otagiri, Y. Uemura, T. Fujinaga, K. Arimori, N. Matsuo, J. Pharmacobiol. Dyn., 6 (1983) 124
- 26.- H. Yano, F. Hirayama, M. Kamada, H. Arima, K. Uekama, J. Controlled Release, 79 (2002) 103
- 27.- K. Uekama, K. Arimori, A. Masaki, T. Irie, M. Otagiri, Chem. Pharm. Bull., 35 (1987) 2910
- 28.- T. Loftsson, J. Baldvinsdottir, A.M. Sigurgardottir, Int. J. Pharm., 98 (1993) 225
- 29.- I.K. Chun, D.S. Yun, Int. J. Pharm. 96 (1993) 91
- 30.- G. C. Zhao, J. J. Zhu, J. J. Zhang, H. Y. Chen, Anal. Chim. Acta 394 (1999) 337
- 31.- M. S. Ibrahim, I. S. Shehatta, A. A. Al-Nayeli, J. Pharm. Biomed. Anal. 28 (2002) 217
- 32.- M. Ngundi, O. A. Sadik, T. Yamaguchi, S. Suye, Electrochem. Communications 5 (2003) 66

- 33.- C. Yañez, R. Salazar, L. J. Nuñez-Vergara, J. A. Squella, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 35 (2004) 56
- 34.- Y. Matsui, K. Mochida, Bull. Chem. Soc. Jpn. 52 (1979) 2808-2814