



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud

Encapsulación en ciclodextrinas de compuestos con
actividad frente a la alopecia androgénica masculina.

Autor:

Rebeca González Louzao

Directores:

Dra. Dña. Estrella Núñez Delicado

Dra. Dña. Carmen Lucas Abellán

Murcia, Diciembre de 2020



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud

Encapsulación en ciclodextrinas de compuestos con
actividad frente a la alopecia androgénica masculina.

Autor:

Rebeca González Louzao

Directores:

Dra. Dña. Estrella Núñez Delicado

Dra. Dña. Carmen Lucas Abellán

Murcia, Diciembre de 2020



UCAM
UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

AUTORIZACIÓN DE LO/S DIRECTOR/ES DE LA TESIS
PARA SU PRESENTACIÓN

El Dra. Dña. Estrella Núñez Delicado y la Dra. Dña. Carmen Lucas Abellán como Directoras de la Tesis Doctoral titulada “Encapsulación en ciclodextrinas de compuestos con actividad frente a la alopecia androgénica masculina.” realizada por Dña. Rebeca González Louzao en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

LO QUE FIRMO, PARA DAR CUMPLIMIENTO AL REAL DECRETO 99/2011 EN MURCIA A 18 DE DICIEMBRE DE 2020.

Fdo.: Dña. Estrella Núñez Delicado

Fdo.: Dña. Carmen Lucas Abellán

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, le doy las gracias a Dios en quien siempre confío mis planes y proyectos y en el que solo espero, se cumpla su voluntad.

A continuación, gracias a la Universidad Católica San Antonio de Murcia por prestarme su espacio, sus instalaciones y por ofrecerme la posibilidad de conocer gente extraordinaria que han guiado de manera impecable mi evolución en el ámbito científico. Por ello mis más sinceras gracias a Estrella y a Carmen, siempre he sido consciente de lo bendecida que he sido al estar bajo vuestra tutela. Me habéis enseñado, me habéis acompañado a lo largo de estos años ayudándome a crecer profesionalmente sin lugar a dudas, pero mi “gracias” es sobretodo por el trato recibido. Gracias por apoyarme, por confiar en mí, por ser disciplinadas y por hacerme sentir especial. Es un placer conocerlos.

La lista de agradecimientos es infinita, porque afortunadamente tengo mucho que agradecer, pero tengo que empezarla dándole un “Gracias” infinito a una gran amiga mía. Gracias María. Sin duda has sido una de mis grandes fortunas en estos años. No te imaginas lo inmenso que es este gracias. Te quiero.

María es especial pero a la altura tengo la suerte de tenerte, Teresa, gracias por tu amistad, por tu voluntad de servir porque me has ayudado en infinitas ocasiones, por eso te dedico estas palabras. No podría olvidarme de mencionar a todas las personas que formaron el laboratorio, ese lugar de trabajo, en algo divertido, dinámico y único. He disfrutado mucho esa etapa y por ello doy las gracias en general: Gabi, Jose Manuel, JM, Silvia, Sara, Estefanía, Vicente y a todo el grupo de investigación por acogerme como una más. Gracias a todas las personas que de forma más física han participado en esta tesis, me refiero a Horacio, José Pedro, a Santiago y a José Antonio Gabaldón. Habéis aportado un granito importante y os lo agradezco de corazón.

Hablando del corazón quiero ocupar estas líneas para hablar de esas personas que ocupan el mío. Gracias Daniel por todo lo que me das, gracias por tu ayuda,

para mí el valor que tienes es incalculable, por eso créetelo, porque eres fundamental para mí, además gracias por todo lo que me has ayudado en la tesis que es mucho. Te quiero.

Gracias a mis padres, sin ellos no lo hubiera conseguido, gracias por cuidar a mi bebé de la forma en que lo habéis hecho y por comprenderme y apoyarme. Os quiero con locura. Gracias a mis hermanos porque son fundamentales en mi vida, Laila, Jacobo y Felipe, os quiero.

Gracias a mis suegros por el apoyo moral ofrecido, por estar siempre dispuestos y apoyarnos en todo. Sois un ejemplo de fortaleza y esperanza que está marcando mi vida.

También quiero reconocer a la gente que hace mi día a día, David, Amanda, María Ángeles, Manoli y Tatiana, un “gracias” gigante a vosotros que me habéis apoyado, habéis cubierto mis turnos, me dáis ánimos y confiáis en mí. Os quiero.

Me acuerdo de todas las personas que me quieren y por eso gracias a todos, pero mi dedicatoria es para mi hija Sofía, que aunque es pequeñita, ella ha vivido más que nadie el sacrificio de esta tesis. Sofía eres lo más bonito que tengo y mi fuerza para continuar y no tirar la toalla.

Por último, pero en un lugar muy especial, te recuerdo Noemí, y te dedico esta tesis junto a tu sobrina. Que Dios te guarde siempre.

Como la vida en general está llena de etapas, espero con estas líneas estar cerrando una para empezar otra nueva con una gran ilusión.

A TODOS GRACIAS.

*“Por medio del trabajo se libera el hombre;
Por medio del trabajo se convierte en señor de la Naturaleza;
Por medio del trabajo muestra que es más que Naturaleza”
Soereng Kierkegaard*

PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA DERIVADA DE ESTA TESIS

ARTÍCULOS PUBLICADOS

El contenido de esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente publicado en los siguientes trabajos:

- González-Louzao, Rebeca; Lucas-Abellán, Carmen; Pérez-Sánchez, Horacio; Cerón-Carrasco, José Pedro; Gabaldón, José Antonio; López-Miranda, Santiago; Yáñez-Gascón, María Josefa; Asín-Llorca, Manuel; Núñez-Delicado, Estrella. Encapsulation of finasteride with native and modified γ -cyclodextrins. Extensive characterization of the complexes. International Journal of Pharmaceutics. Online publication: 18-JULY-2020. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119619
- González-Louzao, Rebeca; Lucas-Abellán, Carmen; Núñez-Delicado, Estrella. Encapsulation of dutasteride with native and modified γ -cyclodextrins. Extensive Characterization of the complexes. En desarrollo.
- González-Louzao, Rebeca; Lucas-Abellán, Carmen; Núñez-Delicado, Estrella. Extensive study of minoxidil encapsulation with different types of native and modified cyclodextrins. En desarrollo.

COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES

- González-Louzao, Rebeca; Lucas-Abellán, Carmen; Núñez-Delicado, Estrella. Título del trabajo: Encapsulación de finasterida. Nombre del congreso: II Jornadas de Investigación y Doctorado: Doctorado Industrial. Congreso ámbito geográfico: Nacional. Tipo de participación: póster. Fecha de celebración: 24 junio 2016. Entidad organizadora: EDIUCAM. Universidad Católica San Antonio de Murcia.
- González-Louzao, Rebeca; Lucas-Abellán, Carmen; Núñez-Delicado, Estrella. Título del trabajo: Review: Complejación de dutasterida con γ -CDs. Nombre del congreso: IV Jornadas de Investigación y Doctorado: Woman in Science. Congreso ámbito geográfico: Nacional. Tipo de participación: comunicación oral. Fecha de celebración: 18 mayo 2018. Entidad organizadora: EDIUCAM. Universidad Católica San Antonio de Murcia.

COMUNICACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

- González-Louzao, Rebeca; Lucas-Abellán, Carmen, Asín-Llorca, Manuel; Constanzo-Beretty, José; Gabaldón, Jose Antonio; Núñez-Delicado, Estrella. Título del trabajo: Complexation of finasteride with γ - and HP- γ -CDs. Nombre del congreso: 5TH European Conference on Cyclodextrins (EUROCD2017). Congreso internacional: Lisboa. Tipo de participación póster. Fecha de celebración: 3 y 6 octubre 2017. Entidad organizadora: Facultad de Farmacia, Universidad de Lisboa.

PREMIO DE INVESTIGACIÓN

- Premio de investigación (2020) de la Real Academia de Medicina y Cirugía de la Región de Murcia “Doctor Pedro Alonso Carrión”. González-Louzao, Rebeca; Lucas-Abellán, Carmen; Pérez-Sánchez, Horacio; Cerón-Carrasco, José Pedro; Gabaldón, José Antonio; López-Miranda, Santiago; Yáñez-Gascón, María Josefa; Asín-Llorca, Manuel; Núñez-Delicado, Estrella. Encapsulation of finasteride with native and modified γ -cyclodextrins. Extensive characterization of the complexes. International Journal of Pharmaceutics. Online publication: 18-JULY-2020. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119619

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Los trabajos de investigación realizados en la presente Tesis Doctoral han sido financiados por la empresa AYC184 a través de los siguientes contratos de investigación con el grupo REM de la UCAM:

- Encapsulación de dutasterida en ciclodextrinas. Código CFE/DU/28-15.
- Encapsulación de finasterida en ciclodextrinas. Código CFE/FI/29-15.

PATENTE

- Estrella Núñez Delicado, Carmen Lucas Abellán, Rebeca González Louzao, José Antonio Gabaldón Hernández e Isabel Fortea Gorbe. Composición para aumentar la solubilidad de Dutasterida y Minoxidilo. Patente en evaluación.

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

La causa de la calvicie masculina radica en la sensibilidad de los folículos pilosos hacia la dihidrotestosterona. La enzima 5-alfa-reductasa convierte la hormona testosterona en dihidrotestosterona, y los folículos responden a ella reduciendo su tamaño, hasta que finalmente, las membranas del folículo piloso se tornan rígidas. De esta forma, la estructura folicular recibe menos irrigación sanguínea y los cabellos nuevos son más débiles y finos de lo normal. Al final del proceso, los folículos se atrofian y el cabello que se cae no es reemplazado por cabello nuevo.

Se han estudiado los niveles de dihidrotestosterona en personas con alopecia androgenética y suelen ser normales. Por lo tanto, se ha determinado que no es un nivel elevado de dihidrotestosterona lo que produce la alopecia, sino una sensibilidad particular de los folículos frente a la dihidrotestosterona. Los tratamientos que inhiben la enzima 5-alfa-reductasa tienen buenos resultados porque evitan la producción de dihidrotestosterona.

Finasterida, dutasterida y minoxidilo son las moléculas más utilizadas para combatir la calvicie androgénica masculina. Finasterida y Dutasterida inhiben la actividad de la enzima 5-alfa-reductasa. Finasterida inhibe la isoforma tipo II de la enzima, mientras que dutasterida inhibe las dos isoformas (tipo I y tipo II) de la enzima, haciendo que parte de la testosterona no pueda transformarse en dihidrotestosterona. Sin embargo, la acción de minoxidilo es vasodilatadora, reduciendo la resistencia vascular periférica y provocando un aumento en la microcirculación alrededor del folículo piloso.

La administración de estos compuestos vía oral conlleva la aparición de ciertos efectos secundarios indeseados, por lo que es interesante su aplicación vía tópica. El problema que presentan estos tres compuestos es su baja solubilidad acuosa, lo que conlleva una baja penetración a través de las membranas celulares. Para mejorar dicha penetración para su aplicación por vía tópica, se formulan en preparados hidroalcohólicos, lo que puede producir irritación en el cuero

cabelludo. Una de las tecnologías que se pueden utilizar para mejorar su solubilidad y penetración cutánea evitando el uso de soluciones hidroalcohólicas, es el uso de ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas son azúcares cíclicos naturales, derivados del almidón, cuya principal propiedad es la de poseer una cavidad interna hidrofóbica que les permite formar complejos de inclusión con una amplia variedad de moléculas, entre las que se encuentran estos tres compuestos. Mediante el proceso de complejación, las ciclodextrinas modifican las propiedades físicas y químicas del compuesto encapsulado, viéndose afectadas entre otras, su solubilidad acuosa, biodisponibilidad y penetración cutánea.

La presente tesis se centra en el estudio de la complejación de finasterida, dutasterida y minoxidilo en diferentes tipos de ciclodextrinas para determinar el tipo de ciclodextrina óptimo para aumentar la solubilidad acuosa de cada uno de estos compuestos y permitir, en un futuro, la fabricación de un preparado de uso tópico con estos compuestos, libre de alcoholes, mejorando así su penetración y evitando la irritación del cuero cabelludo.

Para ello se estudió la complejación de finasterida, dutasterida y minoxidilo en diferentes tipos de ciclodextrinas nativas y modificadas mediante el método de solubilidad. Posteriormente se estudió el efecto de la temperatura sobre el proceso de complejación. Además, calculamos la eficacia de complejación para los tres fármacos, ya que este parámetro, nos da información sobre el aumento de solubilidad de cada compuesto en función del tipo de ciclodextrinas utilizadas y hace referencia a la relación molar entre la concentración de ciclodextrinas que están en disolución complejando un compuesto y la concentración de ciclodextrinas libres en disolución.

PALABRAS CLAVE: finasterida, dutasterida, minoxidilo, alopecia androgénica masculina, ciclodextrinas, encapsulación, eficacia de complejación.

ABSTRACT AND KEYWORDS

The cause of male baldness lies in the sensitivity of the follicles to dihydrotestosterone. The enzyme 5- α -reductase converts the hormone testosterone into dihydrotestosterone, and the follicles respond to it by reducing their size, until finally, the hair follicles membranes become rigid. In this way, the follicular structure receives less blood supply and the new hairs are weaker and thinner than normal. At the end of the process, the follicles atrophy, and the falling hair is not replaced by new hair.

Dihydrotestosterone levels have been studied in people with androgenetic alopecia and are usually normal. Therefore, it has been determined that it is not a high level of dihydrotestosterone that causes alopecia, but a particular sensitivity of the follicles to dihydrotestosterone. Treatments that inhibit the enzyme 5- α -reductase have good results because of they prevent the production of dihydrotestosterone

Finasteride, dutasteride, and minoxidil are the most widely used molecules to combat male androgenic baldness. Finasteride and dutasteride inhibit the activity of the enzyme 5- α -reductase, finasteride only inhibits the type II isoform, while dutasteride inhibits both isoforms (type I and type II) making part of the testosterone unable to be transformed into dihydrotestosterone. However, the action of minoxidil is vasodilatory reducing peripheral vascular resistance, causing an increase in microcirculation around the hair follicle.

The administration of these compounds orally leads to the appearance of unwanted side effects, so their topical application is interesting. The problem presented by these three compounds is their low water solubility, so its penetration is not very high. To improve such penetration is necessary to make hydroalcoholic preparations that can produce irritation on the scalp. One of the technologies that can be used to improve its solubility and skin penetration is the use of cyclodextrins, thus avoiding hydroalcoholic solutions.

Cyclodextrins are natural cyclic sugars, derived from starch, whose main property is to have a hydrophobic internal cavity that allows them to form inclusion complexes with a wide variety of molecules, among which are these three compounds. Through the complexation process, cyclodextrins modify the physical and chemical properties of the encapsulated compounds, affecting, among others, its water solubility, bioavailability, and skin penetration.

This thesis focuses on the study of the complexation of finasteride, dutasteride, and minoxidil with different types of cyclodextrins, to determine which cyclodextrin further increases the water solubility of these compounds and allows in the future the manufacture of aqueous solutions with these compounds free of alcohols, thus improving their penetration and avoiding scalp irritation.

For this purpose, the complexation of finasteride, dutasteride, and minoxidil was studied in different types of native and modified cyclodextrins, employing the solubility method. Subsequently, the effect of temperature on the complexation process was also studied. Besides, we calculated the complexation efficiency for the three drugs, since this parameter gives us information about the increase in solubility of each compound depending on the type of cyclodextrins used and refers to the molar relationship between the concentration of cyclodextrins that are in solution complexing a compound and the concentration of free cyclodextrins in solution.

Keywords: finasteride, dutasteride, minoxidil, male androgenic alopecia, cyclodextrins, encapsulation, complexation efficiency.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
I-INTRODUCCIÓN	35
I.1. Alopecia	37
I.1.1. Alopecia androgénica masculina	37
I.1.2 Anatomía del folículo piloso	39
I.1.3 Ciclo del crecimiento piloso.....	41
I.1.4 Etiología y desarrollo de AGA.....	43
I.1.5 Factores de desarrollo de AGA	45
I.1.5.1 Factores genéticos	45
I.1.5.2 Factores androgénicos	49
I.1.6 Compuestos con actividad frente a la alopecia androgénica masculina.....	59
I.1.6.1 Inhibidores de la 5αR.....	60
I.1.6.2 Minoxidilo.....	68
I.2. Ciclodextrinas (CDs)	71
I.2.1 Historia y definición.....	71
I.2.2 Propiedades	73
I.2.3 Fundamentos físico-químicos de las CDs	78

I.2.3.1 Complejos de inclusión (CI)	80
I.2.3.2 Equilibrio de los complejos.....	82
I.2.3.3 Eficacia de complejación (CE).....	85
I.2.4 Consideraciones toxicológicas.....	87
I.2.5 Metabolismo y farmacocinética de las CDs.....	88
I.2.6 Uso en la industria farmacéutica.....	89
I.2.6.1 Normas reguladoras.....	90
I.2.6.2 Aplicación de las CDs en la industria farmacéutica.....	91
II - OBJETIVOS.....	101
III - MATERIALES Y MÉTODOS.....	105
1.1. Reactivos.....	107
1.2. Estudio de solubilidad.....	107
1.2.1. Cálculo de Kc, CE y MR	107
1.2.1.1. Estudio del efecto de la temperatura en el proceso de complejación.....	109
1.2.1.2. Estudio del efecto del pH en el proceso de complejación de FIN.....	109
1.2.2. Cuantificación de FIN y DUT por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	109
1.2.3. Cuantificación de MX por espectroscopía	111
1.3 Secado por atomización de los complejos de inclusión FIN-CDs mediante Spray-driyer.....	112
1.4 Caracterización de complejos de FIN-CDs	113
1.4.1 Resonancia magnética nuclear (RMN), estudio supramolecular de las estructuras de los complejos	113

1.4.2 Espectroscopía de absorción infrarroja (IR)	113
1.4.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	114
1.4.4 Parámetros termodinámicos del proceso de complejación	114
1.4.5 Caracterización morfológica	115
1.4.6 Modelado molecular	115
IV - FINASTERIDA.....	119
1.1. Introducción.....	121
1.1.1 Finasterida.....	121
1.2. Resultados y discusión.....	122
1.2.1 Análisis computacional	122
1.2.2. Estudios de solubilidad.....	124
1.2.3. Estudio del efecto del pH y la temperatura sobre la complejación de FIN.....	132
1.2.4. Análisis de los parámetros termodinámicos del proceso de complejación.....	134
1.2.5. Caracterización molecular de los complejos FIN-CDs mediante el estudio supramolecular de sus estructuras.....	136
1.2.5.1 Resonancia magnética nuclear (RMN)	136
1.2.5.2 Modelado molecular	140
1.2.5.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	142
1.2.5.4. Espectroscopía de absorción infrarroja (IR)	143
1.2.5.5. Caracterización morfológica.....	146
V – DUTASTERIDA.....	149
1.1. Introducción.....	151
1.1.1 Dutasterida.....	151

1.2. Resultados y discusión	152
1.2.1 Estudio de solubilidad	152
1.2.2 Cálculo de K_c, CE y MR	154
1.2.3 Estudio del efecto de la temperatura sobre el proceso de complejación	156
1.2.4 Análisis de los parámetros termodinámicos del proceso de complejación	158
 VI - MINOXIDILO	 163
1.1. Introducción	165
1.1.1 Minoxidilo	165
1.2. Resultados y discusión	165
1.2.1 Estudio de solubilidad	166
1.2.2. Cálculo de CE y MR	172
1.2.3. Efecto de la temperatura sobre la complejación de MX.....	174
1.2.4 Análisis de los parámetros termodinámicos del proceso de complejación de MX con β- y HP-β-CDs.....	175
 VII - CONCLUSIONES	 179
VIII - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	183

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1: Genes y sus variaciones más importantes implicados en AGA, identificadas en las bases de datos genómicas: ncbi, genecard, ensembl y snpedia.....48

Tabla I.2: Hitos señalados en la historia acerca del conocimiento de las CDs.....72

Tabla I.3: Propiedades de las CDs nativas.....74

Tabla I.4: Propiedades fisicoquímicas de β -CDs y su análogo lineal maltoheptosa.....75

Tabla I.5: Métodos aplicados para aumentar de la eficacia de complejación (CE).....95

Tabla IV.1: Estudio de solubilidad de FIN con diferentes tipos de CDs. Constantes de complejación (K_c), coeficientes de correlación de los diagramas de fases (R^2), eficacia de complejación (CE) y relación molar (MR).130

Tabla IV.2: Estudio de solubilidad de FIN con γ - y HP- γ -CDs. Efecto de la temperatura y el pH en: la solubilidad acuosa (S_0), constante de complejación (K_c), coeficiente de correlación del diagrama de fases (R^2), eficacia de complejación (CE) y relación molar (MR).134

Tabla IV.3: Energía de transferencia libre de Gibbs (ΔG_{tr}^0) del proceso de solubilización de FIN a 4, 25 y 65° a distintas concentraciones de CDs (mM). Parámetros termodinámicos: variación estándar de energía libre (ΔG^0), variación estándar de entalpía (ΔH^0) y variación estándar de entropía (ΔS^0).135

Tabla IV.4: Parámetros termodinámicos del proceso de solubilización de FIN a 4, 25 y 65° a distintas concentraciones de CDs (mM). Variación estándar de energía libre (ΔG^0), variación estándar de entalpía (ΔH^0) y variación estándar de entropía (ΔS^0).	135
Tabla IV.5: ^1H NMR desplazamiento químico del protón (ppm) de FIN. Representados los protones (H) más significativos antes y después de la formación de los complejos de inclusión en el espectro de RMN.	138
Tabla IV.6: Distribución del tamaño de partícula de FIN, γ - y HP- γ -CDs y de sus respectivos complejos en estado sólido.	148
Tabla V.1: Estudio de solubilidad de DUT con diferentes tipos de CDs. Constante de complejación (Kc), coeficiente de correlación del diagrama de fases (R^2), eficacia de complejación (CE) y relación molar (MR).	155
Tabla V.2: Estudio de solubilidad de DUT con γ - y HP- γ -CDs. Efecto de la temperatura en: la solubilidad acuosa (S_o), constante de complejación (Kc), coeficiente de correlación del diagrama de fase (R^2), eficacia de complejación (CE) y relación molar (MR).	157
Tabla V.3: Energía de transferencia libre de Gibbs (ΔG_{tr}^0) del proceso de solubilización de DUT a 4, 25 y 65° a distintas concentraciones de CDs (mM).	160
Tabla V.4: Parámetros termodinámicos del proceso de solubilización de DUT a 4, 25 y 65° a distintas concentraciones de CDs (mM). Variación estándar de energía libre (ΔG^0), variación estándar de entalpía (ΔH^0) y variación estándar de entropía (ΔS^0).	161
Tabla VI.1: Estudio de solubilidad de MX con diferentes tipos de CDs. Constante de complejación (Kc).	167
Tabla VI.2: Coeficiente de correlación del diagrama de fases (R^2), eficacia de complejación (CE) y relación molar (MR).	173
Tabla VI.3: Estudio de solubilidad de MX con β - y HP- β -CDs. Efecto de la temperatura en: la solubilidad acuosa (S_o), constante de complejación (Kc), coeficiente de correlación del diagrama de fase (R^2), eficacia de complejación (CE) y relación molar (MR).	175

Tabla VI.4: Energía de transferencia libre de Gibbs (ΔG_{tr}^0) del proceso de solubilización de MX a 4, 25 y 65° a distintas concentraciones de CDs (mM).....176

Tabla VI.5: Parámetros termodinámicos del proceso de solubilización de MX a 4, 25 y 65° a distintas concentraciones de CDs (mM). Variación estándar de energía libre (ΔG^0), variación estándar de entalpía (ΔH^0) y variación estándar de entropía (ΔS^0).....177

INDICE DE FIGURAS

Figura I.1: Estructura del folículo piloso.....	39
Figura I.2: Ciclo del crecimiento del pelo.....	41
Figura I.3: Clasificación de la alopecia según escala Hamilton-Norwood.....	45
Figura I.4: Metabolismo androgénico en los testículos. Implicadas dos rutas Δ 4-5 que supone la vía mayoritaria una respecto a la otra, dependiendo de la especie. En humanos la ruta por excelencia es la Δ 5, mientras que en roedores es la Δ 4.	51
Figura I.5: Unión de los andrógenos al RA, translocación al núcleo del complejo andrógeno-receptor donde se une a ERA dando inicio a la transcripción del ARNm y posterior traducción de proteínas con acción biológica.....	54
Figura I.6: Metabolismo androgénico en tejidos extragonadales.	57
Figura I.7: Diana de acción de los inhibidores de la 5 α R.....	60
Figura I.8: Mecanismo de acción de la enzima 5 α R.	61
Figura I.9: Estructura molecular de 4-azasteroides.	62
Figura I.10: Estructura molecular de FIN.....	63
Figura I.11: Estructura molecular de DUT (A) y de FIN (B).	65
Figura I.12: Estructura molecular de MX.	68
Figura I.13: Estructura molecular de α -, β - y γ -CDs, nativas.....	74
.....	77
Figura I.14: Estructuras supramoleculares derivadas de CDs: a) Nanoestructuras supramoleculares tipo micelas, nanoesferas, nanobastones y vesículas entre otras, b) CDs conjugadas con polímeros y c) pseudopolirotaxano α -CDs-PEG (polietilenglicol).	77

Figura I.15: Estructuras macrocíclicas A) Rotaxano y B) Pseudorotaxano.....	78
Figura I.16: Conformación tridimensional de las CDs: a) distribución espacial de los grupos hidroxilo de los carbonos de la glucopiranososa y formación del enlace glucosídico, b) estructura tronco-cónica de las CDs. 79	79
Figura I.17: Diagrama de fases y clasificación de los complejos establecida por Higuchi y Connors, 1965.....	83
Figura I.18: Distintos tipos de complejos de inclusión.	84
Figura I.19: Esquema de la permeabilidad a través de la membrana biológica con una capa externa acuosa (UWL) y la membrana lipofílica. El vehículo acuoso contiene disuelto el fármaco, R_d , H_d , R_m y H_m que son la resistencia y el grosor de UWL (D) y de la membrana (M). C_v es la concentración de fármaco disuelta en el vehículo, CD es la concentración de fármaco en el entorno acuoso inmediato a la superficie de la membrana, C_1 y C_2 son las concentraciones de fármaco que contiene la membrana, fuera y dentro de la superficie, respectivamente, y por último, $K_{M/D}$ es el coeficiente de partición del fármaco entre la membrana y el exterior acuoso.	93
Figura III.1: Recta de calibrado de Finasterida ($y = 17625.9x$).....	110
Figura III.2: Recta de calibrado de Dutasterida ($y = 11503.2x$).....	111
Figura III.3: Recta de calibrado de Minoxidilo ($y = 11.7x$).....	112
Figura IV.1: Estructuras computacionales de mecánica cuántica de FIN en las formas neutral, aniónicas y tautoméricas. Las estructuras modificadas están señaladas en el círculo rojo. Esquema del color: carbono en gris, hidrógeno en blanco, oxígeno en rojo y nitrógeno en azul.	122
Figura IV.2: Predicción de los espectros de absorción UV-vis para FIN en su forma neutral (línea continua), tautomérica (línea de puntos) y aniónica (línea discontinua)..	124
Figura IV.3: Diagramas de fases de FIN con α -CDs (●) (A), y γ -CDs (●) (B).	125
Figura IV.4: Diagramas de fases de FIN con β -CDs (●) (A) y detalle de la parte lineal de β -CDs (●)(A.1).	126

Figura IV.5: Diagramas de fases de FIN con HP- β - (●) y HP- γ -CDs (○) (A), y con metil- β - (●) y metil- γ -CDs (○) (B).	129
Figura IV.6: NMR 2D FIN- γ -CDs (imagen superior) y FIN-HP- γ -CDs (imagen inferior).	139
Figura IV.7: Resultados del acoplamiento de FIN- γ -CDs (panel superior) y de FIN-2HP- γ -CDs (panel inferior).	141
Figura IV.8: Termogramas DSC para (a) FIN, (b) γ -CDs, (c) HP- γ -CDs, (d) complejos de FIN- γ -CDs y (e) complejos de FIN-HP- γ -CDs.	142
Figura IV.9: Espectro FT-IR de A) FIN, B) γ -CDs, C) HP- γ -CDs, D) complejos de inclusión de FIN- γ -CDs y E) complejos de inclusión de FIN-HP- γ -CDs.	145
Figura IV.10: Imágenes micrográficas obtenidas por microscopio electrónica de barrido de FIN -500 x (a), γ -CDs -250 x (b), HP- γ -CDs -100 x (c), FIN-HP- γ -CDs -500 x (d) y FIN- γ -CDs -500 x (e).....	147
Figura V.1: Diagrama de fases de DUT con γ -CDs (●).	153
Figura V.2: Diagrama de fases de DUT con HP- γ -CDs (●).	154
Figura VI.1: Diagrama de fases de MX con α -CDs (●).	168
Figura VI.2: Diagrama de fases de MX con β -CDs (●).	169
Figura VI.3: Diagrama de fases de MX con γ -CDs (●).	170
Figura VI.4: Diagrama de fases de MX con HP- β -CDs (●).	171

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN: Ácido Desoxiribinucleico
- AEMPs: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
- AGA: Alopecia Androgénica Masculina
- AMPc: Adenosín Monofosfato cíclico
- Aq: Exterior acuoso
- AR: Receptor Androgénico
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
- ATR: Reflectancia total atenuada
- ΔH : Entalpía
- ΔS : Entropía
- ΔG° : Energía libre estándar
- ΔG°_{tr} : Energía libre de Gibbs
- BDA: Biodisponibilidad
- BCS: Sistema de clasificación biofarmacéutica de drogas
- BHT: Butilhidroxitolueno
- CAG: Triplete de poliglutamina
- CDs: Ciclodextrinas
- CIMA: Centro de información del medicamento de la AEMPs
- CGTasa: Enzima ciclodextringlucanotransferasa
- CE: Eficacia de complejación
- CI: Complejos de Inclusión
- CoA: Coactivadores

DTG: Diagramas de primera derivada
DFT: Teoría funcional de la densidad
DHT: Dihidrotestosterona
DBD: Dominio de unión a DNA
DHEA-S: Dehidroepiandrosterona sulfato
DHA: Dehidroepiandrosterona
DUT: Dutasterida
EMA: Agencia Europea del medicamento
ERA: Elementos de Respuesta a Andrógenos
FIN: Finasterida
FDA: Agencia Estadounidense Food & Drug Administration
FT-IR: Espectro de infrarrojo por transformada de fourier
GGN: Triplete de poliglicina
HPB: Hiperplasia Benigna de Próstata
Hsp: Chaperonas
IGF-1: Factor de crecimiento insulínico
IL6: Interleucina 6
IR: Absorción Infrarroja
JECFA: Comité conjunto de FAO/OMS de aditivos alimentarios
JPC: Código Farmacéutico Japonés
Kc: Constante de complejación
LDL: Lipoproteínas de baja densidad
LHRH: Hormona liberadora de hormona luteinizante
LH: Hormona Luteinizante

-
- LBD: Dominio de unión a ligando
MA: Ácido maslínico
MAPK: Proteín Kinasa Activada por Mitógeno
MX: Minoxidilo
M: Membrana lipófila
MR: Relación molar
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NTD: Dominio NH₂- terminal
NOE: Efecto Overhauser
NOESY: Efecto nuclear Overhauser
OA: Ácido oleanólico
PKA: Proteín Kuinasa dependiente de AMPc
PKC: Proteín Kinasa dependiente de Calmodulina
PEG: Polietilenglicol
Ph.Eur: Farmacopea Europea
RA: Receptor de Andrógenos
RAO: Retención Aguda de Orina
RFLP: Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción
RMN: Resonancia Magnética Nuclear
RMN-2D: Espectroscopía bidimensional de RMN
ROESY: Efecto rotacional Overhauser
SEM: Microscopía electrónica de barrido
SMD: Modelo de Solvatación basado en la Densidad
SNP: Single Nucleotide Polimorphism

S₀: Límite de solubilidad

SHBG: Globulina transportadora de hormonas sexuales

T: Testosterona

TF: Factores de transcripción

TGF β : Factor de crecimiento transformante β

UV: Ultravioleta-Visible

VNTR: Polimorfismos en el Número de Repeticiones en Tándem

UWL: Capa externa acuosa

3 β HSD: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ 4-5

5 α R: Enzima 5 α -reductasa

5 α R1: Enzima 5 α -reductasa tipo 1

5 α R2: Enzima 5 α -reductasa tipo 2

17 β -HSD: 17 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa

I-INTRODUCCIÓN

I - INTRODUCCIÓN

I.1. ALOPECIA

I.1.1. Alopecia androgénica masculina

La alopecia androgénica masculina (AGA), es uno de los desórdenes de pérdida de cabello más frecuente en hombres (X. Zhang y col, 2020). Está asociado a la interacción entre la predisposición genética y factores endocrinos (Hamilton, 1951) aunque el estrés y la mala alimentación son factores que también pueden afectar a la aparición temprana de la alopecia. Es una afectación poligénica, con distintos grados de severidad, distinta edad de aparición y distinta localización de la pérdida de cabello (Lolli y col, 2017).

Estudios realizados a la población masculina en tres rangos de edad demuestran que la edad es un factor muy influyente en la aparición de esta patología (Hamilton, 1951; Lopedota y col, 2018; Severi y col, 2003). Con el paso del tiempo aumenta la probabilidad de tener AGA, tal y como demuestran estudios en los que se observó que, los varones de 30 años presentaban una incidencia en AGA alrededor del 30%, los varones de 50 años sobre el 50% y los varones con edad superior a 70 años presentaban una incidencia del 80%. Estos estudios también demostraron que la raza es otro factor que influye en la aparición de AGA, teniendo una menor incidencia los individuos de raza china, japonesa y afroamericana que los de raza caucásica (Otberg y col, 2007).

Hay estudios que establecen las causas implicadas en la evolución de esta patología, como el llevado cabo por Hamilton en 1951 (Hamilton, 1951) en el cual hace referencia a la relación entre los factores genéticos, androgénicos y la edad. Sus resultados determinaron que los andrógenos eran requisitos fundamentales para el desarrollo de la enfermedad, ya que los hombres castrados antes de la pubertad no desarrollaban AGA, mientras que ésta podría manifestarse al inyectar testosterona (T) en hombres sometidos a un proceso de castración (Hamilton, 1951).

Por otro lado, estudios en gemelos homocigóticos, que comparten la misma información genética, demuestran el desarrollo de AGA en ambos casos por igual, lo cual induce a pensar que el desarrollo de esta patología viene condicionado por la genética. En esta línea, las investigaciones sobre sujetos dentro de una misma familia y comparados entre distintas familias, muestran un riesgo significativamente mayor de padecer AGA en hombres cuyo padre padecía la enfermedad, mientras que el riesgo disminuye significativamente con un padre sin calvicie. Del mismo modo que el riesgo de padecer AGA aumenta con un resultado positivo en los antecesores masculinos maternos (Chumlea y col, 2004). Todas estas aportaciones han contribuido a que autores como Küster y Happle hayan establecido un patrón poligenético de herencia más probable para padecer AGA (Küster & Happle, 1984).

El cabello tiene dos funciones bien definidas. La primera, de protección sobre la piel frente a radiaciones de ultravioleta-visible (UV) y agresiones ambientales; y la segunda, como aislante térmico del epitelio capilar. Por lo tanto, su función fisiológica es evidente, pero también tiene gran importancia a nivel social, tanto, que una disminución de su cantidad o incluso de su calidad, ya sea por causas fisiológicas o patológicas, trae consigo consecuencias psicológicas con un gran impacto en la autoestima del paciente y en su calidad de vida (Buffoli y col, 2014).

Debido al impacto psicosocial que conlleva la aparición de AGA en estos pacientes, los tratamientos para la recuperación del cabello son innumerables. En los últimos años, se ha producido un incremento en las investigaciones asociadas al vello corporal, tanto sobre su anatomía como fisiología y biología molecular, con el fin de desarrollar fórmulas efectivas para su tratamiento. Estas investigaciones proponen el desarrollo de nuevos sistemas de aplicación de fármacos para el tratamiento de la alopecia, enfocados a desarrollar reservorios que permitan una liberación controlada del fármaco, que permita aumentar la biodisponibilidad, la solubilidad, la intensidad o duración de la actividad terapéutica, la permeabilidad, la estabilidad físico-química o reducir las irritaciones asociadas a su administración (Jacob y col, 2018). La industria farmacéutica genera alternativas de diversa índole para el tratamiento de la alopecia, que van desde el uso de productos como

champús en el área cosmética, cápsulas en el área farmacéutica o implantes capilares, a nivel quirúrgico (Bunagan y col, 2013; Famenini & Goh, 2014; Floc'h y col, 2015).

I.1.2 Anatomía del folículo piloso

El folículo piloso es una invaginación tubular de la piel que nace en la epidermis hacia la hipodermis, y que da lugar a la formación del pelo. Su ciclo depende de la interacción entre las células madre epiteliales y mesenquimales, y los factores de crecimiento que las regulan (**Figura I.1**) (Rompolas & Greco, 2014).

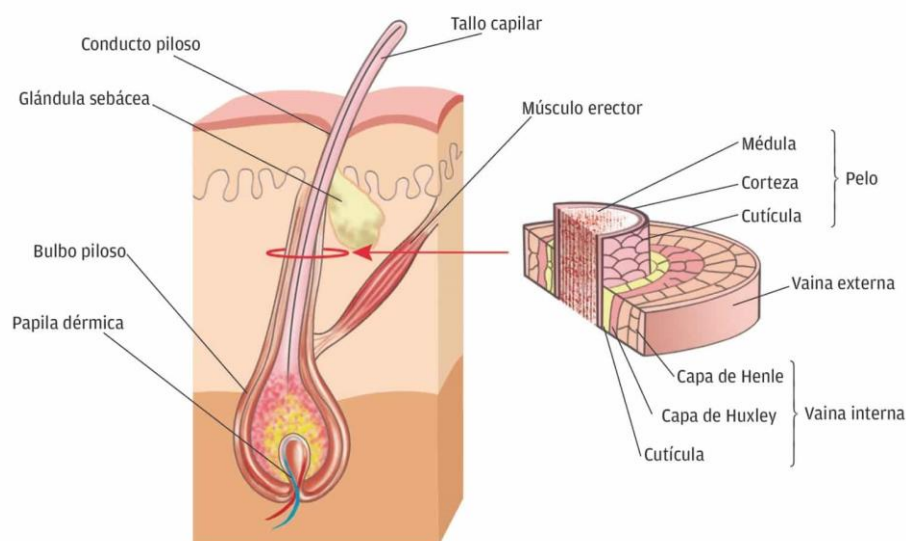


Figura I.1: Estructura del folículo piloso.

Tal y como se observa en la **Figura I.1**, la parte final de la invaginación recibe el nombre de bulbo piloso y alberga en su interior la papila dérmica. Ésta, se halla recubierta por estratos de células epiteliales (células de la matriz o germinales), responsables de la formación de la raíz del pelo. De esta división celular que forma

la raíz del pelo, se suceden las distintas capas del pelo (médula, corteza y cutícula, desde dentro hacia fuera) (**Figura I.1**) (C.-C. Yang & Cotsarelis, 2010). Las tres capas del pelo están constituidas por células queratinizadas. La capa más interna llamada médula, la forman células grandes con vacuolas citoplasmáticas susceptibles a la queratinización, aunque los pelos finos pueden prescindir de esta capa, tan solo es visible en pelos gruesos. La siguiente capa denominada corteza, que supone la mayor porción de la fibra del pelo, contiene células queratinizadas dispuestas de forma concéntrica y entre ellas se hallan dispuestas las células melánicas; a ella se debe la rigidez del pelo. Por último, la capa más externa denominada cutícula se encuentra formada por una sola capa de células queratinizadas que favorecen la interposición con las partes de la vaina radicular interna (**Figura I.1**). Esta parte del tallo del pelo da el aspecto visual y estético al pelo, además de ofrecer protección a la capa adyacente (la corteza) frente a las agresiones ambientales y maniobras cosméticas (Sinclair, 2007). Por otro lado, y de forma más externa, las células de la matriz en el folículo piloso, dan lugar a la formación de las vainas radiculares interna y externa (**Figura I.1**). La vaina radicular interna ocupa el espacio comprendido desde el bulbo hasta las glándulas sebáceas, y está compuesta por tres capas: cutícula, capa de Huxley y capa de Henle, desde dentro hacia fuera (**Figura I.1**) (Rishikaysh y col, 2014) y es la responsable de guiar el crecimiento piloso, ya que su estructura alrededor del tallo piloso imita un molde que lo soporta y lo moldea. Por último, la vaina radicular externa es la capa más superficial de toda la estructura. La parte superior de ésta es la que se continúa con el estrato basal de la epidermis y en ella se insertan el músculo piloerector y la glándula sebácea (Buffoli y col, 2014). Se encuentra rodeada por la vaina de tejido conectivo (células mesenquimales). Todo este conjunto, el folículo piloso, la glándula sebácea y el músculo piloerector, recibe el nombre de unidad pilo-sebácea, constituyendo un órgano de gran complejidad anatómica y funcional.

Para determinar los posibles factores que provocan el desarrollo de la AGA y establecer el tratamiento adecuado es necesario estudiar la estructura de este órgano y la dinámica del ciclo que regula el crecimiento de las fibras pilosas.

I.1.3 Ciclo del crecimiento piloso

El ciclo del pelo está integrado por tres etapas con distinta actividad celular (**Figura I.2**). La primera fase, llamada anágeno o anagen se caracteriza por ser una etapa de gran actividad en la división celular. Le sigue una segunda etapa de apoptosis celular de los elementos epiteliales llamada catágeno o catagen. Por último, hay una etapa de escasa actividad celular llamada telógeno o telogen, donde el folículo se prepara para iniciar de nuevo el siguiente ciclo (Krause & Foitzik, 2006).

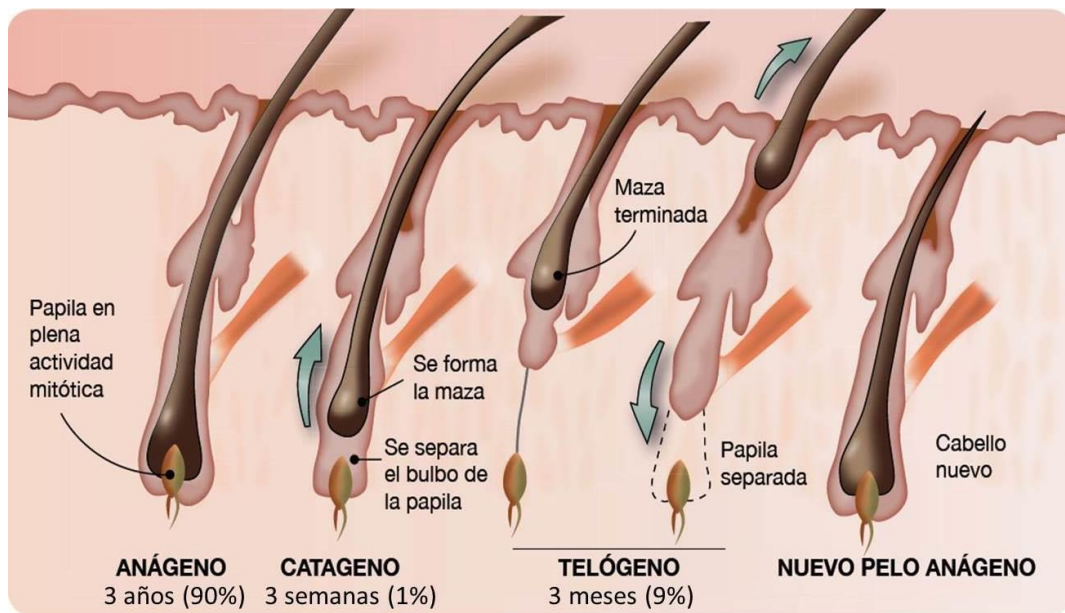


Figura I.2: Ciclo del crecimiento del pelo.

El anágeno o anagen es la fase más larga, suele durar entre 2 y 7 años. Es la responsable del crecimiento y del aspecto del cabello de los humanos. La duración de esta fase varía dependiendo de la zona en la que se encuentre el cabello, pudiendo durar años en los folículos pilosos del cuero cabelludo, y semanas en los folículos pilosos de las extremidades, lo cual condiciona directamente la distinta

longitud de los cabellos en las distintas partes corporales (Fernandez-Flores y col, 2019). En esta fase, el bulbo piloso concentra una gran actividad mitótica, responsable del crecimiento del tallo y además de una abundante producción de melanina, que determina la pigmentación del pelo terminal (Mei y col, 2019). Al ser la fase más larga, alrededor del 80% e incluso el 100% de los folículos pilosos se encuentran en un momento dado en fase anágena. Además, es la fase más susceptible a las alteraciones hormonales, a la presencia de fármacos y tóxicos de distinta índole (**Figura I.2**).

Tras la fase de anágeno le precede la de catágeno o catagen, donde se desarrolla una apoptosis masiva del segmento folicular (**Figura I.2**). Es la fase más corta del ciclo y trae consigo la involución aguda del folículo que disminuye, de forma evidente, su tamaño. Tan solo ocupa dos o tres semanas del ciclo, por lo que no más del 1 o el 2% de los folículos coinciden, en un momento dado, en esta fase (S. M. Kim y col, 2020). Esta etapa conduce a cambios en la morfología del folículo debido a que, la abundante actividad apoptótica y la ausencia de la mitótica y melánica, conducen al retraimiento del folículo. La membrana basal aparece engrosada, la vaina radicular interna desaparece y la externa produce grandes cantidades de queratina que rodea al folículo y le confieren un aspecto en forma de porra (Fernandez-Flores y col, 2019).

Finalmente, el ciclo se completa con la fase de telógeno o telogen, etapa en la que la actividad proliferativa es escasa (**Figura I.2**). Supone la fase final de la involución del folículo piloso, que se acorta a la mitad de su tamaño anterior (Fernandez-Flores y col, 2019). Esta retracción del segmento inferior del folículo deja tras de sí la llamada estela folicular, que es una cicatriz fibrosa del lugar donde se localizaba el folículo. No obstante, la estela folicular no es específica del telógeno ya que también es posible apreciarla como consecuencia de la miniaturización de los folículos pilosos sensibles a andrógenos. Esta fase dura prácticamente cien días, por lo que entre el 10 y el 20% de los folículos se encuentran en este estadio en un momento concreto.

Tras esta fase de telógeno se produce la pérdida del pelo que recibe el nombre de fase de exógeno (Rebora & Guarrera, 2004). Es un proceso activo y regulado por mecanismos proteolíticos que consiguen romper las uniones presentes en el bulbo y la vaina radicular externa. Después de la fase de exógeno se sucede un intervalo de tiempo en el que el folículo piloso queda vacío, hasta que se inicia de nuevo la fase de anágeno (**Figura I.2**). Este intervalo de tiempo se conoce como fase de kenógeno o kenogen y se ve incrementado en hombres y mujeres con alopecia androgénica.

I.1.4 Etiología y desarrollo de AGA

En los pacientes que padecen AGA, la pérdida de cabello es progresiva y deriva de una alteración en la dinámica del ciclo de crecimiento piloso, donde la duración de la fase anágeno disminuye progresivamente y aumenta la duración de la fase telógeno. De forma general, se produce una disminución del tamaño de los folículos pilosos hasta que, finalmente, las membranas del cuero cabelludo se tornan rígidas, por lo tanto, la estructura folicular recibe menos irrigación sanguínea y los cabellos nuevos son más débiles y finos de lo normal. Al final del proceso, los folículos se atrofian y el cabello que se cae no es reemplazado por otro nuevo (Yi, 2017).

En 1951, James Hamilton realizó un estudio sobre la calvicie en 328 hombres, del cual obtuvo una clasificación de patrones de AGA que, posteriormente, fue mejorada 1975 por Norwood (Norwood, 1975). En dicha clasificación se describió un patrón de calvicie para 7 tipos diferentes. Esta escala de calvicie de Hamilton-Norwood es la que se sigue utilizando en la actualidad (Cabello, 2006) (**Figura I.3**):

Tipo I: la pérdida del pelo se localiza en la zona frontal de la cabeza. En esta etapa, la caída del cabello es difícil de apreciar ya que es mínima. Normalmente en este estado, los tratamientos tienen gran efectividad.

Tipo II: la pérdida del cabello se localiza en la zona frontal y temporal, apareciendo las características entradas. En esta etapa se nota, con más claridad, la caída del cabello y el tratamiento también es efectivo.

Tipo III: se produce una caída suficiente del cabello para ser considerado como calvicie. Se presentan recesiones fronto-temporales, generalmente simétricas, sin cabello o con poca cantidad. Estas recesiones se extienden hacia la parte posterior, generalmente, unos 2 cm más que en el tipo II. El tipo III que se localiza en la coronilla es más frecuente en edades más avanzadas. En este tipo hay poca pérdida de cabello frontal y la pérdida de cabello se localiza sobre todo en la coronilla.

Tipo IV: La pérdida del cabello se localiza a nivel frontal y fronto-temporal, siendo más acusada que en el tipo III y se observa escasez o ausencia de cabello en la coronilla. Las áreas de recesión se encuentran separadas entre sí por una franja de cabello moderadamente denso que se extiende a través de la parte superior del cuero cabelludo. Esta franja une las dos zonas de cabello poblado a ambos lados de la cabeza.

Tipo V: La zona de calvicie se da en la coronilla, la cual sigue estando separada de la zona de calvicie fronto-temporal, pero de manera menos evidente que en el tipo IV ya que esta franja de cabello que separa las dos zonas de calvicie se ha estrechado y el cabello se ha vuelto más escaso. Las áreas de calvicie de la coronilla y de la región fronto-temporal han aumentado de tamaño.

Tipo VI: se unen las dos zonas de calvicie, tanto las entradas como la coronilla al desaparecer la franja de cabello que las separaba, convirtiéndose en una sola. Además, el tamaño de la zona de alopecia ha aumentado lateral y posteriormente.

Tipo VII: Esta es la forma más avanzada de calvicie de patrón masculino. La única zona que sigue teniendo pelo es desde la zona de las orejas hacia la parte posterior del cuero cabelludo y el cuello, formando una forma de herradura. Este cabello no es denso y con frecuencia también es fino. También es escaso en la nuca y en un semicírculo por encima de las orejas (Ludwig, 1977).

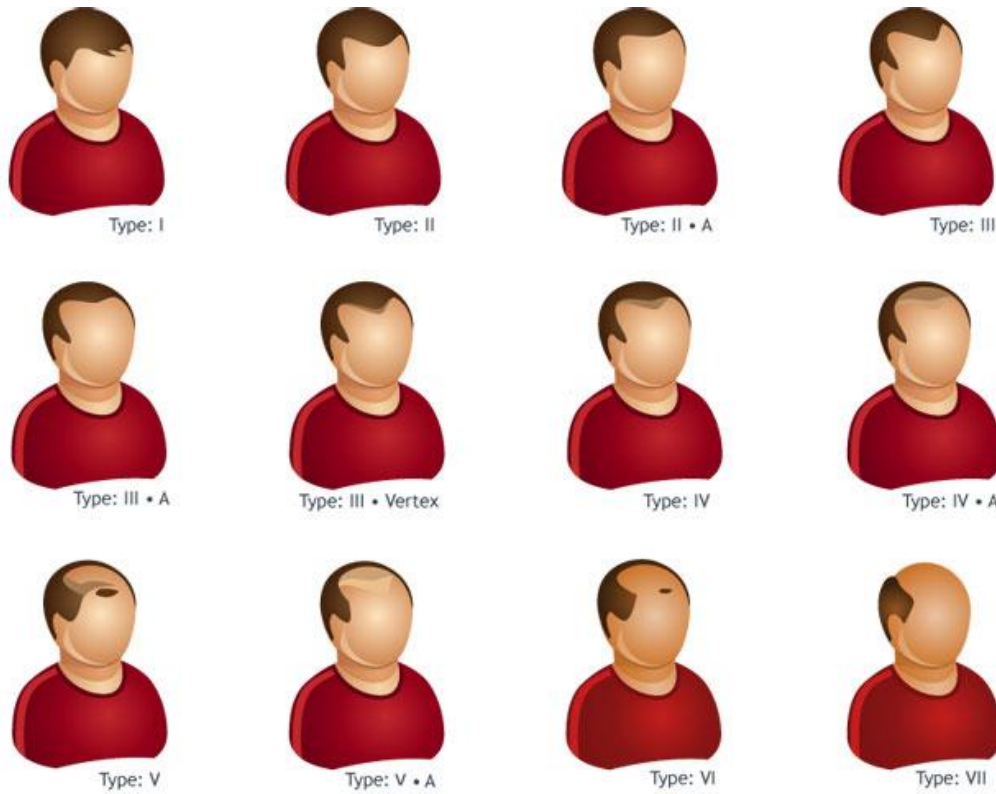


Figura I.3: Clasificación de la alopecia según escala Hamilton-Norwood.

Fuente (Aston, 2011).

I.1.5 Factores de desarrollo de AGA

El desarrollo de AGA está condicionado por la interacción entre factores genéticos y endocrinos (androgénicos) (Hamilton, 1951), además de estar asociado a factores como la edad, la raza, el estrés y la alimentación.

I.1.5.1 Factores genéticos

El ADN contiene la información genética proveniente de los progenitores, en la que se describe el fenotipo de rasgos físicos y conductuales de cada individuo,

así como de la probabilidad de padecer ciertas enfermedades (Venter y col, 2001). La amplia diversidad fenotípica entre individuos de la misma especie, es atribuida a los polimorfismos genéticos, es decir, las múltiples formas en que se recombina la información genética contenida en los alelos de los cromosomas. Dichos polimorfismos pueden ocurrir en regiones del genoma codificantes para proteínas, o en zonas no codificantes con mera función estructural o reguladora (Karki y col, 2015). En el primer caso, cuando el polimorfismo se da en los exones, tiene consecuencias fenotípicas y puede ocurrir que desencadene un proceso patológico conocido como enfermedad genética. En el segundo caso, cuando el polimorfismo se da en regiones reguladoras y en los intrones, aunque son zonas que no codifican proteínas, en función del papel que ejerzan, podrían influir en la expresión de una determinada proteína, originando así una alteración funcional. Cuando dichos polimorfismos se dan en un único nucleótido, se conoce como SNP (Single Nucleotide Polimorphism), y a ellos se debe la mayor parte de la diversidad del genoma humano. Aunque la mayoría no son responsables directos de enfermedades, a menudo se localizan próximos a mutaciones o a polimorfismos patológicos, por lo que se convierten en útiles marcadores genéticos para la detección precoz de ciertas enfermedades. En general, estas variaciones suceden de forma espontánea o incluso influidas por factores ambientales, a través de mecanismos moleculares como: recombinación homóloga, segregación de cromosomas, mutaciones, duplicaciones y transposiciones. Para detectarlos se usan técnicas como el análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y de los polimorfismos en el número de repeticiones en tándem (VNTR), ambas técnicas permiten una detección rápida y sencilla (Harding, 1992). Estas técnicas usadas para la detección de polimorfismos sin efecto fenotípico, se utilizan en el seguimiento de la herencia de determinados alelos, pudiendo establecer relaciones familiares de utilidad en la investigación en ámbitos sociales, así como en clínica en la identificación de biopsias, trasplantes, etc. Finalmente, la detección de aquellos polimorfismos con efecto fenotípico patológico es de gran interés en el diagnóstico de enfermedades, así como para establecer el mecanismo molecular que traza su desarrollo.

Cabe señalar que, aunque existan variaciones en elADN, no siempre manifestarán enfermedades. Hay enfermedades que se manifiestan bajo una combinación de variaciones determinadas, lo cual recibe el nombre de haplotipo, y esto implica que, si solo aparece una parte de la variación, la enfermedad no se manifiesta (X. Zhang y col, 2020). Sin embargo, hay otras patologías relacionadas con una serie de variaciones, y que simplemente apareciendo algunas de ellas, implica la evolución de la enfermedad. En estos casos, la evolución del evento no está condicionada por la presencia de todas las variaciones, y puede que, ni siquiera la aparición de todas ellas implique la manifestación de la enfermedad. Por tanto, hablamos de probabilidades de riesgo asociadas a la patología que determinan la manifestación de la enfermedad, puesto que la presencia de variaciones no implica necesariamente su manifestación, aunque aumente su probabilidad de riesgo.

AGA cuenta con 25 variaciones reconocidas asociadas a probabilidades de riesgo, por tanto, es una enfermedad asociada a una herencia genética y que sigue un modelo poligénico, dada su alta prevalencia y amplia variedad de fenotipos. De estas 25 variaciones asociadas a la manifestación de AGA se recogen las más significativas con probabilidad más alta en la **Tabla I.1** (Li y col, 2012).

Dada la importancia en la patogénesis de AGA, los estudios genéticos más destacados en AGA giran en torno a la variabilidad funcional del receptor androgénico (AR). Distintos estudios han identificado dos polimorfismos del gen que codifica AR, que son: el triplete de poliglutamina (CAG) y el triplete de poliglicina (GGN). Se observó que los pacientes con AGA tenían repeticiones más cortas de CAG y de GGN, pudiendo afectar al reconocimiento de los andrógenos en los folículos pilosos y glándulas sebáceas, e incluso se relacionó la presencia de las repeticiones cortas de GGN con la mutación que condiciona el desarrollo de AGA o del alelo responsable de la predisposición de padecer AGA (Hillmer y col, 2005; Sawaya & Shalita, 1998).

Tabla I.1: Genes y sus variaciones más importantes implicados en AGA, identificadas en las bases de datos genómicas: ncbi, genecard, ensembl y snpedia.

GEN	SNP	Referencia/variación	Ods Ratio	Probabilidad
TAR DNA-Binding Protein (TARDBP)	Rs12565727	A/G	1.33	9.07X10 ⁻¹¹
Histone Deacetylase 4 (HDAC4)	Rs9287638	C/A	1.31	1.01X10 ⁻¹²
Histone Deacetylase 9 (HDAC9)	Rs2073963	T/G	1.29	1.08x10 ⁻¹²
AUTISM SUSCEPTIBILITY CANDIDATE 2 AUTS2 (FBRSL2)	Rs6945541	C/T	1.27	1.71x10 ⁻⁹
SPPL2C: Signal Peptide Peptidase Like 2C MAPT: Antisense RNA 1 17q21.31 (MAPT-AS1, SPPL2C)	Rs12373124	T/G/A/C	1.33	5.07X10 ⁻¹⁰
Set Binding Protein 1 (SETBP1)	Rs10502861	C/T	1.28	2.62X10 ⁻⁹
FORKHEAD BOX A2 PAX1, (FOXA2)	Rs6047844	T/C	1.60	1.71X10 ⁻³⁹
Androgen Receptor (AR)	Rs2497938	T/C	2.20	2.40X10 ⁻⁹¹

SNP, polimorfismo de un nucleótido simple; referencia/variación, son las pares de bases que aparecen alteradas respecto a la de referencia, Odds Ratio, medida estadística que mide el riesgo de que una enfermedad se manifieste x veces más en personas que presentan el alelo de riesgo respecto de las personas sanas; Probabilidad, el OR es transformado en % a través de la siguiente ecuación. $P = \frac{OR}{OR+1} \times 100$.

Otro polimorfismo claramente identificado es el polimorfismo de Stul. Su presencia se relacionó de forma lineal con una disfunción en la actividad de AR y con el riesgo de desarrollar AGA (Brockschmidt y col, 2010; Cobb y col, 2009; Ellis y col, 2007). Estudios en el genoma de AR permitieron identificar el alelo AR-E211 A que se asoció con un menor riesgo de alopecia, mientras que la variación del gen del receptor EDA2R, conlleva una mayor susceptibilidad de padecer AGA (Cobb y col, 2009).

Actualmente, las investigaciones en el campo de la genómica no cesan ya que aportan información de gran interés en el conocimiento acerca de la patogénesis de la enfermedad, lo que conduce a diagnósticos cada vez más precoces que permiten actuar tanto en la prevención de la enfermedad como en el diseño de tratamientos farmacológicos dirigidos.

1.1.5.2 Factores androgénicos

Los andrógenos están implicados en distintas funciones de la piel, como son: crecimiento y diferenciación de las glándulas sebáceas, crecimiento de vello e incluso la curación de heridas a través de la vía de señalización intracelular (S. M. Kim y col, 2020). Aunque el crecimiento del cabello también está condicionado por las hormonas tiroideas y glucocorticoides (Bodó y col, 2010), los andrógenos son los principales responsables en este proceso, pudiendo estimular, dejar inalterado o incluso inhibir el crecimiento del pelo dependiendo de su ubicación corporal. Estas hormonas tienen la capacidad de agrandar los folículos capilares en áreas andrógeno-dependientes (barba, axilas y pubis), pero, paradójicamente, suprimen el crecimiento piloso en los folículos del cuero cabelludo de los hombres susceptibles de AGA, promoviendo la miniaturización y acortamiento del pelo en la fase anágeno. Esto puede explicarse mediante la expresión génica que condiciona la respuesta a los andrógenos en distintas áreas del cuerpo (Yi, 2017).

I.1.5.2.1 Metabolismo de testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT)

Los andrógenos son las hormonas sexuales masculinas de estructura esteroidea, y se caracterizan por ser los responsables del fenotipo característico masculino. Están implicados en el desarrollo del órgano reproductor masculino durante la embriogénesis, así como en la evolución fisiológica que sucede durante la maduración sexual en la pubertad y en la vejez (Heemers & Tindall, 2007).

La T es el principal andrógeno masculino que se forma a partir del colesterol (Hu y col, 2010) y se metaboliza a su forma más activa, DHT, por acción de la enzima 5- α -reductasa (5 α R) (**Figura I.4**). Entre el 90 y el 95% de los andrógenos son producidos por las células de Leydig en los testículos (Chung y col, 2020), sobre todo T, DHT y androstenediona, siendo la T producida en mayor concentración (95% de la T plasmática). También son sintetizados, pero en mucha menor proporción, en los ovarios y en la corteza suprarrenal. Las células de Leydig obtienen colesterol plasmático a partir de los ésteres de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Este colesterol es transformado en pregnenolona a través de la enzima citocromo P450_{scc}/Cyp11A1 en el interior de la mitocondria y, posteriormente, es transportado al retículo endoplasmático liso donde tiene lugar, a través del complejo enzimático 3- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ 4-5 (3 β HSD), la transformación de pregnenolona en progesterona, sucediéndose después el resto de la esteroidogénesis (Sanderson, 2006). La T es metabolizada en metabolitos activos como la DHT, a través de la enzima 5 α R y ésta en 3 α ó 3 β dioles (**Figura I.4**). Por último, estos dioles se metabolizan en el producto final del metabolismo de la T como trioles, compuestos con elevada solubilidad acuosa y que carecen de actividad androgénica y de capacidad para revertirse en la forma activa DHT (**Figura I.4**). Además de esta ruta, la T se metaboliza para convertirse en estradiol por la ruta de la aromatasa, resultando en la formación de estrógenos, que son las hormonas sexuales femeninas.

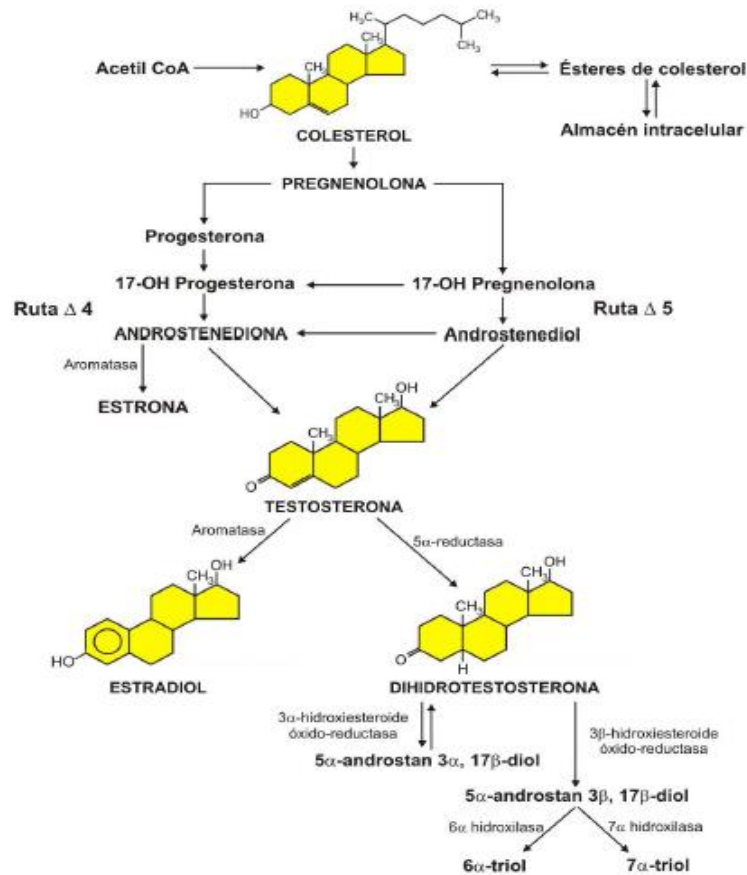


Figura I.4: Metabolismo androgénico en los testículos. Implicadas dos rutas $\Delta 4$ -5 que supone la vía mayoritaria una respecto a la otra, dependiendo de la especie. En humanos la ruta por excelencia es la $\Delta 5$, mientras que en roedores es la $\Delta 4$.

En general, la síntesis androgénica en las células de Leydig está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, donde el hipotálamo libera la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), que estimula la secreción de hormona luteinizante (LH) en la adenohipófisis, responsable del estímulo sobre las células de Leydig de la síntesis de T (Chung y col, 2020). La LH es el mensajero primario

que interacciona con una proteína G transmembrana, provocando el aumento de la concentración de AMPc (segundo mensajero) y éste, activa a la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) que fosforilará proteínas transportadoras de colesterol al interior de la mitocondria (proteína StAR) (Stocco y col, 2005). Esta es la principal cascada de señalización que se lleva a cabo en los distintos tejidos esteroideogénicos, donde ocurre la fosforilación de factores de transcripción asociados a la activación de genes que codifican para la síntesis de proteínas implicadas en la ruta esteroideogénica, además de la fosforilación sobre proteínas StAR.

La evidencia científica demuestra la participación en esta ruta de otras cascadas de señalización activadas también por hormonas, factores de crecimiento e incluso por factores derivados de macrófagos, que actúan a través de PKA o incluso de otras vías independientes de AMPc, como son la proteína quinasa dependiente de calmodulina (PKC), o de iones cloruro y calcio, o a través de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), entre otras (Stocco y col, 2005). No obstante, su respuesta no suele ser tan potente como la resultante de la vía AMPc/PKA, por ello se cree que su efecto es sinérgico con la respuesta de la ruta de PKA, bien como moduladores o como potenciadores.

Finalmente, liberada de la célula, la T alcanza el torrente circulatorio y se distribuye por el organismo hasta alcanzar sus órganos diana, donde ejercerá su función. Viaja por la sangre en forma libre o unida a proteínas plasmáticas, como puede ser la albúmina o la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG). La actividad biológica de T y DHT, viene condicionada por la presencia del RA. Su reconocimiento específico provoca un cambio conformacional en el receptor que desencadena una cascada de señalización intracelular, permitiendo la transcripción y traducción de regiones del ADN que codifican para proteínas con función biológica.

I.1.5.2.2 Receptor de andrógenos (RA)

El RA es la proteína que condiciona el desarrollo y evolución de distintos eventos ocurridos en el hombre, tales como el desarrollo sexual en la pubertad, la regulación de la calvicie, o el desarrollo de posibles patologías como la hiperplasia benigna de próstata (HPB) o el cáncer prostático (Heemers & Tindall, 2007). Por ello, conocer su estructura y mecanismo de acción es vital en cualquier acción terapéutica.

En su forma activa, la estructura del RA es un dímero que se divide estructuralmente en cuatro dominios funcionales (Heemers & Tindall, 2007):

- Dominio NH₂- terminal (NTD): es el más variable en su secuencia, así como en su longitud y es el encargado de activar la transcripción.
- Dominio de unión a DNA (DBD): es la región más conservada de los receptores nucleares y se ubica en la parte central de la proteína. Está formado por 9 residuos de cisteína, 8 de los cuales forman la estructura conocida como dedos de zinc (4 cisteínas unidas a un ión Zn⁺²), cuya actividad es reconocer secuencias consenso de DNA.
- Dominio de unión al ligando (LBD): que se ocupa de la dimerización y activación de la transcripción, ya que interactúa con el dominio NTD y regula la interacción entre el RA y las chaperonas (Hsp) con el fin de estabilizar la unión del andrógeno.
- Dominio región bisagra: no conservado y flexible que une los dominios LBD y DBD, y participa de la regulación en la unión al ADN, la translocación nuclear y la transactivación del RA.

En las células de la papila dérmica, el efecto de los andrógenos viene condicionado por su biodisponibilidad. Los andrógenos alcanzan las unidades pilosebáceas desde el torrente sanguíneo recorriendo la piel a través de la circulación capilar y se transportan por difusión pasiva al citoplasma celular, donde tiene lugar la biotransformación de la T en DHT mediante la acción de la enzima 5 α R (**Figura I.5**).

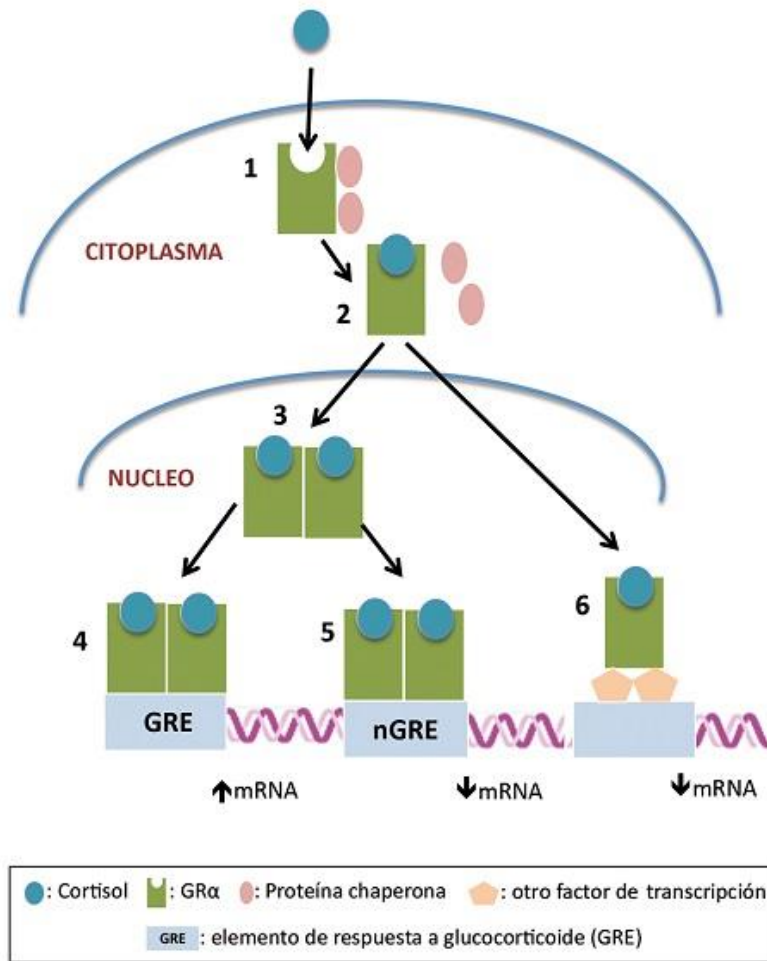


Figura I.5: Unión de los andrógenos al RA, translocación al núcleo del complejo andrógeno-receptor donde se une a ERA dando inicio a la transcripción del ARNm y posterior traducción de proteínas con acción biológica.

En el citoplasma el RA se encuentra inactivo por la unión de los monómeros que lo forman a las chaperonas (Hps 90, Hps 70, Hps 56, p23), impidiendo la transcripción e induciendo una conformación de alta afinidad para el ligando con el receptor (Weigel & Moore, 2007). Cuando T o DHT se unen al receptor, éste sufre

un cambio conformacional que provoca la disociación de las chaperonas y la fosforilación del RA, desencadenando la translocación al núcleo celular. En el núcleo, el RA dimeriza y se une al ADN a través de los elementos de respuesta a andrógenos (ERA), iniciando la transcripción del ARNm y la posterior síntesis de proteínas en los ribosomas.

Además de su unión específica al andrógeno, el RA interacciona con coactivadores (CoA) o factores de transcripción (TF) que colaboran en la modulación de su actividad (Weigel & Moore, 2007). La estabilidad del receptor viene determinada por la fosforilación, ya que se ha visto que su fosforilación o la de sus CoA, en la que participan el factor de crecimiento transformante β (TGF β), el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y la interleucina 6 (IL6), provocan un aumento en la actividad del RA (Rishikaysh y col, 2014).

En definitiva, el RA media los efectos biológicos de los andrógenos en las células permitiendo el desarrollo normal y fisiológico de aquellos órganos regulados por andrógenos, ya que condiciona la expresión de ciertos genes que codifican proteínas ERAs que el RA reconocerá y regulará la síntesis de proteínas con actividad biológica. Del mismo modo, el RA estará implicado en el desarrollo y evolución de ciertos procesos patológicos, cuando su mecanismo de acción o cualquiera de los procesos que lo regulan, se vea alterado, conduciendo a una respuesta patológica.

I.1.5.2.3 Andrógenos en las células papilares dérmicas (CPDs)

El descubrimiento de elevadas cantidades de RA en los folículos pilosos de cueros cabelludos con calvicie, refuerza la teoría propuesta por Randall y col, 1992, que sugiere que los andrógenos se dirigen a su diana de acción en las células epiteliales del folículo piloso a través de la papila dérmica, estimulando algunos folículos capilares (como la barba), e inhibiendo a otros, alterando la producción de los factores reguladores (Hibberts y col, 1998). Esta comunicación entre la papila dérmica y las células del folículo piloso es resultado de la secreción de factores de crecimiento y factores de la matriz extracelular de la papila dérmica (Rishikaysh y

col, 2014) que ejercen un efecto autocrino sobre la propia papila y un efecto paracrino sobre las células epiteliales del folículo (Zouboulis, 2009).

Aquellos hombres con AGA que tienen niveles androgénicos normales ven incrementada, de forma local, los niveles de Ty DHT (Poór y col, 2002). En la piel existe un conjunto de enzimas capaces de sintetizar los andrógenos que actúan de forma autocrina o paracrina (Zouboulis, 2009). La formación autónoma de los andrógenos permite a este órgano ajustar sus niveles, de acuerdo a las necesidades locales, lo cual conduce a diferentes respuestas en los folículos capilares.

En la piel el AR se encuentra en los queratinocitos epidérmicos y foliculares, sebocitos, células de las glándulas sudoríparas, CPDs, fibroblastos dérmicos, células endoteliales y melanocitos genitales (Lolli y col, 2017). Las CPDs tienen un papel especialmente señalado respecto a la actividad androgénica (C.-C. Yang & Cotsarelis, 2010), y es que los folículos pilosos del cuero cabelludo de personas con calvicie contienen significativamente más AR que los folículos pilosos de aquellos que no padecen AGA (Hibberts y col, 1998). Un estudio de esta década demostró que la metilación en el ADN del promotor de AR está incrementada en los folículos pilosos del cuero cabelludo en la parte occipital en comparación con AGA del cuero cabelludo en vértice (Cobb y col, 2009). Este incremento en la metilación, resulta en una reducción de la expresión de AR que puede proteger al cabello occipital de la miniaturización y pérdida del cabello. El crecimiento piloso, en respuesta a la estimulación androgénica, dibuja patrones distintos de calvicie, asociados a la participación de distintos co-reguladores específicos de tejido dependientes de AR, un ejemplo de ello es Hic-5/ARA55, TGF- β 1-inducible, es un co-activador altamente expresado en CPDs de sitios sensibles a los andrógenos como AGA y barba (Inui y col, 2007).

El metabolismo androgénico en las unidades pilosebáceas comienza con la desulfatación de la dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S) a dehidroepiandrosterona (DHEA) por la acción de la enzima esteroide sulfato sintasa en la papila dérmica. Posteriormente, la enzima isomerasa (3β -HSD) tipo 1 convierte DHEA en androstenediona en las glándulas sebáceas y en la papila

dérmica (Fritsch y col, 2001), y ésta se convierte en testosterona por la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD). En las glándulas sebáceas humanas existe toda la maquinaria celular necesaria para la transcripción génica de la enzima 17 β -HSD en todas sus isoformas, desde la 1 a la 5 (Fritsch y col, 2001; Hoppe y col, 2006). Las isoformas 1, 3 y 5 están implicadas en la formación de los andrógenos más activos, mientras que la reacción oxidativa catalizada por los tipos 2 y 4 los inactiva, lo cual sustenta la posible implicación de las glándulas sebáceas en la regulación del metabolismo androgénico (Fritsch y col,, 2001) (**Figura I.6**).

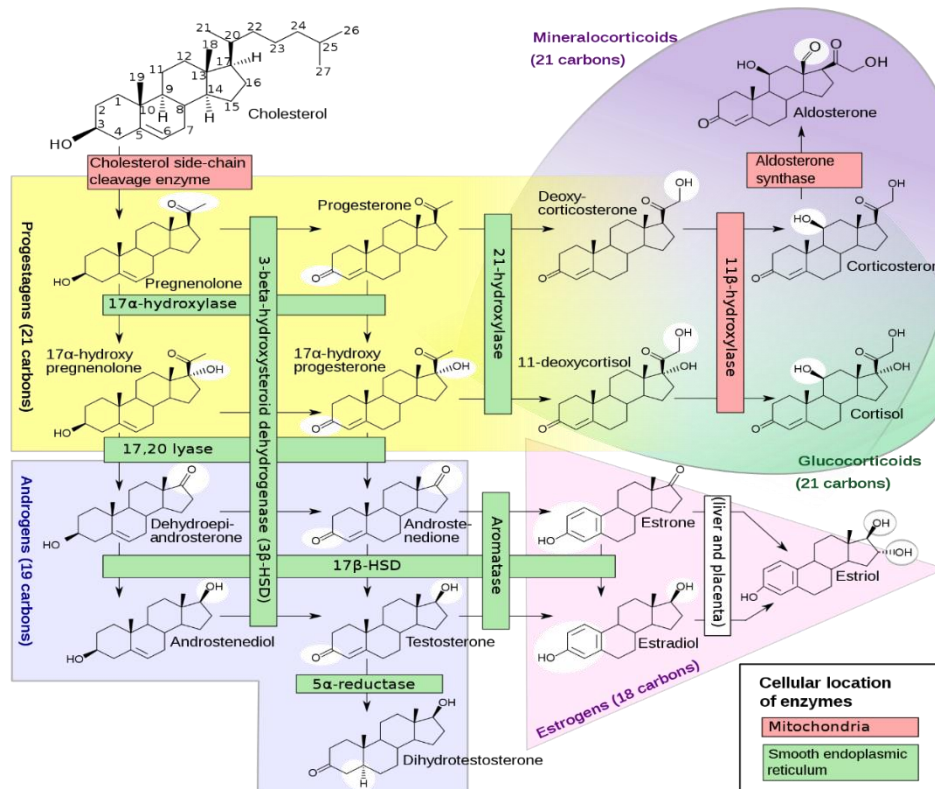


Figura I.6: Metabolismo androgénico en tejidos extragonadales.

Alternativamente, DHEA se puede convertir en androstenediol y testosterona por 17β -HSD y 3β -HSD, respectivamente, en la unidad pilosebácea.

Dos isoenzimas 5α R, tipo I (5α R1) y tipo II (5α R2), convierten irreversiblemente la testosterona en DHT. La 5α R1 es detectada en varios órganos independientes de andrógenos, como hígado y cerebro, mientras que la 5α R2 aparece predominantemente en órganos dependientes de andrógenos como epidídimo y próstata (Aggarwal y col, 2010). Estudios realizados por Inui y col, demostraron que la expresión de 5α R2 es mayor en CPDs de AGA y barba que en CPDs de otras ubicaciones corporales (Asada y col, 2001). Una vez formados, la T y la DHT pueden ser eliminados por conversión de nuevo a andrógenos débiles, 17-cetosteroides (metabolitos de la degradación de andrógenos) o pueden metabolizarse a estrógenos a través de las enzimas aromatasa y citocromo P450. La actividad de la aromatasa es detectable en los folículos pilosos (Sawaya & Shalita, 1998). Su expresión en la vaina de la raíz externa de los folículos capilares terminales en la fase anagen y en las glándulas sebáceas, sugiere un sistema de equilibrio local para andrógenos y estrógenos y que los folículos pilosos funcionan como blancos y fuentes de estrógenos. La concentración androgénica está estrechamente relacionada con la expresión de las enzimas responsables de su síntesis en cada tipo celular, así, las glándulas sebáceas y las sudoríparas son las principales productoras (Lolli y col, 2017). Por ejemplo, cambios en la expresión o en la actividad 5α R1 y 5α R2 puede aumentar la transformación de T en DHT en el folículo piloso (Sawaya & Price, 1997). Los folículos dependientes de andrógenos requieren de AR para provocar la respuesta celular, así se observa en ausencia de pelo corporal en adultos con insensibilidad androgénica (Lolli y col, 2017). Por el contrario, las necesidades de 5α R varían con el sitio del folículo. Individuos con deficiencia en 5α R2 sólo producen patrones femeninos de crecimiento de vello púbico y axilar, a pesar de la masculinización de su forma corporal (Lolli y col, 2017), sugiriendo que la DHT es necesaria para los folículos masculinos específicos en barba, pecho y diamante púbico superior, mientras que la testosterona puede estimular la axila y reducir los folículos del triángulo púbico característico de las mujeres.

No está claro por qué algunos folículos necesitan DHT, y otros, T para estimular el mismo tipo celular, aunque es probable que las células utilicen distintas proteínas co-activadoras intracelulares. Esta parece ser otra paradoja de la acción androgénica, presumiblemente debida a la distinta expresión génica en cada folículo.

I.1.6 Compuestos con actividad frente a la alopecia androgénica masculina

La terapéutica de AGA incluye alternativas de diversa índole en aplicaciones tópicas, orales o incluso a nivel quirúrgico, como es el trasplante capilar.

A nivel tópico, en el área de la cosmética, coexisten el uso de champús y lociones enriquecidas en antioxidantes (biotina, piridoxina, vitamina C), minerales (hierro y zinc), aminoácidos (L-cistina, metionina, taurina), ácidos grasos (omega 3 y 6) y hormonas endógenas como la melatonina, o fitoesteroles como la soja (Famenini & Goh, 2014; Floc'h y col, 2015). Todos ellos contribuyen a aumentar el grosor del pelo, disminuyen la seborrea o incluso limitan la caída del pelo. Estos mismos compuestos, aparecen formulados en cápsulas y comprimidos para la vía oral, ejerciendo su acción sistémica y son clasificados como complementos alimenticios. Son usados cuando la alopecia se asocia al cambio estacional o situaciones puntuales de estrés. No obstante, cuando la alopecia está relacionada con factores hormonales donde la pérdida capilar es irreversible, es preciso el tratamiento farmacológico donde el objetivo es evitar el proceso de miniaturización del folículo piloso, incluso revertirlo. En este sentido, disponemos de dos líneas de acción, los inhibidores de la 5 α R y los vasodilatadores con acción antialopéica (Lolli y col, 2017).

Cuando la alopecia se encuentra en un estado avanzado, a partir del grado III/IV de la escala de Hamilton-Norwood, la alternativa es el trasplante capilar que ofrece resultados estéticos (Bunagan y col, 2013). Aunque en AGA el tratamiento de elección es el farmacológico y, alternativamente, el quirúrgico, es frecuente la asociación de estas dos alternativas con el uso de tratamientos cosméticos comentados anteriormente.

I.1.6.1 Inhibidores de la 5 α R

La 5 α R es la enzima responsable de la transformación periférica de T en DHT y, de forma general, ésta acumulación de DHT es la responsable de la pérdida de cabello en AGA. Por tanto, una diana farmacológica en AGA es inhibir la acción catalizadora de esta enzima (**Figura I.7**). Actualmente existen dos fármacos autorizados con este mecanismo de acción: finasterida (FIN) y dutasterida (DUT) (York y col, 2020).

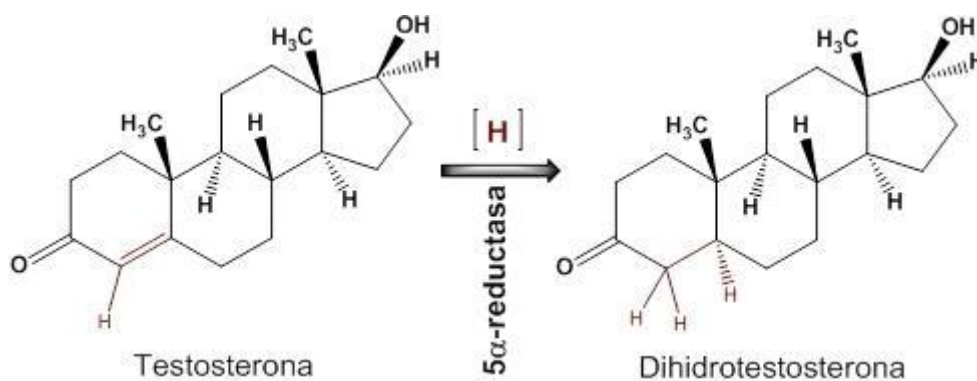



Figura I.7: Diana de acción de los inhibidores de la 5 α R.

La estructura de la 5 α R ha sido ampliamente estudiada, con el fin de sintetizar potenciales inhibidores de su actividad. Su catálisis enzimática está mediada por NADPH (Holland y col, 1989). El mecanismo de acción por el que T se reduce a DHT mediante la acción de 5 α R incluye la formación de un complejo binario entre la enzima y el NADPH, seguido de la formación de un complejo ternario con el sustrato (T). Se forma un carbocatión (átomo de carbono cargado positivamente) debido a la activación del sistema enona () por un residuo electrófilo (E⁺) del sitio activo de la enzima. El enolato de DHT (aniones orgánicos derivados de la desprotonación de compuestos carbonílicos) se forma por la transferencia directa de hidruros desde el NADPH a la zona alfa del carbocatión, que conduce a una reducción selectiva en C-5. Este enolato (que está coordinado

con el NADP⁺ en el área alfa), es atacado por un protón en el área beta, en C-4, produciendo el complejo ternario E-NADP⁺-DHT. Tras la salida de DHT se crea el complejo binario enzima-NADP⁺ y finalmente la liberación de NADP⁺ deja la enzima libre para otros ciclos catalíticos.

De acuerdo con el mecanismo cinético de la enzima (**Figura I.8**), se han diseñado tres tipos de inhibidores:

Tipo A: competitivos con el cofactor (NADPH) y con el sustrato (T) y por tanto interactúan con la enzima libre.

Tipo B: competitivos con el sustrato y que encajan con el complejo de NADPH.

Tipo C: se ajusta al complejo de enzima-NADP⁺ que exhibe un mecanismo no competitivo con el sustrato (Björkhem, 1969; X. Li y col, 1995).

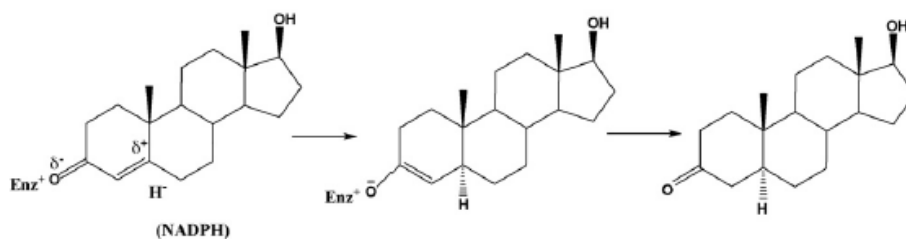


Figura I.8: Mecanismo de acción de la enzima 5αR.

Los primeros inhibidores de la enzima sintetizados fueron diseñados modificando la estructura de los sustratos naturales (T y DHT), mediante la sustitución de un átomo de nitrógeno en distintas posiciones en la estructura esteroidea, dando lugar a la formación de los azasteroides (Aggarwal y col, 2010). En función de la posición que ocupa el nitrógeno en la estructura del núcleo esteroideal, los nuevos azasteroides tienen o no actividad inhibitoria sobre la enzima en sus distintas isoformas.

FIN y DUT son análogos sintéticos de la T que actúan como antagonistas competitivos de los RA, es decir, compiten con la T por la unión al receptor (Aggarwal y col, 2010). Pertenecen al grupo de los 4-azasteroides ya que el nitrógeno ocupa la posición 4 de la estructura y han sido los más estudiados y aplicados en clínica por ofrecer los mejores resultados en cuanto a actividad y toxicidad.

A partir de los estudios llevados a cabo en 1973 por Voigt y col. (Voigt y col, 1970; Voigt & Hsia, 1973), se establecieron los requisitos estructurales que condicionan la actividad inhibitoria sobre la 5 α R: la presencia de 4-en-3-ona y de la cadena lateral en 17 β con uno o más grupos oxígeno (**Figura I.9**).

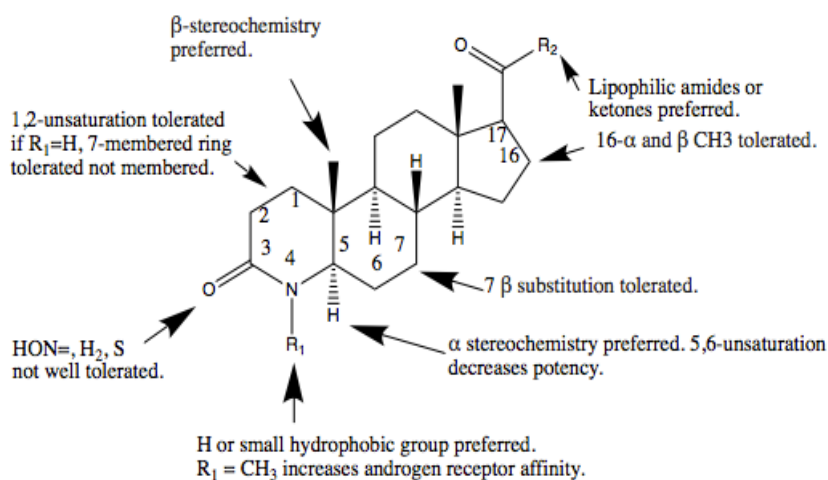


Figura I.9: Estructura molecular de 4-azasteroides.

I.1.6.1.1 Finasterida

FIN, N-(1,1-dimetiletil)-3-oxo-4-aza-5 α -androst-1-en-17 β -carboxamida (**Figura I.10**), es un análogo sintético de la T que actúa inhibiendo la isoforma tipo II humana de la enzima 5 α R. Tiene un peso molecular de 372.55g/mol, es un sólido blanco y cristalino soluble en solventes orgánicos como cloroformo, metanol y

etanol, y prácticamente insoluble en agua (Asbahr y col, 2009). Pertenece al grupo II del sistema de clasificación biofarmacéutica de drogas (BCS), que incluye a los fármacos con baja solubilidad y alta permeabilidad (Almeida & Cabral Marques, 2011).

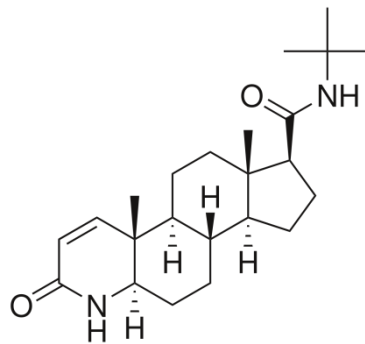


Figura I.10: Estructura molecular de FIN.

Fue aprobado por la FDA (Food and Drugs Administration) en 1992 a una dosis clínica de 5mg/día para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata. Más tarde, en 1997, la FDA autorizó su uso por vía oral a una dosis de 1mg/día como tratamiento de la alopecia androgénica (Aggarwal y col, 2010; Lolli y col, 2017). En España existen registrados 17 marcas y genéricos en comprimidos para vía oral como tratamiento para AGA (CIMA, <https://cima.aemps.es/cima/publico/home.html>).

Su uso por vía oral presenta una alta biodisponibilidad (80%) (BDA) y alta tolerancia, sin embargo, los efectos secundarios asociados a su uso limitan la adherencia al tratamiento de los pacientes. Los efectos secundarios más frecuentes son de carácter sexual, tales como disminución de la libido, ginecomastia, disfunción eréctil y desórdenes eyaculatorios (Lolli y col, 2017). Recientemente, se han descrito nuevos efectos secundarios asociados a estados depresivos y estímulos suicidas (Irwig, 2020), aunque no son muy frecuentes, y los primeros estudios los

relacionan con la persistencia de las primeras reacciones adversas descritas y el insomnio.

En cuanto a sus propiedades farmacocinéticas, alcanza su concentración máxima a las 2 h tras su ingesta y su eliminación se produce entre las 5 ó 6 h posteriores a su ingesta. En cuanto a su distribución, la unión a proteínas plasmáticas es del 93%. Se ha encontrado presencia de pequeñas cantidades de FIN en líquido cefalorraquídeo y líquido seminal. Su biotransformación ocurre fundamentalmente en el hígado, siendo metabolizado por el sistema 3A4 del citocromo P450, donde se obtienen metabolitos prácticamente sin actividad biológica y cuya eliminación por el organismo es de un 57% por las heces y un 39% por la orina.

Es categoría X en el embarazo, por el riesgo potencial que suponen las anomalías genitales que sufren los fetos masculinos. Por tanto, su ingesta y manipulación tópica queda totalmente contraindicado en mujeres embarazadas, e incluso para aquellos hombres que junto a sus parejas planifican un embarazo, ya que FIN se elimina en semen y se absorbe vía cutánea.

Existen ensayos que demuestran que es capaz de disminuir los niveles de DTH hasta un 60-70% (Caserini y col, 2015). Por tanto, tiene sentido investigar nuevas fórmulas farmacéuticas para su aplicación tópica, ya que es indiscutible su eficacia por vía oral y se sabe que se absorbe vía cutánea. Actualmente, hay estudios que demuestran su eficacia mediante uso tópico (Caserini y col, 2015; Chandrashekar y col, 2015). Aunque aún no hay formulaciones registradas y autorizadas por la AEMPs para su comercialización como antialopécico de acción local, crece cada día el diseño y desarrollo de nuevos sistemas que permitan la aplicación tópica de FIN, con el objetivo de limitar sus reacciones adversas. Un ejemplo es el diseño de sistemas que actúan como vehículos de liberación controlada, donde la complejación de FIN con CDs u otros polímeros hidrofílicos o incluso combinaciones, sirven para aumentar la actividad biológica y la velocidad de absorción transdérmica del producto (Lima y col, 2018). En la patente nº CN1294913C, 2004, se incluyen distintas preparaciones para uso clínico: tabletas o

comprimidos dispensables o comunes, cápsulas, linimentos y geles, para la formulación de FIN y sistemas con CDs.

Finalmente, también hay estudios que ofrecen datos acerca de la mezcla de minoxidil 2% y FIN 1mg/día que revelan ser más eficaces en combinación que en monoterapia (Rossi y col,2011).

Por lo tanto, FIN resulta un compuesto atractivo para desarrollar una fórmula farmacéutica de aplicación tópica, con el fin de evitar sus efectos secundarios adversos e incrementar su acción al ponerlo en contacto directo con sus células diana, permitiendo así una mayor adherencia al tratamiento.

I.1.6.2.2 Dutasterida

DUT, N-{2,5-bis(trifluorometil)-fenil}-3-oxo-4-aza-5-androst-1-en-17 β -carboxamida (**Figura I.11 A**) es un inhibidor de la enzima 5 α R que actúa sobre las dos isoformas de la enzima, tipo I y tipo II. Está relacionada tanto química como farmacológicamente con FIN, ya que comparten estructura 4-azasteroide, con la diferencia de que FIN es selectiva sobre la isoforma tipo II de la enzima, siendo DUT 60 veces más potente que FIN (Aggarwal y col, 2010).

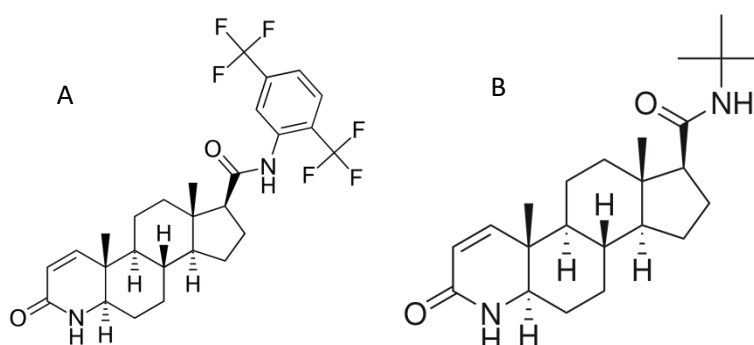


Figura I.11: Estructura molecular de DUT (A) y de FIN (B).

DUT tiene un peso molecular de 528.53 g/mol y es un polvo cristalino blanco prácticamente insoluble en agua, perteneciente al grupo II de BCS. Hay

estudios que confirman que la inhibición enzimática de DUT sobre 5 α R es más potente que la de FIN, consiguiendo reducir hasta un 94% las concentraciones séricas y prostáticas de DHT (Clark y col, 2004). Fue aprobado en 2002 por la FDA para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata (HBP), para la reducción del riesgo de retención aguda de orina (RAO) y de cirugía en pacientes con síntomas de moderados a graves de HBP.

Existen comercializados 23 medicamentos que contienen DUT 0.5 mg en monoterapia, aunque también se usa en combinación con un α -bloqueante denominado tamsulosina. Como es prácticamente insoluble en agua, se comercializa en cápsulas blandas de gelatina que contienen como excipientes una mezcla de aceites mono y diglicéridos de los ácidos caprílico y cáprico junto al antioxidante butilhidroxitolueno (BHT) (E321) (Beak & Kim, 2012). Hay estudios que proponen el uso de agentes autoemulsificantes como nuevos sistemas de liberación que aumentan la solubilidad de DUT (Subramanian & Siddalingam, 2017). Se han desarrollado, con el mismo propósito, formas sólidas con CDs que permiten formular DUT con α -bloqueantes para el tratamiento de HBP (Min y col, 2019). Su interés como agente antialopécico está de actualidad tras observar que, pacientes con HBP, que responden a un patrón masculino de pérdida de cabello, sometidos a tratamiento con DUT conseguían una mejora significativa en la densidad capilar incluso en la cantidad, además de frenar la caída.

La administración oral de DUT en dosis única de 0.5 mg alcanza concentraciones plasmáticas máximas entre 1 y 3 horas tras la ingesta. La BDA es del 60%, siendo inalterada por la presencia de alimentos. Tiene un gran volumen de distribución y su unión a proteínas plasmáticas es muy elevada (>99.5%). Durante el primer mes de tratamiento se consiguen concentraciones séricas de DUT del 65% en estado de equilibrio, que llegan al 90% a partir de los tres meses. Es ampliamente metabolizada in vivo e in vitro y la biotransformación ocurre a través del citocromo P450 3A4 y 3A5, produciendo tres metabolitos monohidroxilados y uno dihidroxilado. Cuando se alcanza el estado de equilibrio, una media del 5.4% de la dosis administrada es eliminada como DUT inalterada en heces. El resto se excreta también en heces en forma de 4 metabolitos principales que suponen el

39%, 21%, 7% y 7% cada uno, además de 6 nuevos metabolitos secundarios que suponen tan sólo el 5% cada uno de ellos. En orina tan sólo se detectan trazas de DUT sin modificar, alrededor del 0.1%. Su eliminación está condicionada por la dosis, y sucede por dos vías de eliminación paralelas, una que es saturable y otra que no lo es. Dosis únicas de 5 mg o menos, son rápidamente metabolizadas por las dos vías, con una vida media de 3 a 9 días. No obstante, a las concentraciones terapéuticas (0.5 mg) en dosis repetidas, el tiempo de eliminación es más lento y lineal, siendo la vida media de 3 a 5 semanas.

No hay datos de interacciones relevantes entre DUT y otros fármacos, aunque un estudio farmacocinético poblacional con fármacos que son potentes inhibidores del CYP3A4 (ritonavir, indinavir, itraconazol, entre otros), reveló un aumento de las concentraciones séricas de DUT. Al igual que FIN, está clasificado en la categoría X en el embarazo, por tanto, está contraindicado su uso e incluso su manipulación tópica en mujeres embarazadas, ya que se absorbe a través de la piel. Además, las parejas que planifican un embarazo también deberán abstenerse de estar en contacto con este principio activo por los efectos adversos potenciales en los órganos sexuales masculinos de los fetos, ya que se elimina en semen.

En cuanto a las reacciones adversas de DUT, se han descrito eventos de leves a moderados durante los ensayos clínicos fase III controlados con placebo, siendo la mayoría en el sistema reproductor. Se describen, sobre todo, impotencia sexual, reducción de la libido, desórdenes en la eyaculación y ginecomastia. En menor medida, también se recogen trastornos inmunológicos como reacciones alérgicas que incluyen erupciones exantemáticas, prurito, urticaria y edema localizado (<0.01%).

En la actualidad, el desarrollo de nuevas estrategias en formulación permite superar los inconvenientes asociados al fármaco, como es su escasa solubilidad acuosa, incluso preparar fórmulas más estables que permitan mejorar sus características farmacocinéticas. DUT ha demostrado aumentar su solubilidad e incluso mejorar el porcentaje de disolución con su formulación en dispersiones sólidas, con la complejación en CDs, con la formación de nanocristales, emulsiones

y nano esponjas, entre otros (Choi y col, 2018; Lee y col, 2015; Min y col, 2019; Sagban y col, 2020).

1.1.6.2 Minoxidilo

MX, 2,4-diamino-6-piperidinopirimidina-3-oxido (**Figura I.12**), con un peso molecular de 206,25 g/mol, es un derivado pirimidínico. Es un polvo blanco cristalino, y es prácticamente insoluble en agua y acetona, y soluble en alcohol, propilenglicol y en medio ácido. Es conocido por la industria farmacéutica desde finales de los 80, cuando se comercializó como antihipertensivo (Lopedota y col, 2018).

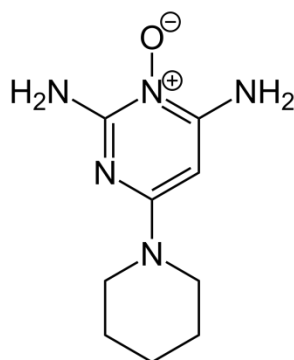


Figura I.12: Estructura molecular de MX.

Más tarde despertó un nuevo interés cuando se observó, que los pacientes que recibían este tratamiento, desarrollaban hipertriosis, lo cual condujo a estudiar una nueva aplicabilidad como agente antialopécico (Kiesewetter y col, 1991). Tras su aplicación tópica se transforma en su metabolito activo MX sulfato, que provoca la apertura de los canales de K⁺ dependientes de ATP, provocando la salida de iones K⁺, con la consiguiente hiperpolarización de la membrana celular, que deriva en la relajación del músculo liso vascular (Maqoud y col, 2020). Esta

acción vasodilatadora que reduce la resistencia vascular periférica, puede aumentar la microcirculación alrededor del folículo piloso, contribuyendo a su acción antialopécica. El mecanismo de acción del MX como fármaco antialopécico no está determinado con exactitud, se sabe que aplicado de forma tópica estimula el crecimiento de queratocitos *in vitro* e *in vivo*. No aumenta el número de folículos capilares sino que convierte parcialmente los pelos de folículos miniaturizados e intermedios en pelos terminales, retardando, de este modo, la aparición de AGA (Lopedota y col, 2018). Dicho proceso se hace notable a partir de los 4 meses de tratamiento, aunque es variable entre pacientes. La suspensión del tratamiento revierte la situación saludable obtenida, pudiendo llegar incluso, en 3-4 meses, a la alopecia pretratamiento. La posología recomendada en adultos para uso tópico sobre cuero cabelludo es de 1 ml dos veces al día, (por la mañana y por la noche). Se desaconseja totalmente sobrepasar la dosis diaria recomendada incluso alterar la frecuencia (Lopedota y col, 2018).

Los datos farmacocinéticos disponibles determinan que el MX administrado por vía cutánea se absorbe muy ligeramente. A una concentración del 2%, el 1.4% de la dosis aplicada alcanza la circulación sistémica; y a una concentración del 5%, sólo el 1.7% de la dosis alcanza el torrente sanguíneo. Los tres factores que condicionan un aumento de la absorción tópica del MX son: el aumento cuantitativo de la dosis aplicada, el aumento de la frecuencia de la aplicación y la alteración del estrato córneo epidérmico como acción barrera. No obstante, la absorción de este principio activo no se ve condicionada por otros factores como el sexo, la exposición a la luz UV, la aplicación simultánea de un producto hidratante, la oclusión (cabello postizo), la evaporación del disolvente (uso del secador) o incluso la superficie de la zona de la aplicación. Cuando se interrumpe la aplicación regular del preparado, el organismo es capaz de eliminar hasta el 95% del MX absorbido en, aproximadamente, 4 días. Su excreción y la de su metabolito activo ocurren mayoritariamente por orina, y su metabolismo es fundamentalmente hepático.

En cuanto a los datos de seguridad, ningún estudio revela riesgos especiales del MX para el uso humano, según aportan los estudios convencionales de

farmacología de seguridad, toxicidad a dosis repetidas, genotoxicidad y potencial carcinogénico. Tampoco hay datos relevantes en cuanto a la fertilidad y a la toxicidad peri y post natal, incluso efectos teratógenos. Por ello está clasificado en la categoría C de la FDA, donde no se considera nocivo en el embarazo ni el desarrollo postnatal, aunque se desaconseja su uso por no disponer de datos clínicos en humanos acerca de la exposición a MX en el embarazo y lactancia. Sí se sabe que se excreta en la leche materna.

Hay descritas algunas alteraciones a nivel cardíaco (taquicardias, palpitaciones, hipotensión) pero, sobre todo, las reacciones adversas de mayor frecuencia son a nivel dermatológico y de hipersensibilidad, tales como prurito, irritación cutánea, dermatitis de contacto y exfoliativa, sequedad de piel, entre otras. Una sobredosis accidental o voluntaria incrementaría la intensidad de estas reacciones adversas además de la probabilidad de sufrir efectos sistémicos.

Es un compuesto ampliamente conocido por la industria farmacéutica, su escasa solubilidad acuosa conduce a formulaciones donde siempre aparece acompañado de cosolventes, mayoritariamente etanol y propilenglicol, que afectan directamente a su solubilidad, así como a su penetración a través de la piel (Lopedota y col, 2018). Estos cosolventes, son los responsables directos de las reacciones adversas que aparecen a nivel cutáneo, descritas en el párrafo anterior (Lopedota y col, 2015). Por ello, en la última década son incesantes los estudios sobre nuevas formulaciones dirigidas a solventar estos inconvenientes. En este sentido, se ha descrito el uso de CDs formuladas en hidrogeles, como sistemas de liberación controlada, ya que aporta resultados muy prometedores (Calderini & Pessine, 2008; Chen y col, 2017; J.-C. Kim y col, 2003; Kwon & Kim, 2010; Lopedota y col, 2015; Maqoud y col, 2020).

Estas alternativas tecnológicas permiten el desarrollo de tratamientos eficaces de acción local, con el fin de ajustar la dosis minimizando los efectos secundarios adversos derivados de una acción sistémica, así como limitar las reacciones adversas asociadas a la aplicación tópica de las fórmulas habituales.

I.2. CICLODEXTRINAS (CDS)

I.2.1 Historia y definición

Las CDs, son azúcares cíclicos, presentes en la naturaleza como resultado de la reacción de transglicosilación intramolecular ocurrida en la degradación del almidón, por la acción de la enzima ciclodextringlucanotransferasa (CGTasa) (Kurkov & Loftsson, 2013).

En la actualidad el uso de estas dextrinas está presente en el día a día de toda la población en países desarrollados, ya que las podemos encontrar en todos los ámbitos: industria alimentaria, textil, cosmética y productos de higiene diaria e incluso como excipientes en fármacos o productos médicos (T. Loftsson & Duchêne, 2007).

Se conocen como tal, desde finales del siglo XIX, cuando una observación fortuita por parte de un farmacéutico y químico francés (Antoine Villiers, 1981), marcó el inicio de una nueva era de trabajo a nivel industrial con trascendencia e impacto a la altura de otros hitos (Kurkov & Loftsson, 2013). Villiers obtenía dextrinas mediante la digestión del almidón por el microorganismo *Bacillus amylobacter* y, tras su conservación durante un tiempo en alcohol obtuvo, por primera vez, unos precipitados cristalinos que resultaron ser las primeras CDs. Villiers determinó la composición química $(C_6H_{10}O_3)_3 H_2O$ y algunas propiedades de estos desconocidos cristales, pero no fue hasta unos años más tarde, en 1903, cuando Franz Schardinger, químico y bacteriólogo austriaco, consiguió aislar las primeras dextrinas, A y B, precipitados cristalinos que carecían de poder reductor. Un año más tarde, el propio Schardinger puso nombre y apellido a la bacteria responsable de la fabricación de estos precipitados, *Bacillus macerans*, capaz de formar CDs a partir del almidón. Seguramente Villiers obtuvo por primera vez dextrinas como consecuencia de una contaminación cruzada con *Bacillus macerans*. Los experimentos que realizó Schardinger sobre las CDs fueron tan importantes, que también se conocen como dextrinas de Sachardinger, además de cicloamilosas o ciclomaltosas.

En la **Tabla I.2** se recogen, de forma cronológica, todos los hitos que han marcado la historia y evolución de las CDs hasta nuestros días, favoreciendo el conocimiento que hoy tenemos de ellas.

Tabla I.2: *Hitos señalados en la historia acerca del conocimiento de las CDs (Del Valle, 2004; T. Loftsson & Duchêne, 2007; Messner y col., 2010; József Szejtli, 1988).*

Período histórico	Investigador	Evento
1981	A. Villiers	Descubrimiento de α y β -CDs; estudios pioneros de composición y propiedades químicas.
1903-1911	F. Schardinger	Aislamiento de la bacteria responsable de la síntesis de CDs; primeros intentos en clasificar distintos tipos de CDs.
1930s	K. Freudenberg	En la formación de CDs se identifican grupos de maltosas unidas por enlaces glucosídicos (α -1,4); primer aislamiento de CDs puras.
1935	K. Freudenberg	Descubrimiento de γ -CDs.
1936	K. Freudenberg	Se identifica la estructura cíclica de las CDs.
1940s	F. Cramer	Se sugiere la idea de la formación de complejos de inclusión.
1948	K. Freudenberg W. Borchert	Se identifica la estructura de γ -CDs; las estructuras de α -, β - y γ -CDs son determinadas mediante difracción por rayos X.
1950s	D.French F. Cramer	Descubrimiento de CDs con anillos más grandes; estudios de la propiedades de los complejos de inclusión y las CDs.
1953	K.Freudenberg F.Cramer H. Plieninger	Primera patente de CDs.
1957	D.French	Primera revisión que ofrecía por primera vez datos de toxicidad de β -CDs.
1965	T. Higuch K. Connors	Desarrollo del modelo matemático que describía la formación de los complejos de inclusión.
1975	M. Furue	Primera publicación de polímeros de CDs.
1976	Ono Pharmaceutical Co.	Lanzamiento del primer medicamento prostarmon E, en CDs.

1980s	U. Brauns B. Müller J. Pitha	Inicio de las aplicaciones industriales de las CDs en nutrición y cosmética. HP- β -CDs se patentan en Europa y USA.
1981	J. Szejtli	Se celebra el primer simposio internacional sobre CDs; es publicado el primer libro de CDs.
1983	K. Miyajima	Primera sugerencia sobre la autoasociación de CDs parentales.
1991	V. Stella R. Rajewski	Se patentó SBE- β -CDs.
1990s	A. Harada M. Kamachi	Intensa investigación de la actividad de catenanos y rotaxanos de CDs.
2000s	M. Bonini A. Coleman G. Gonzalez-Gaitiano T. Loftsson L. Szenté A. Wu	Intensa investigación sobre la actividad de los agregados de CDs. Intensa investigación sobre la actividad de los agregados de CDs.

A la luz de los trabajos mostrados en la **Tabla I.2**, es evidente la evolución en el conocimiento de estos compuestos, que ha traído consigo la amplificación de sus aplicaciones. En el siglo XXI, su estudio no cesa y son multitud los trabajos que recogen nuevos usos de las CDs, sobre todo en el mundo de la nanotecnología y la biomedicina.

I.2.2 Propiedades

De forma natural, encontramos tres tipos de CDs: α -, β - y γ -CDs, también reconocidas como CDs nativas o parentales (Figura I.13) (Mura, 2015). La principal diferencia entre ellas, que condiciona el resto de sus parámetros físico-químicos, es el número de unidades de glucosa que las forman, siendo las más pequeñas las α -CDs (6 unidades de glucosa), seguidas por las β -CDs (7 unidades de glucosa) y por último, las de mayor tamaño las γ -CDs (8 unidades de glucosa) (Jacob & Nair, 2018).

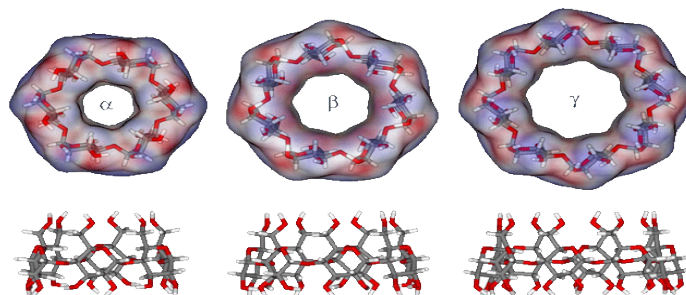


Figura I.13: Estructura molecular de α -, β - y γ -CDs, nativas.

En la **Tabla I.3** quedan recogidas las características de los 3 tipos de CDs nativas:

Tabla I.3: Propiedades de las CDs nativas.

Características	α -CDs	β -CDs	γ -CDs
Unidades de glucosa	6	7	8
Masa molecular relativa	972	1135	1297
Solubilidad en g por cada 100g de agua a 25°C	14.5	1.85	23.2
Diámetro externo (unidades)	14.6	15.4	17.5
Diámetro interno (unidades)	4.7-5.3	6-6.5	7.5-8.3
Altura de la cavidad (unidades)	7.9	7.9	7.9
Volumen de la cavidad (unidades)	174	262	427

Las CDs comparten, en su mayoría, propiedades fisico-químicas y biológicas con sus análogas lineales, aunque destacan dos diferencias importantes (**Tabla I.4**),

gracias a su estructura cíclica son menos susceptibles a la degradación enzimática o no enzimática respecto a las dextrinas lineales, siendo entre tres y cinco veces más resistentes a la hidrólisis no enzimática del enlace (α -1,4) de la glucosa terminal (French, 1957; Frömming & Szejtli, 1993). Por otra parte, gracias a su estructura, también son mucho mejores como agentes complejantes y solubilizadores que las dextrinas lineales.

Tabla I.4: *Propiedades fisicoquímicas de β -CDs y su análogo lineal maltoheptosa (Dona y col., 2010; Gould & Scott, 2005a; József Szejtli, 1988).*

Propiedades	β CD	Maltoheptosa
Estructura	Cíclica enlace-(α -1,4)	Lineal enlace-(α -1,4)
Fórmula	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅	C ₄₂ H ₇₂ O ₃₆
Masa molecular (g/mol)	1135	1153
^aLogP octanol/agua (calculado)	-14	-14
Solubilidad en agua a temperatura de almacenamiento (mg/ml)	18.5	Sobre 50 ^b
^cH-receptores	35	36
^dH-donadores	21	23
α-amilasa humana	Estable frente a α -amilasa	Hidrolizada por α -amilasa
Digestión bacteriana en el tracto gastrointestinal	Susceptible a la digestión	Susceptible a la digestión

^aLogaritmo de octanol/coeficiente de partición de agua. Valores calculados (2017). ^bLa solución se vuelve turbia aproximadamente a 50mg/ml a 25°C. ^cH-receptor: el átomo electronegativo posee un par de electrones solitarios capaces de unirse no covalentemente al átomo de hidrógeno que participa en el enlace de hidrógeno. ^dH-donador: átomo que está unido covalentemente al átomo de hidrógeno que participa en el enlace.

Su producción se lleva a cabo a escala industrial por el fácil acceso a la materia prima y el bajo valor económico que ésta supone. Un análisis comparativo de más de 30 trabajos de formulaciones farmacéuticas pone de manifiesto que β -CDs son las más empleadas debido a su sencilla producción y bajo coste. Sin embargo,

plantean un gran inconveniente y es su relativa baja solubilidad acuosa (mucho menor que la de su homóloga lineal), que conlleva la formación de precipitados de los complejos formados en medio acuoso (Kurkov & Loftsson, 2013). Se cree que la baja solubilidad de las β -CDs es causada por su estructura, ya que sus dimensiones moleculares son óptimas para la formación de un anillo de enlaces de hidrógeno intramoleculares que contrarrestan la hidratación de las β -CDs, reduciendo así su solubilidad. Esta baja solubilidad motivó a la industria productora de CDs a estudiar alternativas para conseguir aumentar la solubilidad de las CDs parentales.

Se pueden obtener CDs modificadas o derivadas de las parentales sometiéndolas a reacciones de acilación, esterificación o eterificación de los grupos hidroxilo, tanto de los carbonos primarios como secundarios de su estructura. Esto permite optimizar el proceso de encapsulación de diferentes compuestos, escogiendo las CDs derivadas más compatibles a las características del huésped a encapsular, en cuanto a tamaño e interacciones moleculares, ya que el sustituyente añadido modifica la solubilidad de las nuevas CDs respecto de la referente nativa y altera el tamaño de la cavidad interna (D.-H. Kim y col, 2020).

Otra característica muy interesante de las CDs es que son capaces de interaccionar entre ellas mediante enlaces covalentes y no covalentes formando estructuras supramoleculares tales como rotaxanos, catenanos e hilos supramoleculares, entre otros, capaces de encapsular diferentes compuestos en su interior (**Figura I.14**) (Jansook y col, 2016).

Tal y como aparece en la **Figura I.14**, la capacidad de de las CDs para autoensamblarse da lugar a la formación de distintas estructuras supramoleculares, obtenidas por modificaciones químicas o enzimáticas de las CDs unidas a fosfolípidos, colesterol o cadenas de hidrocarburos hidrofóbicas entre otras (**Figura I.14 a**). Además de autoensamblarse, las CDs también son capaces de interaccionar con diferentes polímeros, formando parte de la estructura polimérica de muchos materiales (**Figura I.14 b**). Pueden aparecer en la cadena principal del polímero o incluso ser conjugadas con el polímero.

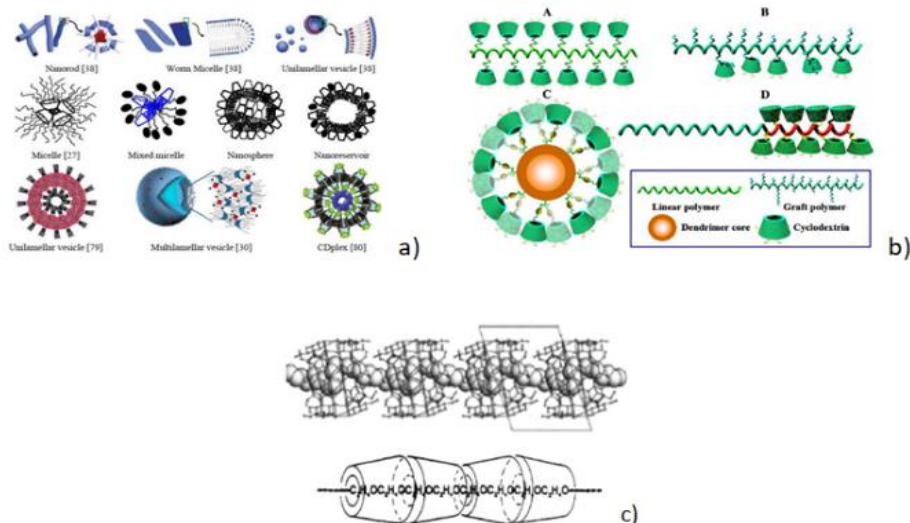


Figura I.14: Estructuras supramoleculares derivadas de CDs: a) Nanoestructuras supramoleculares tipo micelas, nanoesferas, nanobastones y vesículas entre otras, b) CDs conjugadas con polímeros y c) pseudopolirrotaxano α -CDs-PEG (polietilenglicol).

Esto supone ventajas tales como la obtención de materiales para el transporte controlado de fármacos o el aumento de la biocompatibilidad de dichos polímeros con fines biomédicos, incluso permite el aumento de sitios de reconocimiento molecular para el autoensablaje de estos materiales con aplicaciones médicas. Finalmente, al ser las CDs moléculas macrocíclicas son capaces de formar rotaxanos y pseudorotaxanos, especies moleculares de estructura macrocíclica con una arquitectura molecular mecánicamente entrelazada. El macrociclo alberga una cadena lineal en su interior y la disociación de ambas estructuras, cíclicas y lineal, queda protegida por la presencia de grupos voluminosos en el final de la cadena lineal (**Figura I.15 A**). Los pseudorotaxanos se diferencian de los rotaxanos por carecer de estos grupos voluminosos al final de la estructura lineal, lo cual conduce

a un mayor dinamismo del macrociclo, estando siempre en equilibrio con los componentes libres del medio (**Figura I.15 B**).



Figura I.15: Estructuras macrocíclicas A) Rotaxano y B) Pseudorotaxano.

De forma general un pseudorotaxano lineal se forma al enhebrar continuos anillos de CDs a una cadena polimérica tal y como representa la **Figura I.14 c**, donde el polímero de polietilenglicol (PEG) interactúa con múltiples estructuras de α -CDs.

I.2.3 Fundamentos físico-químicos de las CDs

La composición química de las CDs y su particular disposición espacial, así como las interacciones moleculares y el resultado total de las fuerzas implicadas en el mantenimiento de su estructura, constituyen el principio básico sobre el que se fundamenta el especial interés de las CDs (Hadziabdić y col, 2012b). Su estructura tridimensional responde a una forma troncocónica generada como consecuencia de la conformación en silla de las unidades glucopiranosas que las forman (Jacob & Nair, 2018).

Poseen una superficie externa hidrofílica y una cavidad interna hidrofóbica derivadas de la disposición de los grupos hidroxilo secundarios de los carbonos 2 y 3 de cada glucosa, que se distribuyen hacia la boca ancha del cono, y los hidroxilos primarios del carbono 6, que se orientan hacia la boca estrecha de la estructura, lo

cual conduce a que los grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$ se posicionen en la superficie externa de la estructura.

Finalmente, los hidrógenos de los carbonos 3 y 5 y el oxígeno de los enlaces glucosídicos entre las glucosas se ubican orientados hacia el interior del cono (**Figura I.16**).

El resultado final de esta distribución hace evidente la naturaleza anfifílica de las CDs y refuerza la importancia industrial que suponen por su amplia versatilidad química en la formación de complejos de inclusión (Jacob & Nair, 2018; Mura, 2020; József Szejtli, 1988).

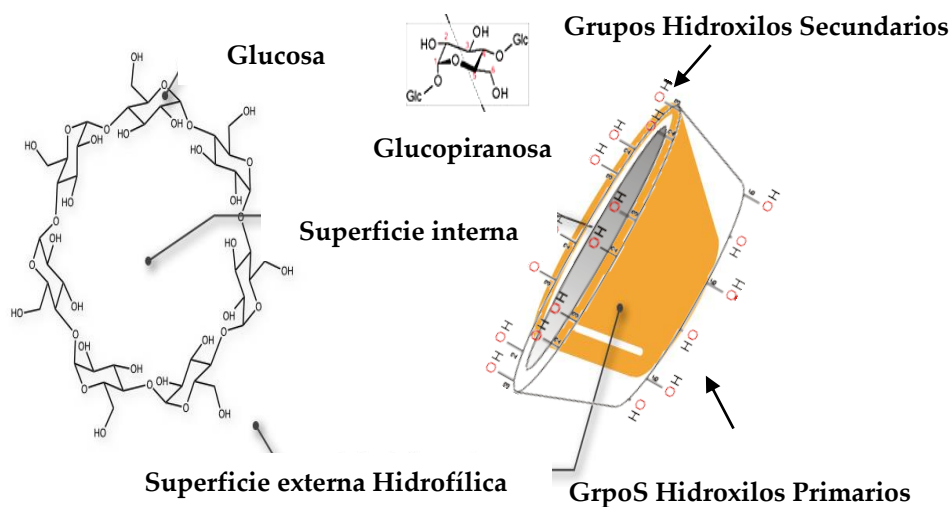


Figura I.16: Conformación tridimensional de las CDs: a) distribución espacial de los grupos hidroxilo de los carbonos de la glucopiranosas y formación del enlace glucosídico, b) estructura tronco-cónica de las CDs.

1.2.3.1 Complejos de inclusión (CI)

Los CI que forman las CDs son complejos moleculares formados gracias a la capacidad que tienen las CDs de atrapar, en su interior, moléculas huésped hidrofóbicas o más frecuentemente, grupos funcionales hidrofóbicos de la molécula huésped presentes en un entorno acuoso (D.-H. Kim e y col, 2020; Kurkov & Loftsson, 2013; T. Loftsson y col, 2007; Mura, 2020). En el proceso de complejación, la formación y ruptura de enlaces no covalentes es constante, y las moléculas complejadas buscan alcanzar el equilibrio con las libres en solución. Es, por tanto, un proceso dinámico regulado por una constante de equilibrio. Así mismo, es muy importante la geometría de la molécula a complejar para que las interacciones moleculares se den de forma idónea, ya que es fundamental la compatibilidad entre las dimensiones de la cavidad interna de las CDs con el tamaño del huésped. También es muy importante la naturaleza química en cuanto a la polaridad del huésped, ya que el proceso de complejación implica, necesariamente, interacciones hidrofóbicas entre la CDs y el huésped. De este modo, para que el proceso ocurra de manera espontánea, se ha de producir la interacción entre el sustrato y las CDs, esta interacción calificada generalmente como “interacción hidrofóbica” lleva consigo un cambio favorable en el valor de la entalpía y, normalmente, desfavorable en el de la entropía. Las variaciones de entalpía y de entropía son los parámetros termodinámicos más importantes que suceden en las reacciones químicas (Lei Liu & Guo, 2002). Miden cambios de energía y orden en el sistema y se relacionan entre sí de manera que, a temperatura constante, un aumento en la entalpía implica un aumento en su entropía y viceversa. Este cambio en el valor de la entalpía, que implica el proceso de complejación, se explica por distintas razones:

- Influencia de las interacciones Van der Waals entre sustrato y CDs.
- Interacciones por puentes de hidrógeno entre los hidroxilos de las CDs y la molécula huésped.
- Pérdida de energía, como consecuencia del desplazamiento de las moléculas de agua ubicadas en la cavidad interna de las CDs.

- Influencia de las interacciones polares que ocurren en el sistema.

Por tanto, el valor de la variación de la energía libre total del sistema [$\sum(\Delta G)_{i-v}$] es la suma de cada una de las fuerzas implicadas en el proceso, siendo más significativas unas respecto a otras dependiendo de las características de cada huésped y de las condiciones del medio de reacción (Schneiderman & Stalcup, 2000).

La estabilidad de los complejos formados depende directamente de la fuerza de las interacciones hidrofóbicas implicadas, donde muchas veces no son suficientes, y las interacciones de tipo Van der Waals y dipolo-dipolo se establecen con mucha menos energía. La estabilidad de los complejos se incrementa cuando la disposición espacial del huésped alcanza un radio de Van der Waals compatible con la cavidad interna de las CDs (Lei Liu & Guo, 2002). Por otra parte, cuanto más apolares sean los sustituyentes de las CDs, mayor estabilidad tendrá el complejo formado, del mismo modo que cuantos más grupos hidroxilos o grupos ionizables libres contengan las CDs, menor estabilidad tendrá el complejo formado. Por todos estos motivos, la formación de complejos de inclusión es un proceso espontáneo, que ocurre cuando se dan todas las características geométricas, estéricas, químicas y energéticas favorables para la encapsulación molecular.

La complejación en CDs puede modificar las propiedades físico-químicas del compuesto encapsulado, como pueden ser: estabilización de compuestos sensibles a la luz o al oxígeno, modificación de la reactividad química, fijación de compuestos volátiles, aumento de la solubilidad en agua, protección frente a la degradación por microorganismos, atenuación de malos olores o sabores o incluso cambios en la movilidad cromatográfica. En definitiva, estas modificaciones en las propiedades físico-químicas de los compuestos encapsulados son el fin que justifica el uso de las CDs en cualquier ámbito industrial y tecnológico. Por ello, se hace imprescindible conocer más acerca de estos complejos, su formación y estabilidad; y el estudio de estos cambios en las propiedades físico-químicas de los compuestos encapsulados, pueden usarse para determinar tanto la estequiometría de los complejos, como los valores de las constantes de equilibrio.

1.2.3.2 Equilibrio de los complejos

La formación de los complejos es un proceso dinámico gobernado por una constante de equilibrio que recibe el nombre de constante de complejación (K_c), y que permite predecir la estabilidad de los complejos formados (Higuchi y Connors, 1965). A mayor valor de K_c mayor será la estabilidad de los complejos. Su valor viene determinado por el tamaño relativo de la molécula complejada y de las interacciones que se establecen entre ésta y las CDs. Su valor numérico puede calcularse a través de la siguiente **Ecuación I.1**:

$$K_c = \frac{[S-CDs]}{[S]L[CDs]L} \quad [I.1]$$

Donde $[S-CDs]$ es la concentración de compuesto complejado en las CDs, $[S]L$ y $[CDs]L$ corresponden a la concentración de compuesto libre y a la concentración de CDs libres en el equilibrio, respectivamente. El valor de K_c está influenciado por las condiciones del medio de reacción, como son la temperatura, el pH, la fuerza iónica y el solvente de la disolución. Por lo tanto, todos ellos son parámetros a tener en cuenta en la optimización del proceso.

Los métodos utilizados para determinar el valor de K_c son muy variados: cromatografía, resonancia magnética nuclear (RMN), cinética, espectrofotometría de diferentes tipos (fluorescencia, absorción UV-VIS o absorción infrarroja (IR) o estudios de solubilidad (Aicart & Junquera, 2003; Longxiao Liu & Zhu, 2006; Higuchi y Connors en 1965).

El método descrito por Higuchi y Connors se basa en el aumento de solubilidad de compuestos ligeramente solubles en agua al ser complejados en la cavidad hidrofóbica de las CDs. Ellos describieron dos tipos de perfiles diferentes para los diagramas de fases que permiten clasificarlos en varios tipos, tal y como se observa en la **Figura I.17**. Los diagramas de fase de tipo A indican que la solubilidad del compuesto encapsulado aumenta con el aumento de la concentración de CDs. Cuando el

complejo es de primer orden con respecto a las CDs (L) y de primer orden o más respecto a la concentración compuesto encapsulado (S), nos encontramos con diagramas de tipo A_L , donde la solubilidad aumenta de forma lineal conforme aumenta la concentración de CDs; por ejemplo: SL , $S2L$, $S3L$,..., SmL . Si la situación es inversa, es decir, si el complejo es de primer orden respecto al compuesto encapsulado y de segundo orden o más, respecto a las CDs, el perfil obtenido es de tipo A_P (isoterma de desviación positiva); por ejemplo: SL_2 , SL_3 ,..., SL_n . Los perfiles de tipo A_N (isoterma de desviación negativa) son difíciles de interpretar, la desviación negativa sobre la linealidad puede asociarse a distintas razones como: cambios en el valor de la constante dieléctrica del medio inducidos por las CDs, cambios en la solubilidad de los complejos o la posible asociación entre las moléculas de CDs.

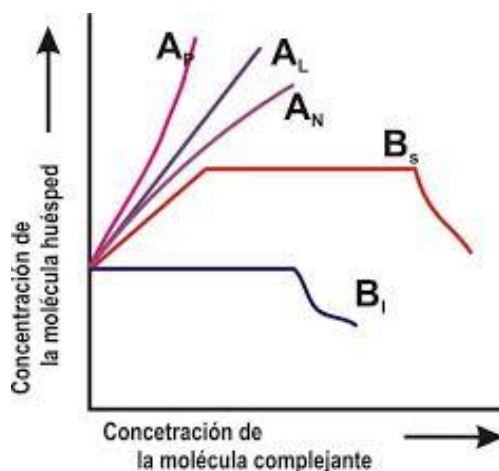


Figura I.17: Diagrama de fases y clasificación de los complejos establecida por Higuchi y Connors, 1965.

En general, las CDs modificadas forman complejos dando lugar a diagramas de fase con perfiles tipo A, ya que forman complejos con una gran solubilidad, mientras que las CDs nativas, frecuentemente las β -CDs dan lugar a diagramas de

tipo B al formar complejos poco solubles en agua que precipitan (T. Loftsson y col, 2005).

La mayoría de los complejos formados por las CDs son interpretados como complejos de inclusión, pero se sabe que también son capaces de formar agregados que permiten solubilizar compuestos insolubles, comportándose como estructuras micelares.

A partir de la clasificación anterior es posible determinar subtipos (**Figura I.18**).

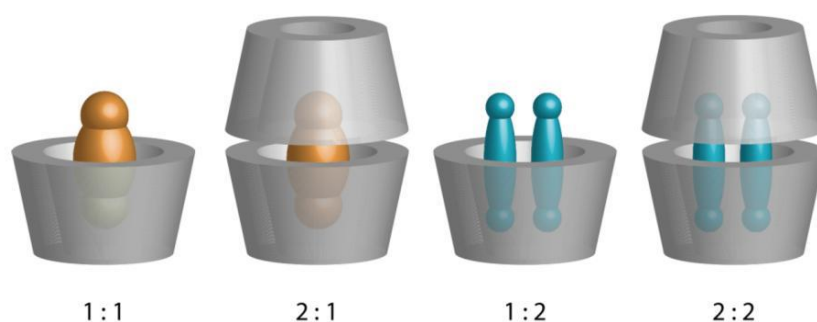


Figura I.18: *Distintos tipos de complejos de inclusión.*

Los complejos 1:1 (A_L), se forman cuando una molécula de CD forma complejo con una molécula de sustrato donde la solubilidad de éste aumenta de forma lineal.

Los complejos 1:2 (A_P), el complejo se forma por dos moléculas de sustrato y una de CD.

Los complejos 2:1 se forman cuando el sustrato es atrapado por dos moléculas de CDs.

Y finalmente, en los complejos 2:2, dos moléculas de sustrato son encapsuladas al mismo tiempo por dos moléculas de CDs.

Además de la evaluación cualitativa, sobre los complejos formados, que ofrecen los diagramas de fase, su construcción es útil para calcular el valor de K_c .

Para complejos 1:1, la solubilidad del complejo se puede representar como (**Ecuación I.2**):

$$S_T = S_0 + [S-CD] \quad [I.2]$$

Donde S_0 es la solubilidad acuosa del sustrato en el medio de reacción. De esta forma, la K_c puede ser calculada aplicando la **Ecuación I.3**:

$$K_{1:1} = \text{pendiente}/S_0(1-\text{pendiente}) \quad [I.3]$$

Donde la pendiente de la recta siempre será menor que la unidad.

La K_c para la formación de complejos $[S_mL_n]$ puede ser interpretada por las **Ecuaciones I.4, I.5** :

$$[S]_T = S_0 + m[S_mL_n] \quad [I.4]$$

$$[L]_T = [L] + n[S_mL_n] \quad [I.5]$$

Donde los valores de $[S_mL_n]$, $[S]$ y $[L]$, pueden ser hallados a partir de las siguientes expresiones (**Ecuaciones I.6, I.7, I.8**):

$$[S] = S_0 \quad [I.6]$$

$$[S_mL_n] = [S]_T - S_0 / m \quad [I.7]$$

$$[L] = [L]_T - n[S_mL_n] \quad [I.8]$$

Donde S_0 es el producto de solubilidad de S_u (en ausencia de CDs), $[S]_T$ es la concentración total de S_u (complejado y no complejado) y $[L]_T$ es la concentración total de CDs.

1.2.3.3 Eficacia de complejación (CE)

La eficacia de complejación (CE) es la relación molar entre la concentración de CDs libres en el medio frente a la concentración de CDs que se hallan formando CI. Este parámetro sirve para medir la capacidad de las CDs de complejar al huésped en la solución acuosa.

Se considera que el medio acuoso es una solución ideal de complejación donde los CI formados son independientes unos de otros, y la estequiometría de los complejos fármaco/CDs es frecuentemente 1:1, es decir, 1 molécula de fármaco forma un complejo con una molécula de CD. En esta situación, el método más habitual para el cálculo de la estequiometría de los complejos es el método de solubilidad a través de la construcción de diagramas de fases. No obstante, distintos estudios experimentales demuestran que las CDs son capaces de formar CI o no, pudiendo coexistir distintos tipos de CDs e incluso distintos excipientes (polímeros, ácidos y bases de sales, etc..) en un mismo medio de reacción (T.Loftsson y Brewster, 2012). Además, las CDs y los complejos pueden formar agregados capaces de solubilizar el fármaco disuelto en el medio, así como distintas moléculas hidrofóbicas, a través del mecanismo micelar.

Por tanto, las constantes de estabilidad obtenidas a partir de los diagramas de fases son constantes de estabilidad aparentes que describen el efecto combinado de distintas estructuras sobre la solubilidad del fármaco. Esta constante aparente ($K_{1:1}$) del fármaco/CDs 1:1, se obtiene a partir de la pendiente de la recta y de la solubilidad intrínseca del fármaco (S_0) en el medio acuoso de complejación. Teóricamente, la solubilidad en la intersección en el eje y del diagrama de fases (S_{int}) debería ser idéntica a S_0 , pero para compuestos poco solubles ($< 1 \text{ m M}$), S_0 es en general mucho mayor que S_{int} lo que da lugar a la no linealidad del diagrama de fases y esto puede llevar a valores erróneos de $K_{1:1}$. Como consecuencia de la inexactitud de S_0 y de S_{int} las constantes de estabilidad aparentes son muy inexactas y muy sensibles a la composición del medio (T.Loftsson y Brewster, 2012). Por este motivo, un método más exacto para medir la eficacia de las CDs como agentes solubilizantes, es el cálculo de CE (**Ecuación I.9**), debido a que su valor se obtiene a partir de la pendiente de los diagramas de fases y es independiente de S_0 y de S_{int} .

$$CE = [Sustrato/CD]/[CD]_t = S_0xKc \quad [I.9]$$

A partir del CE, es posible calcular otro parámetro que indica la relación molar (MR) entre el fármaco y las CDs en un medio de complejación saturado. Éste se obtiene a partir de la siguiente expresión:

$$X : CDs = 1 : \left(1 + \frac{1}{CE}\right) \quad [I.10]$$

donde 1 de cada X moléculas de CDs en solución están formando complejos solubles con el fármaco.

I.2.4 Consideraciones toxicológicas

El perfil de seguridad y toxicología de las CDs en los productos farmacéuticos para uso humano, ha sido ampliamente descrito y se ha postulado su uso durante décadas al reconocer su inocuidad como excipiente o ingrediente activo en las formulaciones farmacéuticas.

La naturaleza glucídica de las CDs responde a la no toxicidad de las mismas. El carácter hidrofílico de las CDs hace que se puedan disolver en entornos hidrófilos como el suero sanguíneo. Por el mismo motivo su absorción dérmica es muy limitada, al igual que su distribución o acumulación en entornos hidrófobos como las bicapas lipídicas. La capacidad de las CDs para formar puentes de hidrógeno contribuye a entorpecer su transporte a través de las membranas biológicas mediante difusión pasiva. Actualmente, no hay evidencia científica sobre la existencia de transportadores de CDs en las membranas celulares. Lo que sí se ha determinado es la BDA oral de las CDs, siendo ésta muy escasa. La BDA oral más alta descrita es para las RM β CDs, derivadas por metilación de β -CDs, alrededor del 12% en ratas.

La baja BDA de las CDs nativas (α -, β - y γ -CDs) y de sus derivadas hidrofílicas las convierte en no tóxicas para uso humano cuando se administran vía oral.

I.2.5 Metabolismo y farmacocinética de las CDs

Las β -amilasas son las enzimas capaces de hidrolizar los enlaces glucosídicos α -(1,4) de polisacáridos, como el almidón, desde el extremo no reductor de la molécula. Las CDs son resistentes a la actividad de estas amilasas, pero son sensibles a la acción de las α -amilasas que hidrolizan el almidón desde el interior de la cadena (J. Singh y col, 2010). La velocidad de hidrólisis de las CDs está condicionada por el tamaño del anillo y la concentración de CDs libres. Por tanto, las CDs libres son hidrolizadas más rápidamente que las CDs que se encuentran formando complejos, siendo mayor la velocidad de hidrólisis cuanto mayor es el tamaño de la cavidad interna. α - y β -CDs son resistentes frente a la α -amilasa salivar, mientras que γ -CDs es rápidamente digerida tanto por la α -amilasa salivar como por la pancreática. En los seres humanos, la α -amilasa aparece en la saliva, en la bilis y en otros fluidos corporales como el líquido lagrimal (Jansook y col, 2018). Esta enzima actúa con bastante facilidad sobre las dextrinas lineales, pero su acción se ve impedida por la estructura cíclica y los sustituyentes de las moléculas de CDs. Las nativas γ -CDs son las más vulnerables a su acción enzimática, pero esta hidrólisis se ralentiza con la modificación de esta CDs parentales y con la formación de complejos de inclusión. Finalmente, las CDs que no hayan sido hidrolizadas por la α -amilasa humana serán digeridas por bacterias del tracto gastrointestinal. Tras la administración oral de γ -CDs, estas se digieren completamente en el tracto gastrointestinal, mientras que, tanto α - como β -CDs, así como sus derivadas, son digeridas principalmente por las bacterias del colon. La digestión de α -CDs ocurre de forma más retardada que la de β -CDs. En la administración parenteral de las CDs, la excreción ocurre en más de un 90% de forma inalterada en orina, a través de la filtración glomerular, siendo el resto eliminado a través de otras vías de excreción como es el metabolismo hepático y la excreción biliar.

Los datos farmacocinéticos, en humanos, de HP- β -CDs, SBE- β -CDs y sugammadex revelan que se excretan sin cambios, principalmente por filtración glomerular (Gould & Scott, 2005b; Kurkov & Loftsson, 2013). Su tiempo de vida

media hasta su eliminación es muy similar para los tres tipos, pudiendo variar de 1.6 a 1.9 h. Más del 90% de las CDs administradas por vía parenteral serán eliminadas en unas 6 horas y más del 99.9% en 24 horas. Por tanto, la toxicidad asociada a la acumulación de CDs en individuos con una función renal normal, incluso en dosis altas, está totalmente descartada. Sin embargo, esta acumulación será evidente en individuos con graves problemas renales, es decir, aquellos con un aclaramiento renal por debajo de aproximadamente 10mL/min.

I.2.6 Uso en la industria farmacéutica

Desde su descubrimiento hace ya más de 100 años, las CDs han sido y son objetivo de numerosos estudios que han dado lugar a una gran cantidad de publicaciones científicas y patentes, la mayoría de ellas de aplicación en la industria farmacéutica. Las CDs se usan en la industria farmacéutica desde el año 1970, cuando se desarrolló el primer producto que contenía dinoprostona, equivalente a la prostaglandina E2, con β -CDs, registrado con el nombre de Prostarmon ETM (T.Loftsson & Duchêne, 2007b). Fue comercializado en Japón en 1976 como tabletas sublinguales y era usado como abortivo en clínica para provocar efectos como, estimular el parto en la muerte fetal intrauterina. Su uso en la industria farmacéutica está reconocido como excipientes que permiten aumentar la solubilidad de fármacos poco solubles en agua o incrementar su permeabilidad a través de las membranas biológicas y, por tanto, aumentar su BDA. Las CDs nativas y algunas de las modificadas aparecen recogidas en monografías de la real farmacopea, que establecen todas las normas específicas de calidad que deben cumplir todos los excipientes y principios activos destinados a la elaboración de medicamentos, tanto de uso humano como de uso veterinario.

La producción anual de CDs es aproximadamente de 10.000 toneladas, de las cuales, alrededor del 70% corresponde a la fabricación de β -CDs, el 15% α -CDs, el 5% γ -CDs el 10% CDs modificadas. De esta producción anual, la industria farmacéutica consume tan solo el 30%, el resto, de forma general, se reparte entre

la industria alimentaria (20%) y la industria del consumo (cosmética y aseo personal, los productos de limpieza, entre otros) (50%) (Jansook y col, 2018).

1.2.6.1 Normas reguladoras

Aunque los excipientes farmacéuticos se caracterizan por ser compuestos farmacológicamente inactivos, desde el punto de vista de las normas reguladoras son considerados ingredientes activos, especialmente si son usados por primera vez en seres humanos (T.Loftsson, 2015a). A diferencia de los principios activos que conllevan una normativa específica y estricta, la solicitud de nuevos excipientes se lleva a cabo en el contexto de nuevos fármacos que contienen un determinado excipiente, donde la autorización, a menudo, se basa en el uso anterior de productos farmacéuticos comercializados o incluso aceptados en la industria alimentaria (reconocidos como aditivos alimentarios por ser considerados GRAS, seguros, autorizados por el comité conjunto de FAO/OMS de aditivos alimentarios (JECFA). Así mismo, puede no ser necesaria la evaluación completa de la seguridad de un excipiente, si éste se ha usado con anterioridad, especialmente si coinciden en las mismas cantidades y vías de administración que en los productos comercializados.

La Agencia Estadounidense Food & Drug Administration (FDA) publica la lista de ingredientes farmacéuticos inactivos contenidos en productos farmacéuticos comercializados, donde se incluyen las CDs en su web <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ucm113978.htm>. Del mismo modo, la Agencia Europea del medicamento (EMA), también ofrece un informe que contiene el uso de α -, β -, γ -, RM- β -, HP- β - y SBE- β -CDs en productos farmacéuticos.

Las monografías de las CDs parentales (α -, β - y γ -CDs) aparecen descritas en el código farmacéutico japonés (JPC), en la farmacopea estadounidense y el formulario nacional (USP/NF), incluyendo ésta última, las monografías para HP- β - y SBE- β -CDs. En Europa es la farmacopea europea (Ph.Eur.) la que incluye monografías para α -, β - y HP- β -CDs. La participación de los organismos

competentes garantiza las correctas normas de calidad de cada uno de los constituyentes en las formas farmacéuticas (Mohammad y col, 2020).

1.2.6.2 Aplicación de las CDs en la industria farmacéutica.

1.2.6.2.1 CDs vehículos potenciadores de la penetración de fármacos

En general, las membranas biológicas son bicapas lipídicas que presentan un exterior hidrófilo y una zona interna lipófila. Los compuestos que consiguen llegar hasta las membranas celulares están disueltos en un medio acuoso (el plasma sanguíneo), pero deben ser lo suficientemente hidrófobos para poder atravesarlas (Thorsteinn Loftsson & Brewster, 2012). Los fármacos que son transportados a través de las membranas por difusión pasiva, lo hacen siguiendo la primera ley de Fick (**Ecuación I.11**), que relaciona el flujo difusivo con la concentración, donde el flujo va desde regiones de alta concentración, a regiones de baja concentración, y lo hace con una magnitud proporcional al gradiente de concentración.

$$J = -D \frac{\partial \phi}{\partial x} \quad [\text{I.11}]$$

Donde, J es el flujo difusivo, representa la cantidad de sustancia que fluye a través de un área en una unidad de tiempo. Se mide en (mol/m²s).

D es el coeficiente de difusión, expresado en área por unidad de tiempo (m²/s).

ϕ es la concentración, cantidad de sustancia por unidad de volumen (mol/m³).

Y x es la posición, expresada en longitud (m).

Esta permeabilidad a través de las membranas desde un vehículo acuoso, puede describirse como la suma de una serie de resistencias, cuya resistencia total se describe en la **Ecuación I.12**:

$$J = P_T \cdot C_V = R_T^{-1} \cdot C_V = (R_{Aq} + R_M)^{-1} \cdot C_V = (1/P_{Aq} + 1/P_M)^{-1} \cdot C_V \quad [\text{I.12}]$$

donde J es el flujo de fármaco a través de la membrana, P_T es el coeficiente de permeabilidad total, C_V es la concentración de fármaco en el vehículo acuoso, y R_{Aq}/R_M y P_{Aq}/P_M son los coeficientes de resistencia y de permeabilidad, respectivamente, en el exterior acuoso (Aq) y dentro de la membrana lipófila (M). Por tanto, podemos reescribir la Ecuación I.10 de la siguiente manera (**Ecuación I.13**):

$$J = \left(\frac{P_{Aq} \cdot P_M}{P_{Aq} + P_M} \right) \cdot C_V \quad [\text{I.13}]$$

Los agentes convencionales potenciadores de la penetración como los ácidos grasos y los surfactantes, favorecen el transporte transmembrana al alterar las propiedades de la propia membrana lipófila, como, por ejemplo, incrementando el valor de P_M (Thorsteinn Loftsson & Brewster, 2012). Por el contrario, las CDs parentales y algunas derivadas como HP- β -CDs y SBE- β -CDs potencian el transporte a través de las membranas biológicas al aumentar la permeabilidad a través del exterior acuoso, incrementando el valor de P_{Aq} . En general, las CDs favorecen el transporte transmembrana de fármacos cuando P_{Aq} es relativamente pequeño respecto al valor de P_M . La **Figura I.19** representa la penetración a través de las membranas biológicas de una determinada concentración de fármaco.

En las formas galénicas de uso tópico, los vehículos acuosos como los hidrogeles o emulsiones, conducen la penetración del fármaco hasta las membranas, bajo estas condiciones las CDs actuarían como reservorio aumentando la permeabilidad del fármaco a través de las membranas, donde el gradiente de concentración permite la difusión pasiva de fármaco.

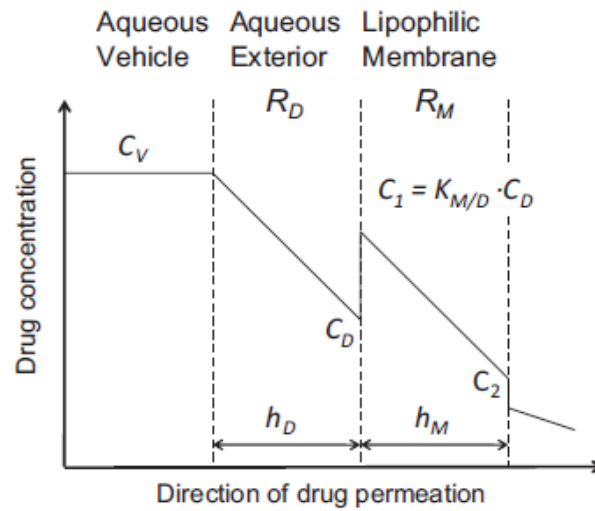


Figura I.19: Esquema de la permeabilidad a través de la membrana biológica con una capa externa acuosa (UWL) y la membrana lipofílica. El vehículo acuoso contiene disuelto el fármaco, R_D , H_d , R_M y H_m que son la resistencia y el grosor de UWL (D) y de la membrana (M). C_V es la concentración de fármaco disuelta en el vehículo, C_D es la concentración de fármaco en el entorno acuoso inmediato a la superficie de la membrana, C_1 y C_2 son las concentraciones de fármaco que contiene la membrana, fuera y dentro de la superficie, respectivamente, y por último, $K_{M/D}$ es el coeficiente de partición del fármaco entre la membrana y el exterior acuoso.

I.2.6.2.2. Desarrollo galénico con CDs

Actualmente hay alrededor de 50 productos farmacéuticos comercializados que contienen CDs como excipientes activos en la formulación. Son aplicadas como agentes solubilizantes e incluso como componentes básicos de nuevos sistemas de administración de fármacos como, por ejemplo, son usadas para formar polímeros que encapsularán proteínas de uso en terapia génica (Thorsteinn Loftsson & Brewster, 2012). Otros ejemplos son, hidrogeles de CDs, agregados de nanopartículas, nanoportadores y nanoesponjas, usados para aumentar la

solubilidad, la estabilidad y la BDA de fármacos, así como para modificar su liberación controlada. Todos ellos garantizando las normas de seguridad que establece la normativa pertinente.

El uso de CDs con acciones cada vez más específicas, por ejemplo, las CDs sugammadex en el producto Bridion® (laboratorios Merck), son usadas para eliminar del organismo fármacos bloqueantes neuromusculares como el rocuronio o el vecuronio, eliminando esta acción farmacológica, conduce a optimizar las cantidades de CDs en las formulaciones, sobretodo en formas de dosificación oral. De lo contrario la misma formulación se convierte en una limitación para su uso en formas sólidas orales (Thorsteinn Loftsson & Brewster, 2012).

Los pesos moleculares de las CDs son relativamente grandes, desde 973 para α -CDs hasta 2163 en el caso de SBE- β -CDs, por eso, la formulación con CI da lugar a masas y volúmenes elevados. Para solventarlo se aplican distintos métodos en la preparación de complejos, que permiten aumentar el valor de CE al aumentar los valores de S_0 y de $K_{1:1}$ (Tabla I.5).

En soluciones acuosas de CDs, la presencia de CI con fármacos poco solubles en agua son las estructuras dominantes en el medio, sin embargo, a medida que aumenta la concentración de CDs en el entorno acuoso, éstas y los CI formados se autoensamblan para formar agregados llegando a alcanzar volúmenes de entre 20 y 100 nm de diámetro. La agregación y el tamaño de los agregados aumenta con el aumento de la concentración de CDs. Con frecuencia se usan algunos excipientes (sales de ácidos y bases, polímeros, etc..) para aumentar la solubilidad del fármaco, ya que en un medio acuoso donde coexisten moléculas de fármaco, CDs y excipientes, la formación de CI está limitada por la presencia de dímeros, trímeros y agregados de orden superior de las mismas moléculas de fármaco, así como por la asociación del fármaco con los excipientes, ya que sólo las moléculas libres de fármaco podrán formar complejos con las moléculas de CDs disueltas en el medio. En tales condiciones la intersección en el eje y en el diagrama de fases no será igual a la S_0 pudiendo causar un error en el valor de K_c . Por tanto, para determinar el efecto solubilizante de las CDs es más preciso el cálculo de CE que mide la relación

entre la concentración de CDs formando complejos y la concentración de CDs libres (Thorsteinn Loftsson & Brewster, 2012). En la **Tabla I.5** se describen los métodos utilizados para aumentar el valor de CE y optimizar las formulaciones farmacéuticas.

Tabla I.5: *Métodos aplicados para aumentar de la eficacia de complejación (CE) (Kurkov & Loftsson, 2013).*

Método	Descripción	Referencias
Preparación de soluciones acuosas		
Ionización de fármacos	La ionización incrementa el valor de S_0	Loftsson y Bodor, 1989; Krishnamoorthy y Mitra, 1996; Li y col, 1998; Loftsson y Brewster, 2012
Formación de sales	Las diferentes sales de un fármaco tienen distintos valores de S_0	Kim y col, 1998; Loftsson y col, 2008; Loftsson y Brewster, 2010
Formación de formas amorfas	En general, las formas amorfas de un compuesto son más solubles que las cristalinas	Loftsson y col, 2010
Complejos ternarios con ácidos o bases orgánicos	La formación de fármaco-CDs-ácido y fármaco-CDs-base, incrementan los valores de S_0 y de $K_{1:1}$	Loftsson y col, 2003; Selva y col, 1998; Fenyvesi y col, 1999; Redenti y col, 2000; Mura y col, 2003
Complejos ternarios con polímeros	Los polímeros solubles en agua forman complejos ternarios con complejos de fármaco-CDs, lo cual aumenta los valores de $K_{1:1}$	Loftsson y col, 1994; Loftsson, 1998; Loftsson y Másson, 2004; Chowdary y Srinivas, 2006; Loftsson y Brewster, 2012
Cosolventes	Los cosolventes aumentan S_0 , pero simultáneamente disminuyen el valor de $K_{1:1}$	Li y col, 1999; He y col, 2003; Viernstein y col, 2003; Loftsson y Brewster, 2012

Interacciones carga-carga	Habitualmente CDs con cargas negativas (SBE β CDs) forma complejos más estables con las cargas positivas de los fármacos, respecto a las CDs neutras. (aumenta el valor de $K_{1:1}$)	Zia y col, 2001; Okimoto y col, 1996; Kim y col, 1998
Dobles complejos	Algunos fármacos son capaces de formar complejos metálicos solubles en agua que a su vez pueden formar complejos con CDs. (aumenta S_0)	Yamakawa y Nishimura, 2003
Preparación de complejos sólidos		
Métodos por calor	El aumento de temperatura en el medio acuoso de complejación, aumenta la S_0 del fármaco y también incrementa la solubilidad de CDs poco solubles (β -CDs)	Loftsson y Brewster, 2012
Formación de complejos metaestables	La adición de ácidos o bases volátiles (amonio) durante el secado, incrementa S_0 de fármacos ionizables	Redenti y col, 1996; Wenz, 2000; Loftsson y col, 2004; Loftsson y Brewster, 2010

El uso de estas técnicas para aumentar la CE, además de disminuir el volumen de la formulación, repercute en el valor económico de la fórmula al disminuir la cantidad de CDs requeridas para conseguir la solubilización necesaria. Este aspecto sobre la rentabilidad del proceso es muy importante en el desarrollo galénico en la industria farmacéutica. La gran versatilidad que ofrecen las CDs en sus aplicaciones justifica su uso en multitud de fórmulas farmacéuticas. Algunos ejemplos se describen a continuación:

CDs en formas de administración sólidas orales: pueden ser tabletas, comprimidos, polvos o cápsulas, mayoritariamente. Para desarrollar las fórmulas farmacéuticas es necesario, en primer lugar, conocer la naturaleza del principio activo con el que trabajamos. El sistema de clasificación biofarmacéutico divide los fármacos en 4 clases basadas en sus propiedades fisicoquímicas: Clase I, el principio activo es altamente soluble y permeable; clase II, el principio activo es poco soluble

en agua, pero muy permeable; clase III, el principio activo es soluble en agua, pero no permeable; y clase IV, el principio activo es poco soluble y poco permeable.

Cuando la vía de administración es oral, los principios activos se absorben en el tracto gastrointestinal, por tanto, deberán atravesar la mucosa gastrointestinal hasta alcanzar el torrente sanguíneo. Solamente la fracción de fármaco que esté disuelto atravesará las membranas biológicas. Por este motivo, en primer lugar, el fármaco se tiene que disociar del complejo, disolverse en el fluido gastrointestinal y a continuación atravesar la mucosa hasta alcanzar el torrente sanguíneo. Por ello es fundamental el cálculo adecuado de la concentración de CDs en la fórmula.

El primer preparado oral comercializado con CDs fue Brexin® (piroxicam- β -CDs) en forma de tabletas. Los complejos fueron preparados por el método de co- evaporación, en una disolución acuosa de hidróxido de amonio, seguido de un proceso de liofilización o esprayado de los complejos en solución. La solubilidad de los complejos fue 8 veces superior a la del piroxicam libre y la irritación gastrointestinal asociada al fármaco libre disminuyó con la presencia de los complejos.

CDs en soluciones de uso parenteral: cuando se administran preparaciones inyectables que contienen complejos fármaco-CDs, el fármaco se disuelve en el plasma sanguíneo para mantener el equilibrio entre el complejo y el producto de solubilidad del fármaco, y forma complejos con las proteínas plasmáticas. Habitualmente los complejos de CDs no alteran la farmacocinética de los fármacos, solamente algunas circunstancias concretas podrían alterar su distribución y eliminación, estas son: un valor muy alto de $K_{1:1}$, por encima de 10^{-5} M^{-1} , y poca unión a proteínas del plasma. Esto hace que el complejo se elimine en orina prácticamente inalterado y sin ningún efecto terapéutico.

De las CDs nativas, la única aprobada para su uso parenteral es α -CDs, usada en la solución inyectable Caverject® y se elimina inalterada en orina tras la liberación del fármaco (alprostadil) (Brewster y col, 1989). β -CDs no se usan por su escasa solubilidad acuosa, pero si se usan sus derivadas hidrófilas (HP- β -CDs y SBE- β -CDs).

Otras vías de administración, nasal, ocular y pulmonar: en general, en estas tres vías de administración el volumen de la capa de difusión acuosa es pequeño con lo que el fármaco se debe disolver en un volumen muy limitado de agua.

La vía nasal tiene la ventaja respecto a la oral, que evita el metabolismo de primer paso, la absorción es muy rápida y por lo general la BDAes elevada (Loftsson y col, 2001; Ventura y col, 2006). La vía tópica ocular posee características únicas que obligan a innovar en el desarrollo de la formulación. Debido a la compleja estructura del epitelio corneal, los fármacos deben poseer características hidrófilas y lipófilas para superar esta barrera. Además, las gotas aplicadas se drenan del espacio precorneal a los pocos minutos de su administración, por lo que los complejos carecen de tiempo suficiente para liberar el fármaco que debe penetrar en este epitelio. Estas condiciones conllevan al diseño de polímeros mucoadhesivos que permitan aumentar el tiempo de permanencia del fármaco en el espacio ocular. El uso de complejos fármaco-CDs en este polímero de micro y nano partículas, actúa como reservorio del fármaco aumentando la absorción de éste en el epitelio corneal. Un ejemplo de este colirio comercializado es Trusopt® que contiene RM- β -CDs como agente complejante (Sigurdsson y col, 2005).

Finalmente, la vía pulmonar es usada habitualmente para el tratamiento local de enfermedades pulmonares. Sin embargo, sus características como la gran superficie de los pulmones, la baja degradación enzimática que sufren los fármacos en esta área anatómica y el gran flujo sanguíneo que se halla en la vía pulmonar, hacen de esta vía de administración una prometedora alternativa a otras, para la acción sistémica. Tanto los complejos sólidos, como en solución se formulan para ser aplicados en polvo y en nebulizadores para inhalación. Debido a la alta irrigación sanguínea, la absorción ocurre muy rápida. La insulina es un ejemplo de macromoléculas que utilizan esta vía para provocar una acción sistémica. En este caso se ha formulado con DM- β CDs, como agente solubilizante y potenciador de la penetración (Hussain y col, 2003). Esta fórmula demostró disminuir de forma significativa la glucosa en plasma.

Es evidente la importancia de las CDs en el desarrollo galénico en la industria farmacéutica para aumentar la solubilidad, la ratio de disolución y la estabilidad química de fármacos insolubles en agua. La visión simplificada de la formación de complejos de inclusión con CDs, donde la parte lipofílica de un compuesto entra en el interior hidrofóbico de la cavidad de una molécula de CDs, es cada vez con más frecuencia reemplazada por modelos más complejos donde una molécula de CDs, complejos y agregados coexisten en una solución acuosa. Por tanto, la evolución en su conocimiento amplía todas sus posibilidades.

II - OBJETIVOS

II – OBJETIVOS

FIN, DUT y MX son compuestos que han demostrado ser eficaces en el tratamiento de la alopecia. Aplicados por vía tópica limitan la caída de pelo de forma evidente y provocan hipertriosis en los folículos susceptibles a su acción farmacológica. Sin embargo, los tres comparten una propiedad física, la de ser prácticamente insolubles en agua, lo que limita el desarrollo de formulaciones acuosas para uso tópico. El desarrollo de estas formulaciones es idóneo para minimizar las reacciones adversas más frecuentes asociadas a su administración oral. Por tanto, siendo AGA una enfermedad con afectación local y que permite un tratamiento tópico eficaz, es casi imprescindible el desarrollo de preparados farmacéuticos que se apliquen por esta vía de administración.

Así, el objetivo principal de esta Tesis es el estudio de la complejación de FIN, DUT y MX en CDs, para obtener soluciones acuosas que permitan la aplicación tópica de estos fármacos en el tratamiento de AGA, minimizando sus efectos secundarios adversos.

Para lograr este objetivo principal, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Incrementar la solubilidad acuosa de FIN, DUT y MX, usando diferentes tipos de CDs nativas (α -, β - y γ -CDs) y algunas modificadas.
2. Calcular el valor de las constantes de complejación (K_c), eficacia de complejación (CE) y la relación molar (MR), de FIN, DUT y MX con cada una de las CDs estudiadas, con el fin de determinar el tipo de CDs idónea para la complejación de cada uno de los fármacos estudiados.
3. Determinar el pH y la temperatura óptimos para llevar a cabo la complejación de FIN, DUT y MX con las CDs idóneas en cada caso.

III - MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. REACTIVOS

FIN (PM 372.6) (99.2% pureza), fue suministrado por Guinama, SLU (Valencia, España), DUT (PM 528.53) (99.3% pureza) fue suministrado por Laboratorios Fagron y MX (PM 209.3) (99.7% pureza) fue suministrado por Guinama, SLU (Valencia, España). Las CDs nativas (α -, β -, y γ -CDs), y sus modificadas (HP- β -, HP- γ -, Methyl- β -, y Methyl- γ -CDs) fueron suministradas por Laboratorios Arachem (Holanda). El metanol y el agua utilizados fueron de grado analítico para HPLC, y fueron suministrados por Chem-labl-NV (Bélgica). El resto de reactivos y productos químicos usados fueron de grado analítico.

1.2. ESTUDIO DE SOLUBILIDAD

1.2.1. Cálculo de Kc, CE y MR

El estudio de solubilidad de cada uno de los compuestos (FIN, DUT y MX) se realizó en medio acuoso, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de diferentes tipos de CDs (α -, β -, γ -, HP- β -, HP- γ -, Methyl- β - y Methyl- γ -CDs).

Este estudio se llevó a cabo aplicando el método de solubilidad descrito por Higuchi y Connors en 1965, mejorado según el estudio realizado por Lucas-Abellán y col. en 2008. El medio de reacción contenía exceso de compuesto objeto de estudio (FIN, MX y/o DUT, en cada caso) y concentraciones crecientes de CDs, en un volumen total de 10 mL. Las muestras se sonicaron en un baño de ultrasonidos durante 60 minutos, a 25°C, hasta alcanzar el equilibrio. Posteriormente fueron filtradas a través de filtros de acetato de celulosa regenerada de 0.45 μ m de tamaño de poro y, posteriormente, valoradas mediante cromatografía (HPLC) (en el caso de FIN y DUT) o espectrofotometría (en el caso de MX), en todos los casos con una

dilución del 80% con etanol, en el máximo de absorción de cada uno de los compuestos.

Para la elaboración de los diagramas de fases de cada uno de los compuestos estudiados, se representó la concentración de cada compuesto total en el eje de ordenadas frente a la concentración de CDs en el eje de abscisas. Las representaciones obtenidas representan el comportamiento de cada compuesto estudiado en presencia de concentraciones crecientes de diferentes tipos de CDs. A través de los diagramas de fases obtenidos para cada compuesto y con cada tipo de CDs, y usando la ecuación descrita por Higuchi y Connors, en 1965 (**Ecuación III.1**), se calcularon los valores de K_c , para FIN, DUT y MX con cada una de las CDs estudiadas.

$$K_c = \frac{\text{pendiente}}{S_o(1-\text{pendiente})} \quad \text{[III.1]}$$

Se determinó la pendiente de la recta obtenida en cada caso y el valor de S_o que es la ordenada en el origen que corresponde al límite de solubilidad acuosa de cada compuesto en ausencia de CDs y en las condiciones particulares de pH y temperatura en las que se ha realizado el estudio.

Además de calcular la K_c , también se calculó la CE para cada tipo de CDs. La CE nos da información sobre el aumento de solubilidad de cada compuesto en función del tipo de CDs utilizadas. Hace referencia a la relación molar entre la concentración de CDs que están en disolución complejando un compuesto y la concentración de CDs libres en disolución. La CE se calcula aplicando la **Ecuación III.2** (Lucas-Abellán y col, 2008):

$$CE = \frac{[\text{Sustrato}/\text{CD}]}{[\text{CD}]_t} = S_o x K_c \quad \text{[III.2]}$$

En todos los casos, las medidas se realizaron por triplicado.

Los valores de CE también se utilizaron para calcular la MR, entre cada compuesto y cada tipo de CDs estudiada, aplicando la **Ecuación III.3** (Thorsteinn Loftsson & Duchêne, 2007):

$$X: CDs = 1: \left(1 + \frac{1}{CE}\right) \quad \text{[III.3]}$$

1.2.1.1. Estudio del efecto de la temperatura en el proceso de complejación.

Los estudios de solubilidad se realizaron a distintas temperaturas (4, 25 y 65°C) aplicando el proceso descrito en el apartado anterior (1.2.1). El control de temperatura se llevó a cabo en el baño de ultrasonidos.

1.2.1.2. Estudio del efecto del pH en el proceso de complejación de FIN.

Los estudios de solubilidad a diferentes pHs para FIN, se realizaron aplicando el proceso descrito en el apartado 1.2.1. Se estudiaron 3 pHs (3.0, 5.5 y 9.0) en cada caso:

Tampón acetato sódico 50 mM, pH 3.0.

Tampón acetato sódico 50 mM, pH 5.5.

Tampón borato sódico 50 mM, pH 9.0.

1.2.2. Cuantificación de FIN y DUT por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cuantificación de FIN y DUT mediante HPLC se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Manne y col, 2011. Para ello se utilizó un equipo de HPLC Agilent Technologies modelo 1200, equipado con un detector DAD. La columna utilizada fue Phenomenex C18 (150mm x 4.6mm, 5µm tamaño de partícula) y la fase móvil estaba compuesta por metanol y agua en una proporción 80:20 (v/v), acidificada con 0.02% de ácido fórmico. La duración del cromatograma fue de 9 minutos, un flujo de 1mL/min y la temperatura 25°C. Las longitudes de onda

seleccionadas para la detección de cada compuesto fueron 246nm en el caso de FIN y 241 nm en el caso de DUT. El tiempo de retención fue de 4 minutos para FIN y 6 minutos para DUT.

Para la cuantificación de FIN y DUT mediante HPLC, se prepararon viales de inyección de 1 mL que contenían diluciones de cada una de las muestras previamente filtradas con etanol al 80%, con el fin de romper los complejos y cuantificar la cantidad de compuesto disuelto y complejo. Para la cuantificación de ambos inhibidores de la enzima 5 α R, se interpolaron las áreas de pico obtenidas tras la separación cromatográfica de cada muestra, en la recta de calibrado de cada compuesto (FIN y DUT, **Figura III.1** y **Figura III.2**, respectivamente).

Ambas rectas de calibrado fueron elaboradas a partir de un patrón de 1 mg/mL de cada compuesto y se cuantificaron 7 concentraciones distintas para la construcción de cada recta (**Figura III.1** y **Figura III.2**).

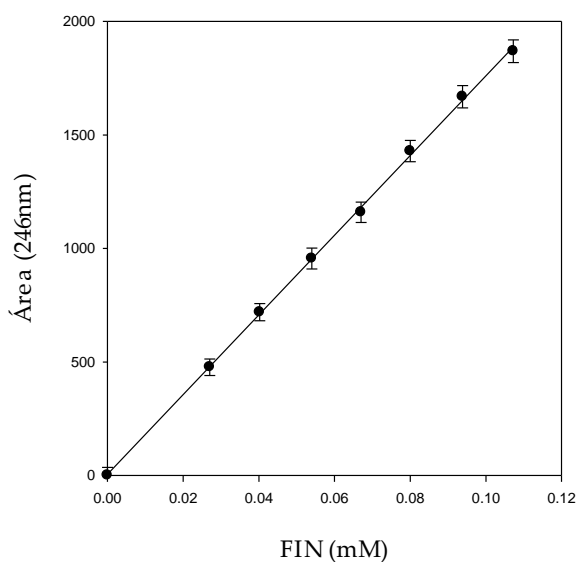


Figura III.1: Recta de calibrado de Finasterida ($y = 17625.9x$)

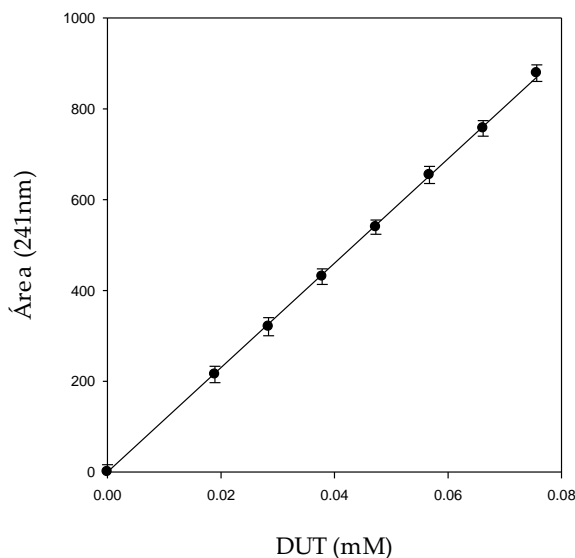


Figura III.2: Recta de calibrado de Dutasterida ($y = 11503.2x$)

1.2.3. Cuantificación de MX por espectroscopía

Las medidas de absorbancia se llevaron a cabo en un espectrofotómetro modelo UV-1063 Shimadzu (Kyoto, Japón). El medio de reacción contenía MX saturado con concentraciones crecientes de CDs, que fueron filtrados y analizados en un volumen final de 1 ml en presencia de etanol al 80%. El espectro de absorción se registró en el intervalo de 190-400 nm, y se tomó la absorbancia en el máximo de absorción del compuesto (287nm). Todas las medidas se hicieron por triplicado.

Para la cuantificación de MX por espectrofotometría se prepararon viales de 1 mL que contenían diluciones de las muestras con etanol al 80% para romper los complejos y cuantificar la cantidad de MX complejo. La concentración de MX en cada una de las muestras, fue calculada a partir de la recta de calibrado obtenida para MX (ecuación de la recta) (**Figura III.3**).

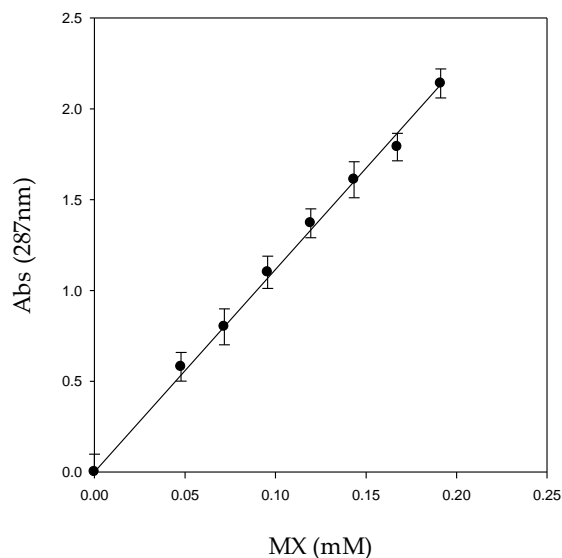


Figura III.3: Recta de calibrado de Minoxidilo ($y = 11.7x$)

1.3 SECADO POR ATOMIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN FIN-CDs MEDIANTE SPRAY-DRIYER

Los complejos en estado sólido se obtuvieron a partir de las disoluciones acuosas de los complejos de FIN- γ -CDs y FIN-HP- γ -CDs mediante un proceso de atomización. Para ello, se usó un atomizador Mini Spray Dryer Büchi B290 (Flawil, Suiza) con las siguientes condiciones de trabajo: temperatura de entrada 170°C, temperatura de salida 77°C, presión 3.2 bar, caudal 5mL/min, diámetro de la boquilla 1.5 mm y velocidad de rotación 30000 rpm.

1.4 CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS DE FIN-CDs

1.4.1 Resonancia magnética nuclear (RMN), estudio supramolecular de las estructuras de los complejos

Los ensayos de RMN se llevaron a cabo a 298 °K en un espectrómetro Bruker Advance 600 MHz, equipado con una sonda inversa de banda ancha (TXI) de 5 mm.

La caracterización de FIN y HP- γ -CDs libres y del complejo formado entre ellos, se realizó mediante el análisis del desplazamiento químico del protón ^1H entre las tres posibilidades. El experimento de espectroscopia bidimensional de efecto rotacional Overhauser (2D ROESY) se realizó a 600.13 MHz utilizando el programa estándar de pulso Bruker (Bax & Davis, 1985).

1.4.2 Espectroscopía de absorción infrarroja (IR)

Los espectros de infrarrojos por transformada de fourier (FT-IR) se realizaron en un espectrofotómetro Varian FTIR 670 (Agilent Tech, Holanda) acoplado a un accesorio para analizar la reflectancia total atenuada (ATR) con una resolución del número de onda de 0.10 cm^{-1} en el rango de $250\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. Para estudiar los cambios de las estructuras químicas de FIN libre y del complejo FIN-CDs, se depositó una cantidad adecuada de cada muestra en la superficie de la placa de diamante, cubriendo completamente la superficie del prisma y se registró el espectro (32 escaneos para cada espectro) con una resolución de 4 cm^{-1} en los rangos anteriores. Esta técnica evalúa los modos de vibración de la molécula complejada y de las CDs libres, que se ven influidos en el proceso de complejación. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

1.4.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se analizaron mediante DSC tanto FIN y CDs aisladas, como los complejos obtenidos. Para ello se utilizó un analizador Mettler DSC Q100 (TA instrument, Cerdanyola del Valles, España). Las muestras (1-3 mg) de FIN libre, HP- γ -CDs libre y de los complejos de FIN-HP- γ -CDs, se pesaron en una cápsula de aluminio y se calentaron en un rango de temperatura de 25 a 300 °C, con una rampa de temperatura de 10°C/min y bajo una purga continua de nitrógeno seco. La estabilidad térmica de los respectivos componentes se representó usando diagramas de primera derivada (DTG) de peso (%) frente a temperatura (°C). Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

1.4.4 Parámetros termodinámicos del proceso de complejación

La variación de energía libre de Gibbs (ΔG°_{tr}) representa la energía que se libera al transferir FIN desde la solución acuosa a la cavidad hidrofóbica de las CDs. Es determinada por la **Ecuación III.4**:

$$\Delta G^{\circ}_{tr} = -RT \times \ln \frac{S}{S_0} \quad \text{[III.4]}$$

Donde S es la solubilidad molar de FIN en presencia de CDs, R es la constante universal de los gases ideales y T es la temperatura absoluta en °K.

La variación de energía libre estándar (ΔG°) se calculó utilizando la **Ecuación III.5**:

$$\Delta G^{\circ} = -2.303RT \times \log Kc \quad \text{[III.5]}$$

Las variaciones de entropía, variación del orden molecular en una reacción química (ΔS°), y entalpía, variación de energía en una reacción química (ΔH°), fueron calculadas mediante la ecuación de Van't Hoff (**III.6**):

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{[III.6]}$$

1.4.5 Caracterización morfológica

La morfología de las partículas de FIN, de γ - y HP- γ -CDs y de los complejos de inclusión formados FIN-CDs, se examinaron mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) utilizando un microscopio MERLINTM VP COMPACT (Carl Q18 Zeiss Microscopy SL, Alemania), con un voltaje de aceleración fijado en 15 kV.

Todas las muestras se fijaron con cintas de carbono adhesivas de doble cara, y la superficie se cubrió con una fina capa de oro antes de su análisis. Esta técnica nos aportó información acerca de la forma y el tamaño de las partículas estudiadas. Para ello se trabajó con los términos de distribución del tamaño de partícula y el tamaño medio de partículas.

La distribución del tamaño de partícula se determinó utilizando un instrumento de difracción de luz láser, Mastersizer 3000 (Malvern Instrument, Reino Unido). Las partículas atomizadas consideradas en la valoración fueron más de 30.000. Esta caracterización se llevó a cabo en términos de diámetro medio del volumen D[4:3] (diámetro medio De Brouckere), que es el diámetro medio de una esfera con el mismo volumen, y el ancho relativo de la distribución (span). El span se calculó utilizando tres medidas, D10, D50 y D90 (diámetro del volumen de las partículas correspondiente al 10, 50 y 90% de la población, respectivamente) a través de la **Ecuación III.7**:

$$Span = \frac{D90-D10}{D50} \quad \text{[III.7]}$$

1.4.6 Modelado molecular

La estructura de la molécula de FIN utilizada en el modelado molecular se construyó utilizando un enfoque de mecánica cuántica. Más concretamente, su geometría se optimizó totalmente en el enfoque M06-2X/6-311G (d) del marco de la teoría funcional de la densidad (DFT) (Zhao & Truhlar, 2008). Se realizaron cálculos vibratorios adicionales para confirmar que la estructura localizada

correspondía a una estructura estable caracterizada por la ausencia de cualquier frecuencia imaginaria. Así mismo, se determinaron con el mismo marco teórico los estados de protonación y los estados tautoméricos de FIN en el rango seleccionado de pH. Este marco teórico M06-2x/6-311G (d) se combinó con un Modelo de Solvatación basado en la Densidad (SMD) (Marenich y col, 2009) para evaluar sistemáticamente la estabilidad de todas las estructuras diseñadas.

Las cargas atómicas parciales se calcularon mediante el conocido esquema ESP de Merz-Singh-Kollman y se aplicaron en las simulaciones de acoplamiento (Besler y col, 1990; U. C. Singh & Kollman, 1984). El formalismo dependiente del tiempo TDDFT se utilizó para evaluar los efectos tautoméricos y de protonación en la señal óptica de la forma neutra y de las especies aniónicas y tautoméricas más estables (Casida y col, 2009). Todos los cálculos químicos cuánticos se realizaron con el conjunto de programas Gaussian 16.

La estructura de γ -CDs se obtuvo de la estructura cristalina del PDB 2ZYK, y la de HP- γ -CDs se construyó agregando grupos hidroxipropilo al modelo γ -CDs. El modelo de trabajo en el diseño de HP- γ -CDs correspondió al de su forma neutra ya que pensamos que debía ser la forma principal en el rango de pH utilizado en este trabajo (3.0 a 9.0). Trabajos experimentales anteriores ya habían demostrado que β -CDs sólo se desprotona a un pH superior a 12.0 (Gaidamauskas y col, 2009). Por tanto, siendo la principal diferencia entre HP- β -CDs y β -CDs la adición de grupos hidroxipropilo con un valor pK_a de 16.5, cabía esperar el mismo comportamiento para γ - y HP- γ -CDs (Reeve y col, 1979).

Los cálculos de acoplamiento molecular se realizaron utilizando parámetros predeterminados en Autodock Vina (Trott & Olson, 2009) y las representaciones gráficas de los resultados de acoplamiento se prepararon utilizando PyMOL (Sistema de Gráficos Moleculares, versión 1.3, Schrödinger, LLC). Las simulaciones de acoplamiento se iniciaron a partir de geometrías DFT obtenidas para FIN, detectando primero todas las uniones rotatorias por Autodock Vina, y después se

relajaron completamente durante las simulaciones siguiendo un procedimiento estocástico.

El estudio computacional se completó finalmente computando la energía de interacción de FIN con las CDs seleccionadas. Con el objetivo de proporcionar los valores más precisos, estos cálculos adicionales de punto único se realizaron con el método de contrapeso, que tiene en cuenta correctamente el llamado error de superposición del conjunto base (Boys & Bernardi, 2002).

IV - FINASTERIDA

1-FINASTERIDA

1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1 Finasterida

FIN es un fármaco con efecto antiandrógeno utilizado para el tratamiento de AGA. Actualmente, los fármacos que se prescriben con FIN como principio activo corresponden a formulaciones administradas por vía oral (Aggarwal y col, 2010; Lolli y col, 2017). Este fármaco presenta reacciones adversas, de carácter sexual, en su mayoría, asociados a la distribución sistémica, tales como ginecomastia, disminución de la libido, impotencia o eyaculación precoz, entre las más graves, ya que la enzima se localiza en la próstata y en el folículo piloso. La presencia de reacciones adversas asociadas a la administración oral de este tipo de fármacos hace que se desarrollen, de forma continua, investigaciones sobre nuevas formulaciones para su administración, que permitan una liberación transdérmica controlada potenciando la penetración y que permitan retener la fracción terapéutica eficaz de FIN. Por otra parte, FIN es un compuesto soluble en disolventes orgánicos polares, pero prácticamente insoluble en agua (Almeida & Cabral Marques, 2011).

Teniendo en cuenta estos dos motivos, por una parte, la baja solubilidad acuosa de FIN y por otra las reacciones adversas asociadas a su distribución sistémica, y con el fin de encontrar una formulación acuosa de liberación controlada y aplicación tópica, en la presente tesis estudiamos la encapsulación de FIN en distintos tipos de CDs nativas y modificadas.

1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.2.1 Análisis computacional

En primer lugar, se realizaron cálculos teóricos para predecir las formas más estables de FIN en los medios diferentes medios de complejación estudiados. La **Figura IV.1** ilustra las estructuras optimizadas de FIN en sus formas, neutral, aniónicas y tautoméricas.

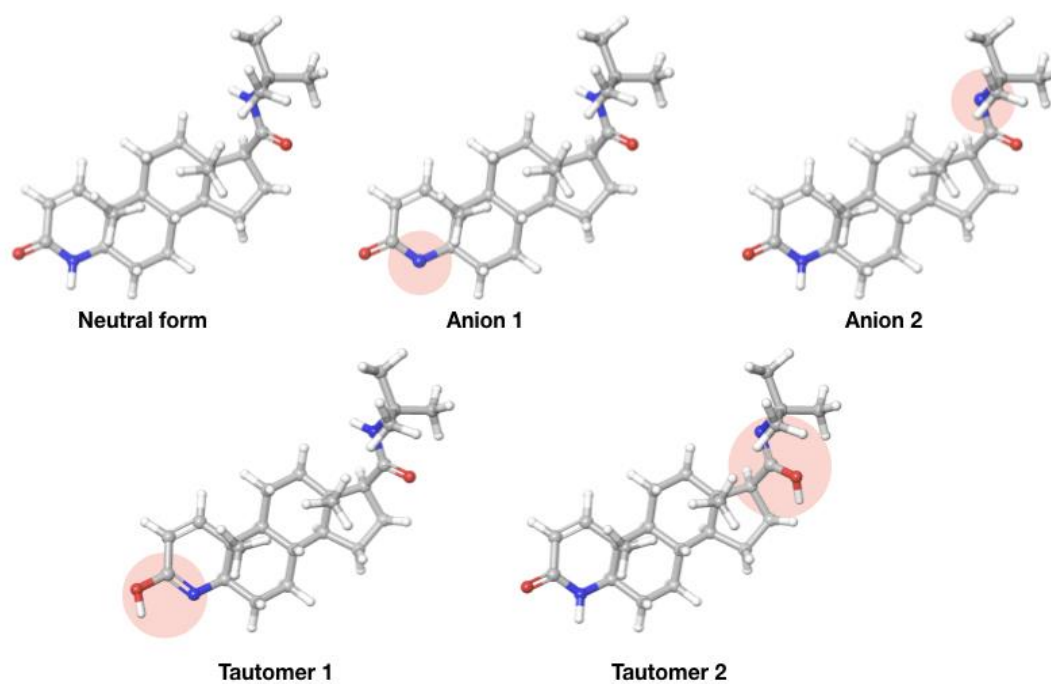


Figura IV.1: Estructuras computacionales de mecánica cuántica de FIN en las formas neutral, aniónicas y tautoméricas. Las estructuras modificadas están señaladas en el círculo rojo. Esquema del color: carbono en gris, hidrógeno en blanco, oxígeno en rojo y nitrógeno en azul.

De acuerdo con los cálculos realizados, los equilibrios tautoméricos están desplazados, en gran medida, hacia la forma “canónica” (imagen superior izquierda), que conserva la configuración del CO-NH en los dos grupos amida. De hecho, las formas tautoméricas 1 y 2 dan lugar a una desestabilización de aproximadamente 17 y 23 kcal mol⁻¹.

En cuanto a las formas aniónicas, que surgen de la desprotonación de los grupos CO-NH, la energía calculada para el anión 2 es 4 kcal mol⁻¹ más estable que su homólogo el anión 1. Por tanto, el anión 2 es la forma más estable tras la desprotonación.

Seguidamente, y con el fin de determinar el impacto del tautómero 1 y el anión 2 en la conformación óptica, calculamos los espectros de absorción de todas las especies. Como se puede observar en la **Figura IV.2**, la longitud de onda del máximo de absorción de la forma neutral se encuentra en 208 nm (línea continua). Este resultado coincide con el observado experimentalmente. El equilibrio tautomérico induce un cambio en el máximo de absorción desplazándose a 190 nm (**Figura IV.2**, línea de puntos). En el caso del anión 2 el desplazamiento del máximo de absorción es a 227 nm (**Figura IV.2**, línea discontinua).

Estos resultados teóricos-experimentales permiten concluir que, la estructura de FIN que se obtiene según la estrategia computacional es principalmente su forma neutral-canónica.

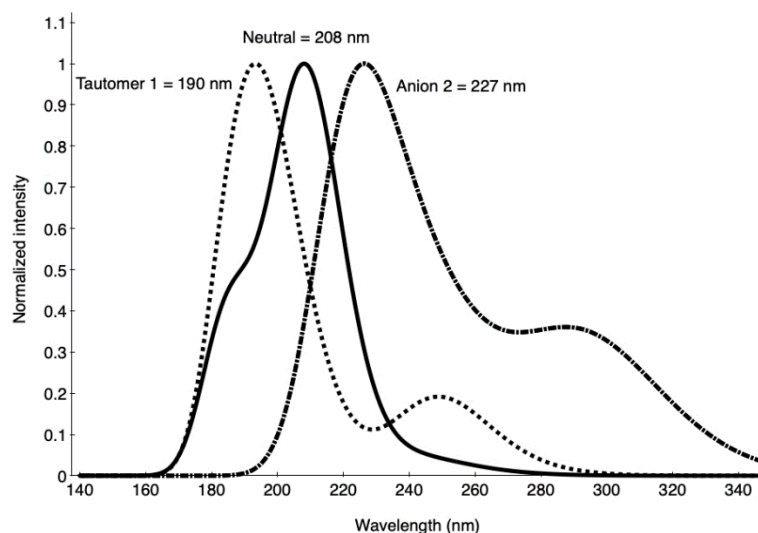


Figura IV.2: Predicción de los espectros de absorción UV-vis para FIN en su forma neutral (línea continua), tautomérica (línea de puntos) y aniónica (línea discontinua). Los perfiles observados corresponden al tautómero y al anión más estables.

1.2.2. Estudios de solubilidad

Con el objetivo de aumentar la solubilidad de FIN mediante la complejación con CDs, se llevaron a cabo estudios experimentales y de modelado molecular de FIN, en presencia de diferentes tipos de CDs nativas (α -, β - γ -CDs) y modificadas (HP- β -, HP- γ -, Methyl- β - y Methyl- γ -CDs).

Como se observa en las **Figuras IV.3** y **IV.4**, la presencia de concentraciones crecientes de CDs nativas aumentó la solubilidad acuosa de FIN de diferente forma, en función de las CDs ensayadas.

Cuando incrementamos la concentración de α -CDs en el medio de reacción, la concentración de FIN aumentó linealmente, aunque de forma poco significativa (de 0.145 mM (S_0) a 0.21 mM con 20 mM de α -CDs) (**Figura IV.3 A**).

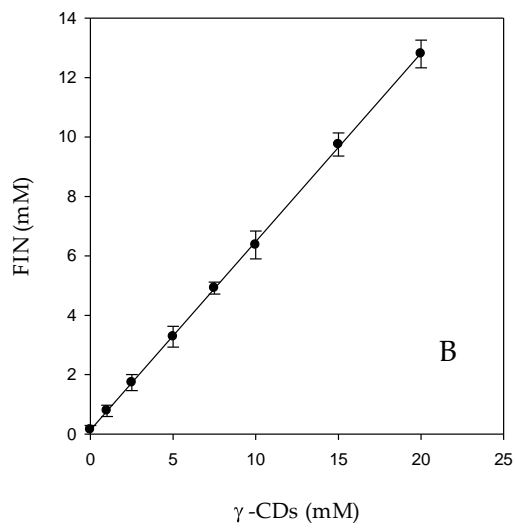
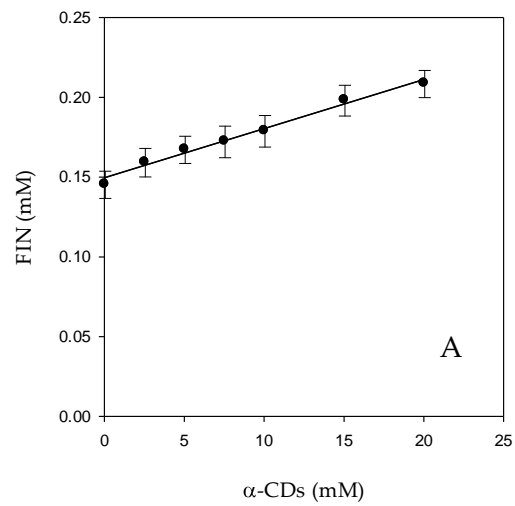


Figura IV.3: Diagramas de fases de FIN con α -CDs (●) (A), y γ -CDs (●) (B).

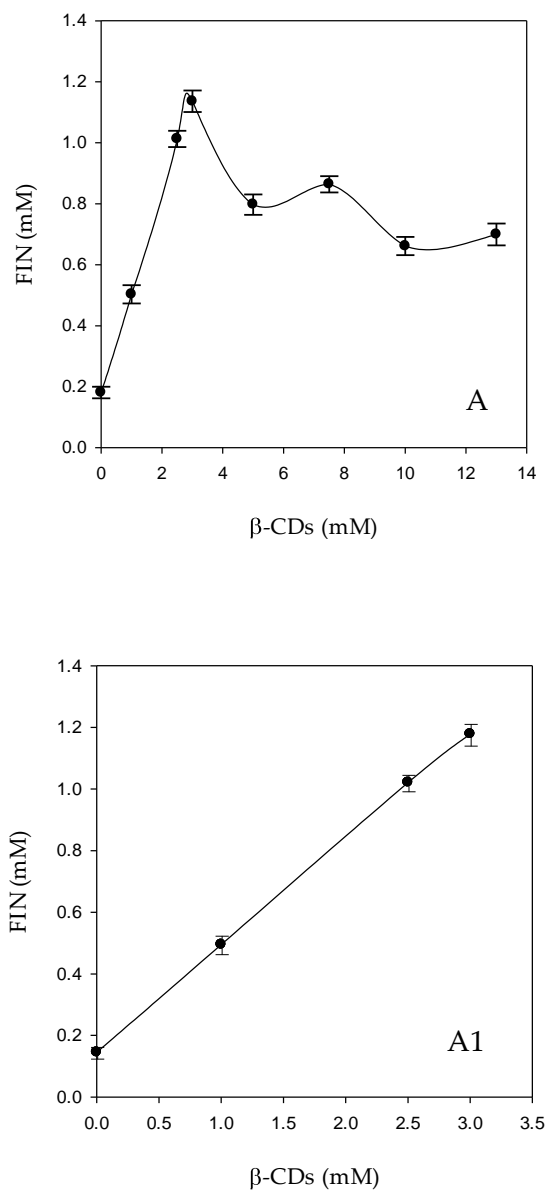


Figura IV.4: Diagramas de fases de FIN con β -CDs (\bullet) (A) y detalle de la parte lineal de β -CDs (\bullet)(A.1).

El diagrama de fases obtenido fue de tipo A_L , con una pendiente de la recta inferior a 1 (0.0032), indicando que la estequiometría de los complejos formados era 1:1 (Higuchi and Connors, 1965; López-Miranda y col, 2018). Este bajo incremento en la solubilidad acuosa de FIN indicó que, debido al pequeño tamaño de la cavidad interna de las α -CDs, la formación de complejos de inclusión es muy reducida. Estos resultados coinciden con los publicados previamente para los ácidos oleanólico (OA) y maslínico (MA), cuyo tamaño de molécula es similar al de FIN. Tanto OA como MA también presentaban muy poca capacidad para formar complejos de inclusión con α -CDs (López-Miranda y col, 2018).

En el caso de β -CDs, los resultados obtenidos fueron muy diferentes (**Figura IV.4**). En este caso, el diagrama de fases obtenido fue de tipo Bs (Higuchi y Connors, 1965), lo que indicaba una limitada solubilidad para los complejos formados (FIN- β -CDs). La concentración de FIN aumentó linealmente con la concentración de β -CDs hasta alcanzar una concentración máxima de 1.20 mM de FIN con 3 mM de β -CDs. A concentraciones de β -CDs por encima de 3 mM, la concentración de FIN disminuyó hasta alcanzar un valor constante alrededor de 0.7 mM, siendo este valor el límite de solubilidad acuosa de los complejos FIN- β -CDs. Este fenómeno podría explicarse por la formación de agregados con alto peso molecular que precipitan por encima de 3 mM de CDs. El tramo lineal observado de 0 a 3 mM de β -CDs (**Figura IV.4 A.1**), con un valor de pendiente por debajo de la unidad (0.35), indicó la formación de complejos con estequiometría 1:1 en este tramo. De forma general, este diagrama de fases tipo Bs es característico para la inclusión de diferentes compuestos en β -CDs (Anwer y col, 2014; L.-J. Yang y col, 2013) sin embargo, nuestro grupo de investigación ha descrito, recientemente, diagramas de fases de tipo Bs para los complejos formados entre OA y OM con γ -CDs (López-Miranda y col., 2018).

Por último, el diagrama de fases de FIN con γ -CDs volvió a mostrar un comportamiento lineal, con un valor de la pendiente de 0.59 (**Figura IV.3 B**). La concentración de FIN aumentó linealmente y de forma significativa con el aumento de la concentración de γ -CDs (de 0.145 mM (S_0) a 13 mM con 20 mM de γ -CDs). El

diagrama de fases obtenido fue de tipo A_L , con una pendiente inferior a 1 indicando nuevamente una estequiometría 1:1 para los complejos formados.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se pudo concluir que α -CDs quedaban descartadas como agentes complementes para aumentar la solubilidad acuosa de FIN, debido al escaso incremento observado. Igualmente, en base a los resultados obtenidos, se decidió estudiar el efecto de la complejación con diferentes tipos de CDs modificadas derivadas de β - o γ -CDs (HP- β -, HP- γ -, Methyl- β - y Methyl- γ -CDs) en la solubilidad acuosa de FIN. La **Figura IV.5** muestra los diagramas de fases obtenidos para la complejación de FIN con los cuatro tipos de CDs modificadas seleccionadas.

Tal y como cabía esperar, al utilizar CDs modificadas, en todos los casos, se obtuvieron diagramas de fases de tipo A_L (**Figura IV.5**), como se ha observado anteriormente para la complejación de otros muchos fármacos (Hadžiabdić y col, 2012b; Tang y col., 2015). En la **Figura IV.5 A**, se observa cómo entre las dos HP-CDs modificadas, las HP- γ -CDs (○) provocaron un aumento en la solubilidad de FIN mayor que el experimentado en presencia de las HP- β -CDs (●). En el caso de las CDs metiladas, también las Methyl- γ -CDs (○) aumentaron la solubilidad de FIN más que las Methyl- β -CDs (●) (**Figura IV.5 B**). Estos resultados eran los esperados puesto que las γ -CDs nativas también aumentaron la solubilidad de FIN más que las β -CDs nativas (**Figura IV.3 B** y **IV.4 A.1**).

Con el fin de comparar la fuerza de interacción entre FIN y cada uno de los tipos de CDs estudiadas, se calcularon los valores de las constantes de complejación (K_c) de la porción lineal de cada diagrama de fases, con la **Ecuación III.1** de Materiales y Métodos, descrita por Higuchi y Connors, 1965. Los resultados obtenidos se representan en la **Tabla IV.1**.

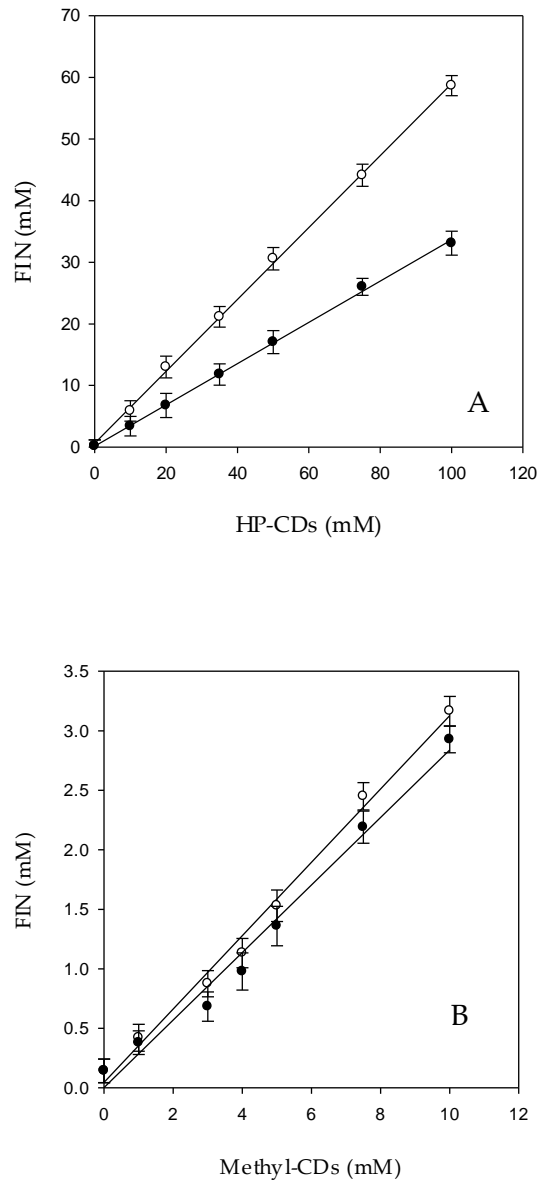


Figura IV.5: Diagrama de fases de FIN con HP-β- (●) y HP-γ-CDs (○) (A), y con Methyl-β- (●) y Methyl-γ-CDs (○) (B).

Tabla IV.1: Estudio de solubilidad de FIN con diferentes tipos de CDs. Constantes de complejación (K_c), coeficientes de correlación de los diagramas de fases (R^2), eficacia de complejación (CE) y relación molar (MR).

Tipo de CDs	$K_c(M^{-1})$	R^2	CE	MR
α -CDs	20±0.002	0.982	0.003	1:334
β -CDs	3972±18	0.999	0.6	1:3
γ -CDs	9687±51	0.999	1.5	1:2
HP- β -CDs	3351±18	0.999	0.5	1:3
HP- γ -CDs	7650±365	0.988	1.1	1:2
Methyl- β -CDs	2700±8	0.999	0.4	1:4
Methyl- γ -CDs	3163±68	0.986	0.5	1:3

^aDatos obtenidos por triplicado \pm SD, n=3

Entre las CDs nativas, el valor de K_c más elevado se obtuvo para γ -CDs (9687 \pm 51 M^{-1}). Este valor fue 2.4 veces mayor que el obtenido para β -CDs (3972 \pm 18 M^{-1}) y 484 veces superior al obtenido para α -CDs (20 \pm 0.002 M^{-1}). Con respecto a las CDs modificadas, los valores de K_c obtenidos fueron inferiores a los obtenidos para sus correspondientes CDs nativas. Comparando las K_c obtenidas para β - y sus CDs modificadas, HP- β - y Methyl- β -CDs, es importante destacar que los tres valores de K_c fueron similares, pero disminuyeron ligeramente con la presencia de grupos hidroxipropilo, así como con la presencia de grupos metilo sustituyendo a los OH de la β -CDs parentales, (β -CDs 3972 \pm 18 M^{-1} , HP- β -CDs 3351 \pm 18 M^{-1} y Methyl- β -CDs 2700 \pm 8 M^{-1}), siendo el valor de K_c más alto el obtenido para las β -CDs nativas (Tabla IV.1). El valor de K_c obtenido para HP- β -CDs es similar al calculado por (T. Loftsson y col, 2007) (4464 M^{-1}) y es mayor que el descrito por (Asbahr y col, 2009) (673 M^{-1}). Además, comparando el valor de K_c para FIN- β -CDs con el obtenido para otros fármacos con estructura similar, por ejemplo, prednisolona (3600 M^{-1}) (Uekama y col, 1983), las constantes obtenidas tuvieron valores muy similares.

Con respecto a los valores de K_c obtenidos para γ -CDs y sus modificadas, HP- γ - y Methyl- γ -CDs, disminuyeron cuando se modificó γ -CDs nativa añadiendo grupos hidroxipropil o grupos metilo (**Tabla IV.1**). El valor de K_c descrito para HP- γ -CDs fue $7650 \pm 365 \text{ M}^{-1}$ y para Methyl- γ -CDs $3163 \pm 68 \text{ M}^{-1}$, ambos inferiores al obtenido para γ -CDs ($9687 \pm 51 \text{ M}^{-1}$), lo que indica que la presencia de grupos hidroxipropilo o metilo dificultan la entrada de FIN en la cavidad hidrofóbica de γ -CDs. No hay estudios en la literatura acerca de la complejación de FIN con γ -CDs o con sus derivadas, por lo que estos resultados no pudieron ser comparados. Sin embargo, sí existen estudios en la literatura que describen la complejación de otros fármacos con γ -CDs, como anfotericina B (Jansook y col., 2016), glaucocalyxin A (C. Zhang y col, 2015), gemfibrozilo (Fernández y col, 2008), irbesartan o hidrocortisona (Muankaew y col, 2017).

Los valores de K_c ponen de manifiesto la afinidad de la molécula huésped con las CDs, sin embargo, Loftsson y sus colaboradores en 1996, determinaron un parámetro más preciso para evaluar el efecto solubilizante de las CDs sobre el producto encapsulado: la CE, que representa la proporción molar entre la concentración de complejo disuelto y concentración de CDs libres en disolución. Para complejos con estequiometría 1:1, este parámetro puede ser calculado a partir de la pendiente de los diagramas de fases utilizando la **Ecuación III.2** descrita en Materiales y Métodos, y es independiente de la solubilidad en agua de la molécula huésped (S_0) (T. Loftsson y col., 2007). Es más preciso comparar los valores de CE que los de K_c cuando se analiza el comportamiento de distintos tipos de CDs en la complejación de un sólo fármaco.

Los valores de CE obtenidos para FIN con los diferentes tipos de CDs utilizadas en este estudio se muestran en la **Tabla IV.1**. Como se puede observar en la **Tabla IV.1**, γ - y HP- γ -CDs presentaron los valores más altos de CE (1.5 y 1.1, respectivamente). En ambos casos, el valor superior a 1, indicó que la cantidad de CDs que estaban en disolución formando complejos con FIN era mayor que la concentración de CDs libres en la solución. El resto de CDs analizadas presentaron valores de CE inferiores a 1, siendo α -CDs las que presentaron el valor de CE más bajo (0.003) (**Tabla IV.1**), lo que indica que este tipo de CDs no aumentaron la

solubilidad de FIN de forma significativa. En el caso de HP- β -CDs el valor de CE obtenido fue de 0.5, similar al determinado por Loftsson y sus colaboradores en 2007 (0.6) y fue superior al obtenido por Asbahr y col, 2009 (0.09).

A partir de los valores de CE y aplicando la **Ecuación III.3** de Materiales y Métodos, se pudo calcular la relación molar (MR) entre FIN y las CDs presentes en la disolución FIN: CDs (**Tabla IV.1**). Los valores de MR obtenidos estuvieron situados entre 1:2 y 1:4 en todos los casos, excepto para α -CDs (1:334). Las CDs más eficaces en la complejación de FIN fueron γ - y HP- γ -CDs. En ambos casos, una de cada dos moléculas de CDs en solución estaba formando complejos solubles con FIN, tal como indican sus valores de MR (1:2) (**Tabla IV.1**). Por el contrario, las CDs menos eficaces en la formación de complejos de inclusión con FIN fueron α -CDs, que mostraron un valor de MR de 1:334, lo cual indica que sólo 1 de cada 334 moléculas de CDs en solución estaba formando complejos solubles con FIN.

Por tanto, γ - y HP- γ -CDs fueron las CDs más eficaces para formar complejos de inclusión estables con FIN y aumentar su solubilidad acuosa.

1.2.3. Estudio del efecto del pH y la temperatura sobre la complejación de FIN

El pH y la temperatura del medio de reacción, son parámetros que pueden influir en el proceso de encapsulación de FIN con los dos tipos de CDs más efectivas en la complejación de FIN: γ - y HP- γ -CDs.

En primer lugar, se estudió la influencia del pH (de 3.0 a 9.0) y la temperatura (de 4 a 65°C) en la solubilidad de FIN (S_0). Tal y como se observa en los resultados presentados en la **Tabla IV.2**, ni el pH ni la temperatura tuvieron efecto sobre la solubilidad de FIN, oscilando los valores de S_0 desde 142 ± 6 a 156 ± 8 μ M (aprox. 0.055 mg/mL), similares a los descritos en la literatura (Asbahr y col, 2009) y (Thorsteinn Loftsson y col, 2007).

Para estudiar la influencia del pH en la complejación de FIN con γ - y HP- γ -CDs, se elaboraron diagramas de fases a distintos pHs, abarcando desde pH ácido hasta pH básico (3.0, 5.5 y 9.0). En los tres casos, los perfiles de solubilidad de FIN obtenidos fueron de tipo A_L y los complejos formados tenían una estequiometría 1:1. Se calcularon los valores de K_c y CE en todos los casos y se muestran en la **Tabla IV.2**. Para ambos tipos de CDs (γ - y HP- γ -CDs) el valor de K_c más alto obtenido fue a pH fisiológico (5.5) (12368 ± 386 y 11716 ± 67 M^{-1} , respectivamente), mientras que a pH ácido o básico los valores de K_c fueron menores. Además, el valor de CE más alto obtenido también fue a pH 5.5 en ambos casos (1.8 y 1.7 para γ - y HP- γ -CD, respectivamente), manteniéndose constante la MR, 1:2 en ambos casos (**Tabla IV.2**). Con respecto a la influencia de la temperatura en la complejación de FIN con γ - y HP- γ -CDs, el estudio se llevó a cabo a tres temperaturas distintas: 4, 25 y 65°C. Los resultados obtenidos mostraron que el valor de K_c y de CE disminuyeron con la temperatura (**Tabla IV.2**). Los valores de K_c disminuyeron de 10435 ± 38 M^{-1} a 8472 ± 28 M^{-1} para γ -CDs y de 8008 ± 586 M^{-1} a 6944 ± 28 M^{-1} para HP- γ -CDs. En el caso de CE, como se puede observar en la **Tabla IV.2**, los valores obtenidos disminuyeron de 1.6 a 1.5 para γ -CDs y de 1.2 a 1.1 para HP- γ -CDs, indicando que un incremento de la temperatura, ni aumenta la S_0 de FIN ni favorece su atrapamiento en la cavidad hidrofóbica de las CDs.

La disminución de K_c y CE no fue suficiente para afectar al MR, permaneciendo constante (1:2) en todos los casos (**Tabla IV.2**).

Tabla IV.2: Estudio de solubilidad de FIN con γ - y HP- γ -CDs. Efecto de la temperatura y el pH en: la solubilidad acuosa (S_0), constante de complejación (K_c), coeficiente de correlación del diagrama de fases (R^2), eficacia de complejación (CE) y relación molar (MR).

Tipo de CDs		$S_0(\mu\text{M})$	$K_c(\text{M}^{-1})$	R^2	CE	MR	
γ -CDs	T(°C)	4	150±2	10435±138	0.999	1.6	1:2
		25	150±3	9687±151	0.999	1.5	1:2
		65	156±8	8482±228	0.999	1.3	1:2
	pH	3	155±5	10194±194	0.998	1.6	1:2
		5.5	142±6	12368±386	0.995	1.8	1:2
		9	144±7	9889±370	0.999	1.5	1:2
HP- γ -CDs	T(°C)	4	150±2	8008±586	0.978	1.2	1:2
		25	150±3	7650±365	0.988	1.1	1:2
		65	156±8	6944±270	0.991	1.1	1:2
	pH	3	155±5	7204±392	0.989	1.1	1:2
		5.5	142±6	11716±67	0.999	1.7	1:2
		9	144±7	8243±352	0.985	1.2	1:2

1.2.4. Análisis de los parámetros termodinámicos del proceso de complejación

Por otro lado, a partir de los diagramas de fases obtenidos para FIN con γ - y HP- γ -CDs, realizados a 4, 25 y 65°C, se calcularon los parámetros termodinámicos del proceso de encapsulación. Los resultados se representan en la **Tabla IV.3** y **IV.4**, que recogen los datos acerca de la energía libre de Gibbs ($\Delta G^{\circ}\text{tr}$).

La variación de energía libre de Gibbs ($\Delta G^{\circ}\text{tr}$) representa la energía libre de transferencia de un compuesto, desde el agua a la cavidad interna de las CDs y proporciona información sobre si la reacción es favorable o desfavorable. Los valores de $\Delta G^{\circ}\text{tr}$ con concentraciones crecientes de CDs se calcularon utilizando la **Ecuación III.4** de Materiales y Métodos (Hadžiabdić y col., 2012b) (**Tabla IV.3**).

Tabla IV.3: Energía de transferencia libre de Gibbs (ΔG_{tr}^0) del proceso de solubilización de FIN a 4, 25 y 65° a distintas concentraciones de CDs (mM). Parámetros termodinámicos: variación estándar de energía libre (ΔG^0), variación estándar de entalpía (ΔH^0) y variación estándar de entropía (ΔS^0).

Tipo de CDs	ΔG_{tr}^0 (kJ/mol)			
	mM	4°	25°	65°
γ -CDs	5.0	-3.86	-4.14	-4.71
	10.0	-5.35	-5.80	-6.57
	15.0	-6.27	-6.74	-7.65
	20.0	-6.92	-7.45	-8.46
HP- γ -CDs	10.0	-7.2	-7.74	-8.78
	50.0	-9.4	-10.03	-11.33
	75.0	-10.1	-10.71	-12.03
	100.0	-10.4	-11.32	-12.92

Tabla IV.4: Parámetros termodinámicos del proceso de solubilización de FIN a 4, 25 y 65° a distintas concentraciones de CDs (mM). Variación estándar de energía libre (ΔG^0), variación estándar de entalpía (ΔH^0) y variación estándar de entropía (ΔS^0).

	ΔG^0 (kJ/mol)	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (J/mol)
γ -CDs	-22.74	-2.657	67.41
HP- γ -CDs	-22.16	-1.837	68.20

Los valores negativos obtenidos en todos los casos, indicaron la inclusión espontánea de FIN para ambos tipos de CDs (γ - y HP- γ -CDs), siendo más favorecida la reacción al aumentar la concentración de CDs. En la bibliografía se han descrito resultados similares para otros fármacos como diazepam o nitrazepam

(Hadžiabdić y col, 2012b) y otros compuestos de estructura similar a FIN, OA y MA (López-Miranda y col, 2018).

En cuanto a los valores de entalpía (ΔH°) y de entropía (ΔS°) fueron diferentes para γ -CDs nativas (-2.657 KJ/mol y 67.41 J/mol, respectivamente) y HP- γ -CDs modificadas (-1.837 KJ/mol y 68.20 J/mol) (**Tabla IV.4**). Los resultados obtenidos mostraron que la presencia del grupo hidroxipropilo en las HP- γ -CDs provocó un aumento en ambos parámetros termodinámicos. Sin embargo, la variación en ΔH° fue compensada por una alta ΔS° y no supuso prácticamente ninguna variación en ΔG° (-22.74 kJ/mol para γ -CDs y -22.16 kJ/mol para HP- γ -CDs) (**Tabla IV.4**). Los valores negativos de ΔG° indicaron que la complejación de FIN con ambos tipos de CDs (γ - y HP- γ -CDs) es espontánea. Por otro lado, los valores cercanos a cero de ΔH° y los mayores valores positivos de ΔS° concuerdan con una clásica interacción hidrofóbica entre FIN y CDs. Por otra parte, el tamaño de la cavidad hidrofóbica de las γ -CDs (nativas y modificadas), es demasiado grande como para resultar significativa la influencia de las interacciones de van der Waals (T. Loftsson & Brewster, 1996). Estos resultados también son similares a los obtenidos para la complejación con γ - y HP- γ -CDs de OA y MA (López-Miranda y col, 2018), y para las sales biliares (Køhler y col, 2016).

1.2.5. Caracterización molecular de los complejos FIN-CDs mediante el estudio supramolecular de sus estructuras

1.2.5.1 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Con el objetivo de obtener información conformacional acerca del proceso de complejación, se llevó a cabo el análisis de RMN. Con él pudimos corroborar las interacciones establecidas entre FIN y ambos tipos de CDs que evidenció la inclusión de FIN en el interior hidrofóbico de las CDs. Los átomos de H del exterior de las CDs no evidencian cambios en su posición, sin embargo, los H situados en

el interior experimentan desplazamientos para permitir el acoplamiento de FIN en el interior hidrófobo.

La **Tabla IV.5** recoge los datos obtenidos de este ensayo donde quedan reflejados el desplazamiento químico del protón (δ), expresado en ppm, de FIN, FIN- γ -CDs y FIN-HP- γ -CDs, en la solución de agua deuterada D₂O, así como las diferencias entre las señales de las moléculas libres y encapsuladas.

El espectro ROESY mostró una correlación apreciable del protón H-9 de FIN (desplazamiento 2.128 ppm) con los protones H-3 y H-5 de γ -CDs ($\Delta\delta = -0.5$ ppm) y de HP- γ -CDs ($\Delta\delta = 0.044$ ppm) (**Tabla IV.5**). También, fueron significativos los desplazamientos químicos de los hidrógenos en FIN (dobletes a 5.676 y 6.875 ppm, para H-6 y 7, respectivamente) con respecto a los producidos en los complejos FIN- γ -CDs (dobletes a 5.622 y 6.700 ppm, para los lugares H-6 y 7, respectivamente) y para los obtenidos en los complejos de inclusión de FIN con HP- γ -CDs (dobletes a 5.84 y 6.878 ppm, para H-6 y H-7, respectivamente).

Además, las diferencias en los desplazamientos químicos en el grupo metilo (singlete a 0.885 ppm), y en el protón H-8 ligado al nitrógeno en el anillo de lactamas (doblete a 6.846 ppm), mostraron una interacción significativa entre γ -CDs y HP- γ -CDs con el primer anillo de la estructura FIN, que contiene un carbonilo conjugado. Con respecto al lado opuesto del espectro, también se observaron importantes desplazamientos para los hidrógenos del metilo y terc-butil (singletes a 0.620 y 1.252 ppm, para H-4 y H-1, respectivamente), lo que demuestra que FIN estaba situado en la cavidad interna de ambas CDs, con una relativamente buena penetración.

Tabla IV.5: ^1H NMR desplazamiento químico del protón (ppm) de FIN. Representados los protones (H) más significativos antes y después de la formación de los complejos de inclusión en el espectro de RMN.

H ubicación	FIN	FIN/ γ -CDs	$\Delta\delta$	FIN/HP- γ -CDs	$\Delta\delta$
4	0.620	0.474	-0.146	0.640	0.020
5	0.885	0.784	-0.101	0.904	0.019
1	1.252	1.133	-0.119	1.291	0.039
9	2.128	2.078	-0.500	2.172	0.044
3	3.235	3.136	-0.099	3.230	0.005
2	5.660	5.639	-0.021	5.668	0.008
6	5.676	5.622	-0.054	5.684	0.008
8	6.846	6.649	-0.197	6.862	0.016
7	6.875	6.700	-0.175	6.878	0.003

Los resultados obtenidos confirmaron la estequiometría 1:1 para los complejos formados. Además de determinar los desplazamientos químicos, se llevó a cabo un estudio de espectroscopía bidimensional de RMN (RMN-2D) que permite establecer la proximidad espacial entre la CDs y el huésped en cada caso, mediante la observación de las correlaciones cruzadas (**Figura IV.6**).

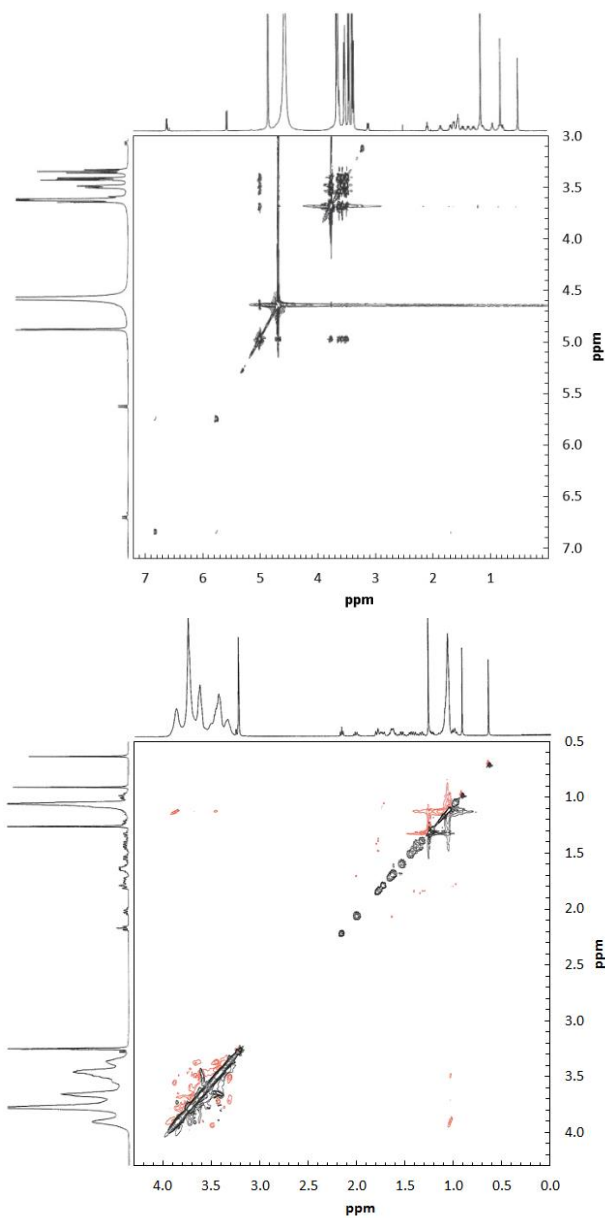


Figura IV.6: NMR 2D FIN- γ -CDs (imagen superior) y FIN-HP- γ -CDs (imagen inferior).

1.2.5.2 Modelado molecular

Para obtener más detalles sobre cómo FIN interactúa con ambas CDs (γ - y HP- γ -CDs), se llevaron a cabo simulaciones de acoplamiento molecular (Docking), y para ello se utilizó la forma neutral de FIN como estructura óptima para el proceso (**Figura IV.7**).

Como se ha señalado anteriormente, en ese enfoque FIN fue considerado como una entidad flexible que "busca" la conformación más estable en términos de energía de interacción dentro de las CDs. Los resultados de los modelos de simulación de acoplamiento del sistema sustrato-CD, proporcionaron información útil sobre la estabilidad del complejo, ya que los modelos teóricos utilizados en los cálculos de acoplamiento proporcionan predicciones significativas para este fenómeno de complejación con un balance razonable de exactitud/coste-computacional, especialmente cuando se observa un orden o clasificación relativos a las constantes de complejación entre los diferentes compuestos en lugar de valores absolutos de las energías de interacción. En este caso FIN entra en la cavidad interna de ambas CDs (γ - y HP- γ -CDs) localizando fuertes interacciones entre los protones que rodean al carbonilo de la lactama (H-9 y el H-8 del grupo amino) y los protones H-3 y H-5 de ambas CDs (**Figura IV.7**). En el panel superior esta interacción queda representada por el contacto establecido entre las dos partes blancas de cada una de las moléculas, siendo FIN la estructura dibujada en color rosa y γ -CDs la estructura predominantemente verde. En el panel inferior FIN es dibujada de color violeta y HP- γ -CDs representada mayoritariamente de color azul.

El heterociclo aromático queda ubicado en el interior hidrófobo con una relativa buena penetración por las interacciones establecidas entre los protones del grupo terc-butilo del amino unido al carbonilo en el lado opuesto de la molécula, anteriormente descrito. La presencia de este grupo voluminoso en la estructura de FIN induce a pensar en impedimentos estéricos en el acoplamiento molecular, sin embargo, la presencia de protones en los grupos metilo favorecen las interacciones entre FIN y ambas CDs contribuyendo a la estabilidad de las estructuras formadas.

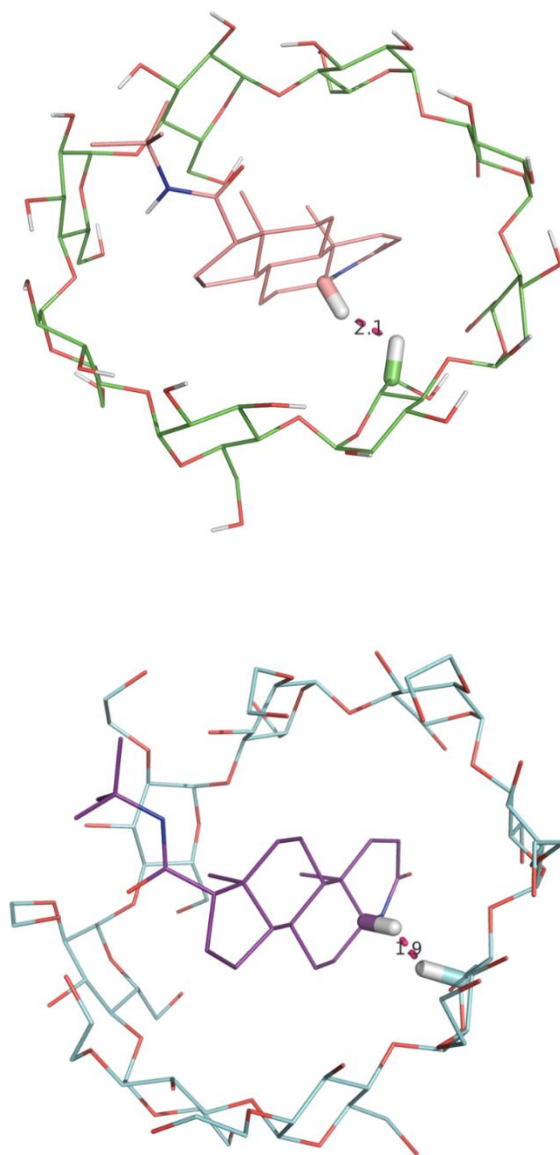


Figura IV.7: Resultados del acoplamiento de FIN- γ -CDs (panel superior) y de FIN-2HP- γ -CDs (panel inferior).

Este enfoque ha sido aplicado con éxito por muchos investigadores en el estudio de la complejación de distintas moléculas con diferentes CDs.

1.2.5.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Tras el proceso de complejación las moléculas incluídas en la cavidad de las CDs, sufren cambios en sus puntos de fusión, ebullición o sublimación. Por lo tanto, la técnica DSC se usa para reforzar la teoría de la formación de complejos.

En este sentido, mientras que la curva térmica de FIN mostró un pico endotérmico agudo a 259.7°C, que indica el punto de fusión del fármaco, característico de la sustancia pura anhidra (**Figura IV.8 a**), los termogramas DSC de γ - y HP- γ -CDs (**Figura IV.8 b, c**), mostraron un gran pico endotérmico entre 32 y 143°C (mínimo a 90.2°C) y entre 35 y 121°C (mínimo a 63.5°C) respectivamente, debido a la liberación del agua de la molécula.

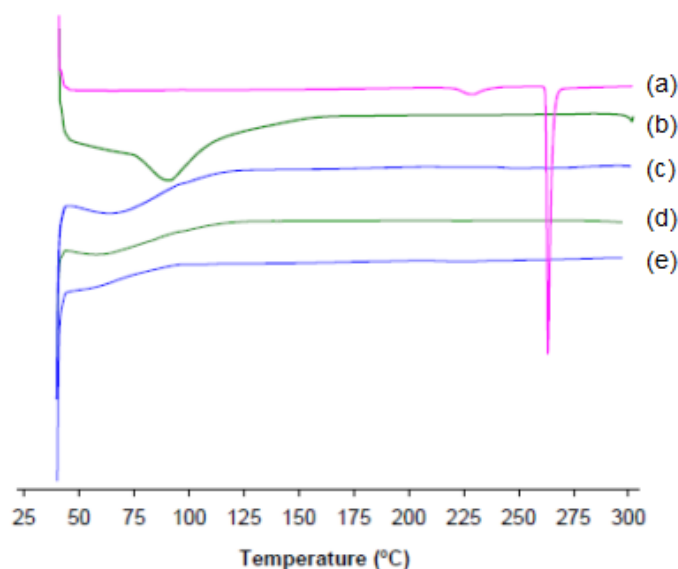


Figura IV.8: Termogramas DSC para (a) FIN, (b) γ -CDs, (c) HP- γ -CDs, (d) complejos de FIN- γ -CDs y (e) complejos de FIN-HP- γ -CDs.

Los termogramas d y e de la **Figura IV.8** muestran el comportamiento de FIN complejada en γ - y HP- γ -CDs, respectivamente. Se observa una reducción general de la intensidad de los picos amplios de ambas CDs, así como la desaparición completa del pico de fusión de FIN en ambos complejos. Estos resultados sugirieron la salida de moléculas de agua de la cavidad de las CDs y la inclusión completa de FIN en la misma durante el proceso de inclusión.

Los termogramas obtenidos para γ -, HP- γ -CDs mostraron dos regiones de pérdida de masa (**Figura IV.8** b y c). La primera, entre 25°C y 100°C se debió a la deshidratación, y ambas CDs muestran similares porcentajes de reducción de masa (8.2% y 7.5%, respectivamente). El segundo, entre 290°C y 343°C (exotérmico) se debió a la descomposición de los grupos orgánicos, con una pérdida de peso del 81.3% y 68.8%, respectivamente. En esta misma región del termograma se produce la volatilización de FIN, con un 70% de reducción de masa. En cuanto a los complejos FIN- γ -CDs y FIN-HP- γ -CDs, se encontraron pequeñas diferencias en cuanto a los respectivos termogramas de CDs vacías, con una pérdida de peso inferior al 1.7% en ambos casos en la primera región, lo que sugiere una reducción de las moléculas de agua en la cavidad interna de las CDs debida a la inclusión de FIN.

1.2.5.4. Espectroscopía de absorción infrarroja (IR)

Para completar el estudio de la caracterización molecular de la complejación de FIN en CDs, se utilizó la espectroscopia de absorción infrarroja (FT-IR), una técnica adecuada para evidenciar la formación de complejos de inclusión, debido a la desaparición de las vibraciones de flexión y estiramiento de la molécula huésped una vez complejada.

Como se puede observar en la **Figura IV.9**, A, el espectro IR de FIN revela bandas características de la amida como un pico intenso en el grupo carbonilo (C=O) a 1666 cm^{-1} debido al estiramiento y dos picos de N-H a 3428 cm^{-1} , de nuevo consecuencia del estiramiento de la molécula, y vibraciones de flexión (1600 cm^{-1}). Además, también se observan otros picos C-H estiramiento a 3115 cm^{-1} , C-N

estiramiento a 1363 cm^{-1} , C=C estiramiento a 1503 cm^{-1} y 1447 cm^{-1} , doble C-H a 687 cm^{-1} , doble C-N-H a 2835 cm^{-1} , y por último, un intenso doble =C-H saliendo del plano a 813 cm^{-1} . Además, FIN mostró las vibraciones características del movimiento del grupo *terc*-butilo, mostrando tres señales para el CH_3 , una se duplicó a 1383 cm^{-1} , y las otras dos aparecieron a 1257 cm^{-1} y 1218 cm^{-1} .

Aunque los espectros de γ - y HP- γ -CDs mostraron un perfil similar (**Figura IV.9 B, C**), incluidos los grupos funcionales análogos, se encuentran pequeñas diferencias en las HP- γ -CDs debido a la presencia de grupos metilo, mostrando una vibración asimétrica del $-\text{CH}_3$ a 2972 cm^{-1} . Ambos tipos de CDs presentaron amplias y prominentes vibraciones de estiramiento de O-H a 3270 cm^{-1} y 3326 cm^{-1} respectivamente, mientras que las vibraciones de flexión de O-H aparecieron a 1641 cm^{-1} para γ -CDs y 1645 cm^{-1} para HP- γ -CDs. El resto de los picos más representativos para γ - y HP- γ -CDs, aparecieron en la misma área de los espectros: las vibraciones de estiramiento de C-H (2925 cm^{-1} y 2926 cm^{-1} , respectivamente), las vibraciones de C-O (1151 cm^{-1} y 1149 cm^{-1} , respectivamente), las vibraciones de estiramiento de C-O-C (1018 cm^{-1} y 1017 cm^{-1} , respectivamente), el enlace α -glucosídico (858 cm^{-1} y 850 cm^{-1} , respectivamente) y las vibraciones de flexión de $-\text{CH}_3$ (1367 cm^{-1} y 1368 cm^{-1} , respectivamente).

El debilitamiento de los vínculos interatómicos cuando FIN se introdujo en el interior de γ - y HP- γ -CDs, es una evidencia inequívoca de la formación de los complejos de inclusión. Como resultado, su modo vibratorio de estiramiento y flexión es restringido, produciendo la desaparición, ampliación y/o cambios en la longitud de onda e intensidad máxima del espectro de FIN.

Como se puede ver en la **Figura IV.9 D, E**, la fuerte intensidad de la banda de estiramiento de C=O de FIN (1666 cm^{-1}) se redujo significativamente en el espectro del complejo y cambió ligeramente a una frecuencia más baja, 1655 cm^{-1} para FIN- γ -CDs (**Figura IV.9 D**) y 1656 cm^{-1} para FIN-HP- γ -CDs (**Figura IV.9 E**), lo que sugiere una importante interacción intermolecular entre el carbonilo conjugado del anillo lactámico de FIN con γ - y HP- γ -CDs en el complejo de inclusión.

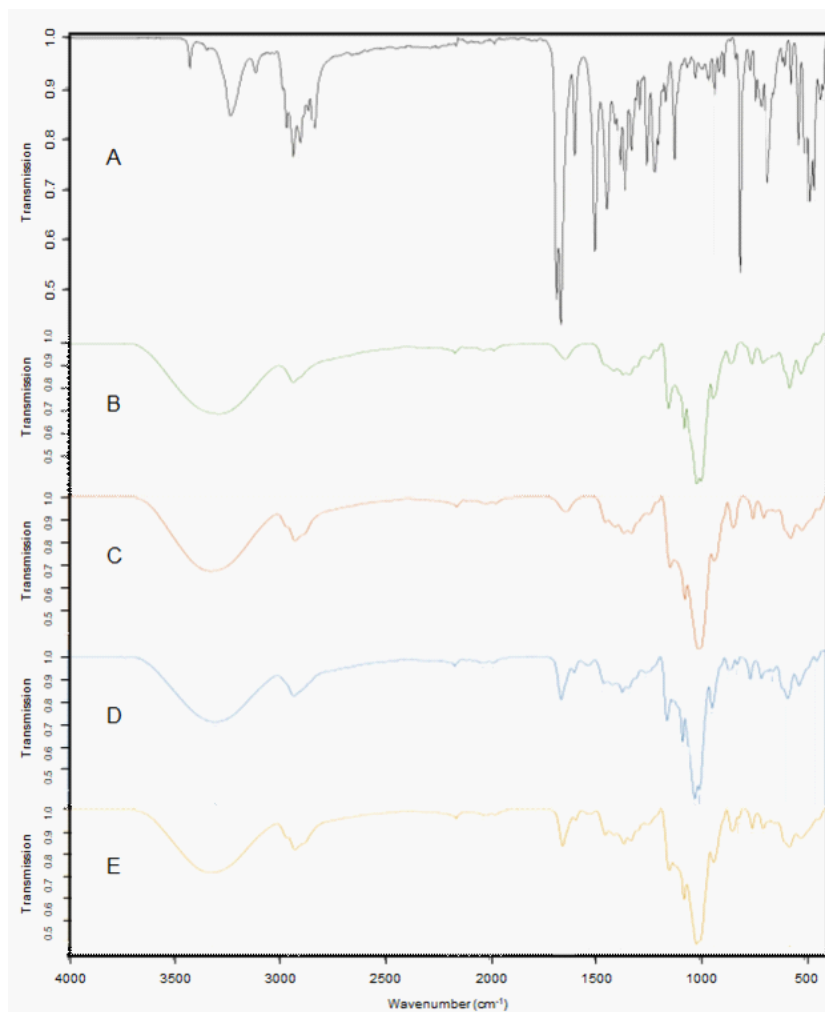


Figura IV.9: Espectro FT-IR de A) FIN, B) γ -CDs, C) HP- γ -CDs, D) complejos de inclusión de FIN- γ -CDs y E) complejos de inclusión de FIN- HP- γ -CDs.

Además, se observaron cambios en la longitud de onda y la intensidad máxima de N-H de FIN en las vibraciones de flexión y de estiramiento de C=C, observados en los complejos de FIN- γ -CDs (1593 cm⁻¹ y 1527 cm⁻¹, respectivamente) y FIN-HP- γ -CDs (1594 cm⁻¹ y 1532 cm⁻¹, respectivamente). La desaparición tanto de la banda de estiramiento de N-H como de las tres señales típicas del *terc*-butilo CH₃

de FIN, observadas en ambos complejos (**Figura IV.9 D, E**), indicó su posible inserción completa en la cavidad de γ - y HP- γ -CDs. El resto de las bandas de FIN fueron completamente oscurecidas por intensas y amplias bandas de CDs. Además, las señales de los espectros tanto para los complejos de FIN- γ -CDs como los complejos de FIN-HP- γ -CDs (**Figura IV.9 D, E**), se desplazaron ligeramente con respecto a las señales de los compuestos libres (**Figura IV.9 B, C**), lo cual es una evidencia acerca de las interacciones.

1.2.5.5. Caracterización morfológica

Finalmente se estudió la morfología de las muestras mediante microscopía electrónica de barrido. La **Figura IV.10** muestra micrografías SEM de las partículas en estado sólido de FIN, γ -CDs y HP- γ -CDs, y de los complejos sólidos obtenidos mediante secado por atomización de los complejos en solución FIN- γ -CDs y FIN-HP- γ -CDs.

Las partículas de FIN presentaron una imagen muy homogénea (**Figura IV.10 a**) formada por partículas discretas de hasta 10 μm . En cuanto a las CDs, aunque ambos tipos, γ - y HP- γ -CDs, formaron partículas grandes y discretas con un tamaño entre 40 y 50 μm , γ -CDs presentaron formas irregulares (**Figura IV.10 b**) similares a la figura geométrica de un paralelogramo, mientras que HP- γ -CDs (**Figura IV.10 c**) formaron partículas con forma esférica, con numerosos pliegues y abolladuras en la superficie, que concuerdan con las características geometrías típicas de los materiales sometidos a secado por atomización.

En el caso de los complejos FIN- γ - y FIN-HP- γ -CDs (**Figura IV.10 d, e**), la morfología original de los componentes por separado desapareció y las partículas sólidas mostraron superficies, siendo el aspecto más destacado de los complejos de FIN- γ -CDs, que muestran una distribución del tamaño de partícula uniforme, en su mayoría cercana a 10 μm , sin agregación, lo que sugiere una buena re-dispersión en el agua.

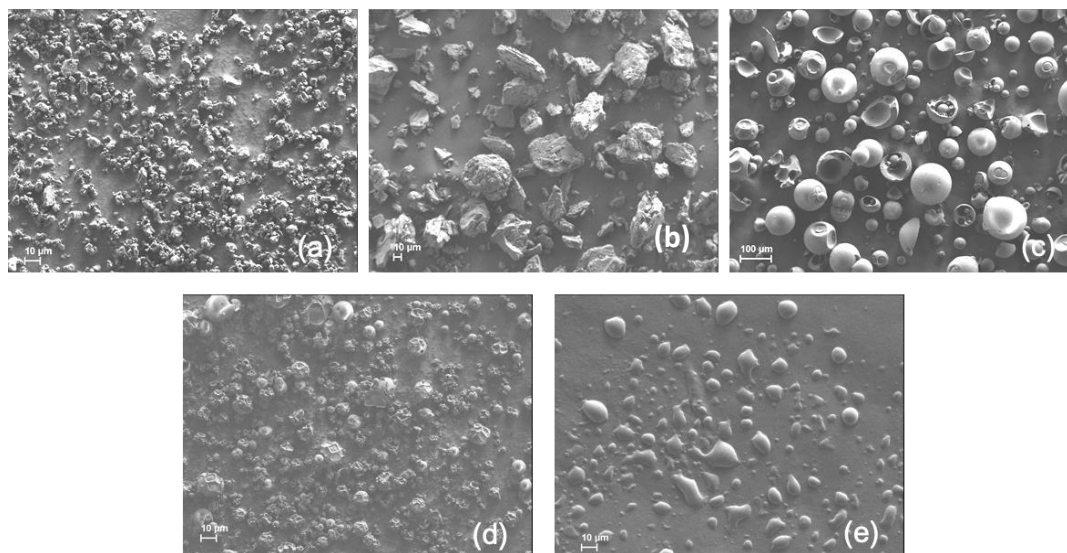


Figura IV.10: Imágenes micrográficas obtenidas por microscopio electrónica de barrido de FIN -500 x (a), γ -CDs -250 x (b), HP- γ -CDs -100 x (c), FIN-HP- γ -CDs -500 x (d) y FIN- γ -CDs -500 x (e).

Los parámetros como el tamaño de partícula y la distribución del tamaño de partícula para FIN, γ - y HP- γ -CDs, así como para ambos tipos de complejos de FIN con γ -CDs y HP- γ -CDs se muestran en la **Tabla IV.6**.

En general, ambos complejos mostraron una distribución homogénea del tamaño de partícula que queda reflejada en el valor span (**Tabla IV.6**).

Por último, cabe señalar que las muestras de FIN- γ -CDs y FIN-HP- γ -CDs mostraron un diámetro medio de partículas ligeramente inferior (22.7 y 9.86 μm , respectivamente) al obtenido para cada tipo de CDs por separado, γ -CDs (28.5 μm) y HP- γ -CDs (46.6 μm) (**Tabla IV.6**), resultados que se correlacionaron con los resultados mostrados en las imágenes del SEM (**Figura IV.10**).

Tabla IV.6: Distribución del tamaño de partícula de FIN, γ - y HP- γ -CDs y de sus respectivos complejos en estado sólido.

Muestra	$D_{[4,3]}$ (μm)	D_{10}	D_{50}	D_{90}	Span
FIN	21.4	3.83	9.93	29.6	2.59
γ -CDs	28.5	2.15	25.5	60.1	2.27
FIN- γ -CDs	22.7	2.53	6.37	16.3	2.16
HP- γ -CDs	46.6	12.1	42.4	86.0	1.74
FIN-HP- γ -CDs	9.86	3.67	8.73	17.9	1.63

$D_{[4,3]}$: Diámetro medio de Broucker; $D_{10,50,90}$: diámetro volumétrico de las partículas que corresponde al 10%, 50%, y 90% de la población, respectivamente, Span: determinado de acuerdo a la Ecuación III.7.

V - DUTASTERIDA

1 - DUTASTERIDA

1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1 Dutasterida

DUT pertenece a la segunda generación de inhibidores de la enzima 5 α R, siendo 60 veces más potente que su análogo estructural FIN (Herz-Ruelas y col, 2020). Las reacciones adversas asociadas a su distribución sistémica y su largo periodo de permanencia (3-6 semanas) conducen a limitar su administración por vía oral. Es por ello que aún no se ha autorizado su uso para el tratamiento de la alopecia, y se investigan alternativas para su formulación destinada a la aplicación tópica para su efecto local.

Otro parámetro que influye en el desarrollo galénico de este compuesto es el elevado coste de la materia prima. Por tanto, son múltiples los beneficios perseguidos en el desarrollo de nuevas fórmulas, entre otros que permitan la reducción de la cantidad de principio activo manteniendo su actividad, reduciendo así el coste de la fórmula y minimizando las posibles reacciones adversas y el tiempo de eliminación.

El gran inconveniente para alcanzar este objetivo es su baja solubilidad acuosa (<0.038ng/mL) (M.-S. Kim, 2013), por ello, en este capítulo se ha estudiado el efecto de la complejación con CDs en la solubilidad acuosa de DUT. Concretamente, tras los resultados obtenidos en el capítulo anterior para FIN, el estudio se ha llevado a cabo solamente con γ -CDs y su derivada HP- γ -CDs

1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.2.1 Estudio de solubilidad

Basándonos en los resultados obtenidos para la complejación de FIN en el capítulo IV, y con el propósito de aumentar la solubilidad acuosa de DUT mediante el uso de CDs, se diseñaron estudios de solubilidad usando γ - y HP- γ -CDs, teniendo en cuenta la gran similitud estructural entre ambos compuestos (FIN y DUT). Por este mismo motivo se desestimó el estudio de la solubilidad acuosa de DUT en presencia de las restantes CDs nativas (α - y β -CDs), así como de sus respectivas modificadas. Estudios en la literatura refuerzan el planteamiento de trabajo propuesto, en los que se han obtenido los mejores resultados de aumento de solubilidad acuosa para DUT con γ -CDs, respecto a las otras dos CDs nativas y respecto a las modificadas HP- β -CDs (Min y col., 2019).

Los estudios de solubilidad en medio acuoso se realizaron en presencia de concentraciones crecientes de γ - y HP- γ -CDs, siguiendo el método descrito por Higuchi y Connors en 1965, con algunas modificaciones (Lucas-Abellán y col., 2008).

Tal y como se observa en la **Figura V.1**, la concentración de DUT se incrementó de forma lineal con la concentración de γ -CDs, pasando de 0.0024 mM (S_0) a 0.0832 mM con 20 mM de γ -CDs, indicando que DUT estaba siendo complejada en cavidad hidrofóbica de este tipo de CDs.

El diagrama de fases obtenido fue de tipo A_L , con un valor de pendiente inferior a 1 (0.0042), indicando que la estequiometría de los complejos de inclusión formados era 1:1 y con un elevado grado de solubilidad acuosa (**Figura V.1**). γ -CDs permite un aumento de la solubilidad acuosa de DUT de hasta 34 veces, respecto a su límite de solubilidad en ausencia de CDs, resultando este aumento inferior al obtenido en el caso de FIN (83 veces), descrito en el capítulo IV.

En la literatura hay estudios de solubilidad de DUT con distintas CDs en distintas formas: polímeros, dispersiones sólidas amorfas, nanoestructuras de HP- β -CDs que forman agregados con distintos aditivos (hidroxipropilmetilcelulosa, α -

tocoferol, polietilenglicol 1000 o succinato) aumentando de distinta forma su solubilidad (Beak & Kim, 2012; Choi y col, 2018; M.-S. Kim, 2013; Min y col.,, 2019).

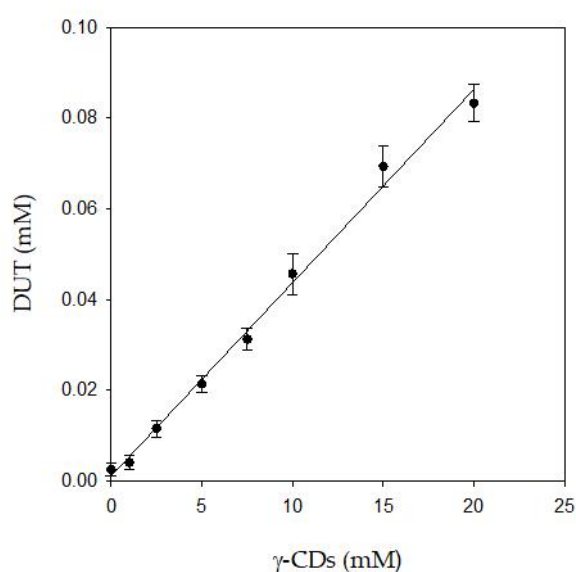


Figura V.1: Diagrama de fases de DUT con γ -CDs (●).

En ellos, obtuvieron conclusiones que concuerdan con nuestros resultados experimentales, donde γ -CDs ofrece los mejores resultados respecto de las CDs nativas, incluso mejores que los obtenidos para HP- β -CDs, siendo el incremento de solubilidad de DUT con γ -CDs 2.42 veces superior al obtenido con HP- β -CDs (Min y col, 2019). En el trabajo publicado por Min y col, en 2019, HP- β -CDs ofrecía un aumento de la solubilidad de DUT de 1.07 veces mayor que su nativa β -CDs. Por otro lado, no ha sido posible comparar los resultados obtenidos en esta tesis con HP- γ -CDs, al no encontrar artículos publicados sobre este tipo de CDs y DUT.

Cuando se estudió la complejación de DUT con HP- γ -CDs se observó que, la concentración de DUT aumentaba linealmente, conforme lo hacía la concentración de HP- γ -CDs, pasando de 0.0024 mM (S_0) a 0.6 mM con 100 mM de HP- γ -CDs,

obteniendo un diagrama de fase tipo A_L con una pendiente inferior a 1 (0.0055) (**Figura V.2**). Este resultado indicaba que la estequiometría de los complejos formados era 1:1 y el incremento de solubilidad acuosa de DUT a 100 mM de HP- γ -CDs fue de 250 veces, resultado inferior al descrito en el capítulo IV para FIN (324 veces).

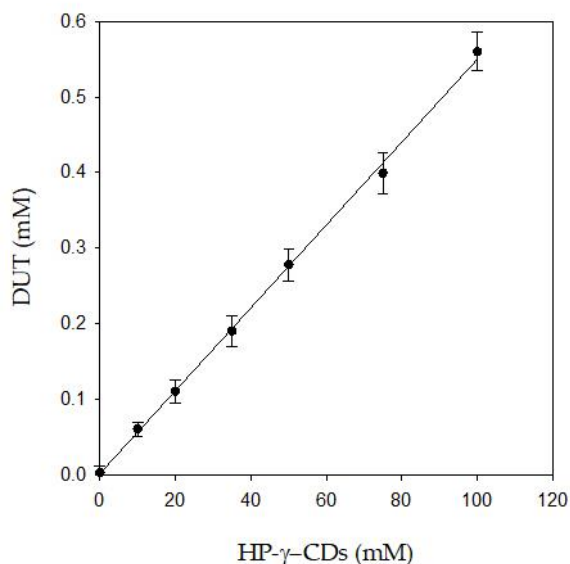


Figura V.2: Diagrama de fases de DUT con HP- γ -CDs (●).

1.2.2 Cálculo de K_c , CE y MR

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de solubilidad, pudimos calcular los valores de constantes de K_c , CE y MR de DUT con los dos tipos de CDs estudiados (**Tabla V.1**).

El valor de K_c para γ - y HP- γ -CDs fue calculada aplicando la **Ecuación III.1** descrita en Materiales y Métodos.

Tabla V.1: Estudio de solubilidad de DUT con diferentes tipos de CDs. Constante de complejación (K_c), coeficiente de correlación del diagrama de fases (R^2), eficacia de complejación (CE) y relación molar (MR).

Tipo de CDs	$K_c(M^{-1})$	R^2	CE	MR
γ -CDs	1718 \pm 53	0.994	0.004	1:251
HP- γ -CDs	23784 \pm 118	0.974	0.057	1:19

El valor de K_c hace referencia a la estabilidad de los complejos formados y permite comparar la fuerza de interacción entre DUT y cada tipo de CDs. El valor de K_c obtenido para los complejos formados entre DUT y HP- γ -CDs ($K_c=23784\pm 118 M^{-1}$) fue 13.8 veces superior al obtenido para γ -CDs ($1718\pm 53 M^{-1}$) (**Tabla V.1**). Por lo tanto, la presencia de grupos hidroxilo sustituyendo los OH de las CDs, favorecen la inclusión de DUT en la cavidad interna de la CDs modificadas respecto de las nativas, formando complejos de inclusión más estables.

Para comparar la capacidad de distintos tipos de CDs a la hora de solubilizar un determinado compuesto, es más conveniente comparar el parámetro CE (**Ecuación III.2** de Materiales y Métodos), que hace referencia a concentración de CDs que se encuentran en disolución formando complejos respecto a la concentración de CDs libres en disolución.

Como podemos observar en la **Tabla V.1**, el valor de CE para DUT con γ -CDs y con HP- γ -CDs fue muy inferior a 1 (0.004 y 0.057, respectivamente), lo que indicaba que el número de CDs que está formando complejos es muy inferior al número de CDs libres en disolución.

Por lo tanto, y a la luz de los resultados obtenidos, podemos decir que HP- γ -CDs son 14 veces más eficaces que γ -CDs en la solubilización de DUT.

A partir del valor de CE también calculamos la relación molar (MR) entre DUT y cada uno de los tipos de CDs ensayadas, aplicando la **Ecuación III.3** descrita

en la sección de Materiales y Métodos. El valor de este parámetro refleja la proporción entre DUT: CDs (**Tabla V.1**). El valor de MR entre DUT y γ -CDs fue de 1:251, lo que indicaba que solo 1 de cada 251 moléculas de CDs estaba formando complejos de inclusión con DUT solubles. En el caso de HP- γ -CDs, la MR con DUT fue de 1:19, indicando que, en este caso, 1 de cada 19 moléculas de HP- γ -CDs disueltas estaban formando complejos de inclusión solubles con DUT (**Tabla V.1**). La comparación de MR entre DUT y los dos tipos de CDs estudiadas, indicaron que HP- γ -CDs fueron las más eficaces en la complejación de DUT, formando complejos más estables.

Si comparamos los resultados obtenidos para la encapsulación de DUT con γ -CDs y HP- γ -CDs y los obtenidos para la complejación de FIN con los mismos tipos de CDs, podemos concluir que, HP- γ -CDs son eficaces tanto para la complejación de FIN, como de DUT, pero cuando comparamos el comportamiento de las CDs nativas, γ -CDs, complejaron de forma mucho más eficaz (valores más altos de CE) y más estable (valores más altos de Kc) a FIN que a DUT. Sin embargo, en el caso de las CDs modificadas HP- γ -CDs, la eficacia de complejación fue superior sobre FIN (mayor valor de CE), pero los complejos más estables se formaron con DUT (mayor valor de Kc).

1.2.3 Estudio del efecto de la temperatura sobre el proceso de complejación

Con el objetivo de determinar la influencia de la temperatura en el proceso de complejación de DUT con γ -CDs y HP- γ -CDs, se realizaron estudios de solubilidad a diferentes temperaturas: 4, 25 y 65°C (**Tabla V.2**).

Para ambos tipos de CDs los valores más altos de Kc se obtuvieron a 25°C. En el caso de γ -CDs, el valor de Kc obtenido a 25°C fue $1718 \pm 80 \text{ M}^{-1}$, 1.17 veces superior al obtenido a 4°C y a 65°C, siendo el valor obtenido muy similar para ambas temperaturas ($1468 \pm 75 \text{ M}^{-1}$ y $1446 \pm 79 \text{ M}^{-1}$, respectivamente).

Tabla V.2: Estudio de solubilidad de DUT con γ - y HP- γ -CDs. Efecto de la temperatura en: la solubilidad acuosa (S_0), constante de complejación (K_c), coeficiente de correlación del diagrama de fase (R^2), eficacia de complejación (CE) y relación molar (MR).

Tipo de CDs	T(°C)	S_0 (μ M)	K_c (M^{-1})	R^2	CE	MR
γ -CDs	4	2.4 \pm 0.3	1468 \pm 75	0.995	0.0035	1:287
	25	2.3 \pm 0.1	1718 \pm 80	0.994	0.004	1:251
	65	2.3 \pm 0.1	1446 \pm 79	0.988	0.0035	1:287
HP- γ -CDs	4	2.3 \pm 0.2	1216 \pm 194	0.993	0.0029	1:346
	25	2.4 \pm 0.2	23784 \pm 203	0.971	0.057	1:19
	65	2.3 \pm 0.4	2235 \pm 215	0.971	0.0054	1:186

En el caso de HP- γ -CDs, el comportamiento fue similar al caso anterior, obteniendo el valor más alto de K_c a 25°C (23784 \pm 203 M^{-1}), siendo este valor de K_c 19.5 veces superior al obtenido a 4°C (1216 \pm 194 M^{-1}) y 10.6 veces superior al obtenido a 65°C (2235 \pm 215 M^{-1}) (**Tabla V.2**).

A la luz de los resultados obtenidos, pudimos concluir que la temperatura de complejación es un factor a tener en cuenta a la hora de formar complejos estables de DUT con γ -CDs y HP- γ -CDs, siendo 25°C la temperatura óptima de complejación.

En cuanto al efecto de la temperatura sobre los valores de CE, en el caso de DUT y γ -CDs se obtuvieron valores muy similares, (0.0035-0.004) en todas las

temperaturas estudiadas, lo que remarcaba que el cambio de temperatura no mejoraba significativamente la solubilidad de DUT (**Tabla V.2**).

Cuando analizamos la MR de DUT: γ -CDs obtenida en las 3 temperaturas estudiadas, comprobamos que, en todos los casos, esta relación se mantuvo en el mismo rango (1:250 - 1:290) (**Tabla V.2**), indicando que solamente 1 de cada 250-290 moléculas de CDs en solución está formando complejos solubles con DUT.

En el caso de HP- γ -CDs la variación de temperatura sí influyó tanto en CE como en MR. El valor más alto de CE se obtuvo a 25°C (0.057) (**Tabla V.2**), 19.6 veces superior que a 4°C, y 10.5 veces superior que a 65°C. Tanto a 4°C como a 65°C los valores de CE obtenidos fueron mucho más bajos (0.0029 y 0.0054, respectivamente), lo que indicó que, a estas temperaturas, HP- γ -CDs tienen menor efecto en la solubilidad de DUT.

Respecto a los valores de MR obtenidos, a 4°C solamente 1 de cada 346 moléculas de HP- γ -CDs en disolución formaban complejos solubles con DUT. A 65°C el valor de MR fue también elevado 1:186. Sin embargo, a 25°C el valor de MR fue 1:19, indicando, en este caso que, 1 de cada 19 moléculas de HP- γ -CDs en disolución formaba complejos solubles con DUT (**Tabla V.2**).

Comparando los resultados obtenidos para γ -CDs y HP- γ -CDs podemos decir que, en ambos casos, fue a 25 °C cuando se obtuvieron complejos más estables (mayor valor de Kc) y una mayor eficacia de complejación (mayor CE y MR) para DUT.

1.2.4 Análisis de los parámetros termodinámicos del proceso de complejación

A partir de los diagramas de fases de DUT con γ - y HP- γ -CDs a distintas temperaturas (4, 25 y 65°C), se calcularon los parámetros termodinámicos del proceso de encapsulación, que permiten interpretar cuán favorable o desfavorable, en términos energéticos, es el proceso de encapsulación que ocurrirá de forma

espontánea o no, en función de los valores de energía de transferencia libre de Gibbs ($\Delta G^{\circ tr}$). $\Delta G^{\circ tr}$ representa la energía libre de transferencia de un compuesto del agua a la cavidad interna de las CDs. Su valor viene determinado por la relación que comparten los términos de entalpía (ΔH°) y de entropía (ΔS°). Estos valores fueron calculados aplicando la **Ecuación III.5, III.6 y III.7** de Materiales y Métodos (**Tabla V.3 y Tabla V.4**).

Los valores negativos de ΔG° obtenidos para ambos tipos de CDs, -18.57 en el caso de γ -CDs y -21 en el caso de HP- γ -CDs (**Tabla V.4**), indicaron que la inclusión de DUT en la cavidad interna de ambos tipos de CDs ocurre de manera espontánea, siendo más favorecida en el caso de HP- γ -CDs por tener un valor más negativo (**Tabla V.4**). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el capítulo IV para FIN para los dos tipos de CDs estudiadas (-22.74 para γ -CDs y -22.16 para HP- γ -CDs).

Los valores de entalpía (ΔH°) y de entropía (ΔS°) fueron diferentes para ambos tipos de CDs. Mientras que para γ -CDs el valor de ΔH° fue negativo (-0.493 KJ/mol), lo cual coincide con lo obtenido para FIN en ambas CDs estudiadas (-2.657 KJ/mol (γ -CDs) y -1.837 KJ/mol (HP- γ -CDs), en el caso de HP- γ -CDs este valor fue positivo 2.754 KJ/mol. Respecto a los valores de ΔS° , para ambos tipos de CDs fueron valores positivos 60.29 J/mol en el caso de γ -CDs, y 93.03 J/mol en el caso de HP- γ -CDs (**Tabla V.4**). De nuevo, los valores obtenidos para DUT complejada en γ -CDs, coinciden con los obtenidos para FIN en ambas CDs ensayadas (67.41 J/mol para γ -CDs, y 68.20 J/mol para HP- γ -CDs).

En el caso de γ -CDs, el valor negativo y próximo a 0 de ΔH° y el valor positivo de ΔS° indicaron la presencia de interacciones hidrofóbicas entre DUT y γ -CDs. El valor negativo de la ΔH° indicó que la reacción es exotérmica y el valor positivo de ΔS° y el resultado negativo de ΔG° , implica que la reacción es espontánea a todas las temperaturas.

Tabla V.3: Energía de transferencia libre de Gibbs (ΔG_{tr}^0) del proceso de solubilización de DUT a 4, 25 y 65° a distintas concentraciones de CDs (mM).

		ΔG_{tr}^0 (kJ/mol)			
Tipo de CDs	mM	4°C	25°C	65°C	
γ -CDs	2.5	-2.42	-2.24	-3.17	
	5.0	-4.13	-3.91	-4.64	
	15	-6.47	-6.89	-7.89	
	20	-6.92	-7.37	-8.36	
HP- γ -CDs	10.0	-5.73	1.16	-4.90	
	50.0	-8.97	-3.05	-10.12	
	75.0	-9.87	-5.00	-11.68	
	100.0	-10.65	-5.61	-13.00	

En la complejación con HP- γ -CDs, la presencia de grupos hidroxipropilo en las CDs condujo a un aumento considerable en ambos parámetros termodinámicos (ΔH° y ΔS°). Sin embargo, el valor de ΔG° apenas se alteró respecto al obtenido para γ -CDs (-18.57 KJ/mol) (HP- γ -CDs -21 KJ/mol), compensado por el incremento que proporciona el valor de ΔS° . El valor positivo de ΔH° indicó que la reacción es endotérmica, influida por la temperatura, aunque su valor no muy alejado de 0 sigue implicando la presencia de interacciones hidrofóbicas entre DUT y HP- γ -CDs. Finalmente, el balance de ambos parámetros también determinó una reacción espontánea en la formación de complejos de inclusión entre DUT y HP- γ -CDs.

Tabla V.4: *Parámetros termodinámicos del proceso de solubilización de DUT a 4, 25 y 65° a distintas concentraciones de CDs (mM). Variación estándar de energía libre (ΔG^0), variación estándar de entalpía (ΔH^0) y variación estándar de entropía (ΔS^0).*

	ΔG^0 (kJ/mol)	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (J/mol)
γ -CDs	-18.57	-0.93	60.29
HP- γ -CDs	-21	2.754	93.03

Tal y como se ha referenciado en el capítulo anterior, los resultados para FIN y para DUT obtenidos están en el mismo rango, y también coinciden con los publicados en la complejación con estas CDs (γ - y HP- γ -CDs) para OA y MA (López-Miranda y col, 2018) y para las sales biliares (Køhler y col, 2016).

VI - MINOXIDILO

1 - MINOXIDILO

1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1 Minoxidilo

MX es uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento de la alopecia por vía tópica, ya que de esta forma se previene la posible hipotensión asociada a su administración por vía oral, además de evitar la irritación gastrointestinal que provoca, frecuentemente, en la mucosa tras su absorción. No obstante, su escasa solubilidad en medio acuoso conduce a la elaboración de fórmulas con un alto porcentaje de solventes orgánicos como etanol y PEG, con el fin de mejorar su solubilidad y penetración a través de la piel. Las fórmulas comerciales existentes con estos excipientes requieren una doble aplicación diaria para asegurar el efecto farmacológico (Wagner & Kenreigh, 2007), ya que estos sistemas de formulación de fármacos no aseguran una concentración plasmática eficaz. Otro problema que plantean estas fórmulas farmacéuticas es que, debido a la alta concentración de alcohol y propilenglicol, provocan irritación, prurito, dermatitis, incluso una respuesta alérgica al tratamiento en el cuero cabelludo (Friedman y col, 2002). Por todos estos motivos, continúan las investigaciones para encontrar sistemas de liberación controlada de fármacos para uso tópico. En este sentido, las CDs aparecen como posibles agentes encapsulantes que permitan un aumento de la solubilidad acuosa de MX, así como su liberación controlada, pudiendo prescindir del alto porcentaje de alcohol en las formulaciones.

1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la presencia de CDs sobre la solubilidad acuosa de MX. También se estudió el efecto de la temperatura en el

proceso de complejación de MX en CDs, con el fin de establecer un sistema estable para solubilizar, en medio acuoso, altas concentraciones de MX sin necesidad de usar concentraciones elevadas de disolventes orgánicos que irritan el cuero cabelludo.

Las CDs utilizadas para incrementar la solubilidad acuosa del MX fueron los tres tipos de CDs nativas (α -, β - y γ -CDs) y las modificada HP- β -CDs.

1.2.1 Estudio de solubilidad

MX es un compuesto con baja solubilidad acuosa (12 mM), aunque superior a los dos compuestos estudiados anteriormente (FIN y DUT), por ello se estudió su complejación con diferentes tipos de CDs. Se realizaron estudios de solubilidad mediante el método descrito por Higuchi y Connors en 1965, con algunas modificaciones (Lucas-Abellán y col. 2008) y los resultados obtenidos con los tres tipos de CDs nativas (α -, β - y γ -CDs) y las modificadas HP- β -CDs, se muestran en las **Figuras VI.1, VI.2, VI.3 y VI.4**. Como se puede observar en estas figuras, la concentración de MX aumentó de forma lineal con la concentración de todos los tipos de CDs estudiados. Los perfiles obtenidos fueron de tipo A_L con valores de pendiente menores que 1 en todos los casos, indicando que la estequiometría de los complejos formados era 1:1. Aplicando la **Ecuación III.1** de Materiales y Métodos, se obtuvo el valor de K_c para cada tipo de CDs ensayadas (**Tabla VI.I**).

Tabla VI.1: Estudio de solubilidad de MX con diferentes tipos de CDs. Constante de complejación (K_c).

Tipo de CDs	K_c (M^{-1})
α -CDs	24 \pm 0.28
β -CDs	834 \pm 16
γ -CDs	66 \pm 0.45
HP- β -CDs	1877 \pm 42

El diagrama de fases de α -CDs (**Figura VI.1**), muestra cómo la solubilidad de MX no aumenta significativamente con este tipo de CDs nativas. En ausencia de CDs el MX presenta una solubilidad de 12 mM y en presencia de 20 mM de α -CDs la solubilidad de MX aumenta hasta 17 mM, un aumento de 1.4 veces. El valor de K_c obtenido a partir del diagrama de fases y aplicando la **Ecuación III.1** de Materiales y Métodos descrita por Higuchi y Connors en 1965, fue de 24 \pm 0.28 M^{-1} . Este valor de K_c tan bajo nos indicó que α -CDs forman complejos poco estables con MX.

Los resultados de encapsulación de MX con α -CDs, coinciden con los obtenidos para FIN, donde el aumento de solubilidad fue solamente de 1.4 veces (González-Louzao y col, 2020). Estos resultados coinciden también con los trabajos publicados para OA y MA, cuya solubilidad acuosa apenas aumentó en presencia de α -CDs (López-Miranda y col, 2018). Es posible que el tamaño relativo de MX y la cavidad hidrofóbica de las α -CDs sea una de las razones de esta baja estabilidad de los complejos formados.

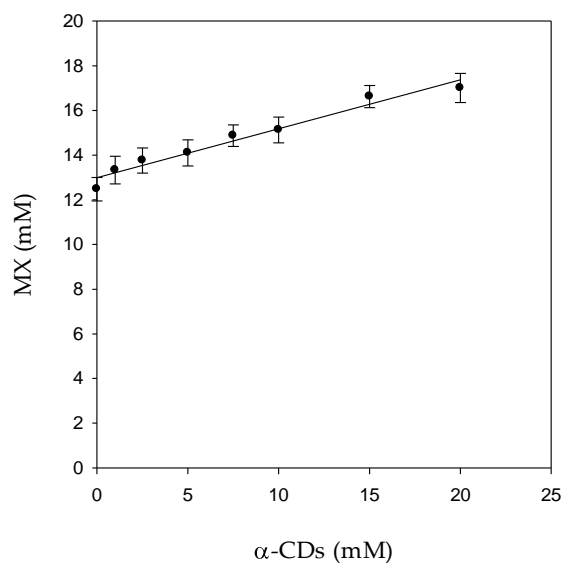


Figura VI.1: Diagrama de fases de MX con α -CDs (●).

Cuando se estudió la complejación de MX con β -CDs (**Figura VI.2**), se observó que también aumentaba su concentración de forma lineal conforme aumentaba la concentración de β -CDs, hasta llegar a una concentración de 13 mM de β -CDs (límite de solubilidad de este tipo de CDs). Como se puede observar en la **Figura VI.2**, una concentración de β -CDs 13 mM, casi duplicó la concentración de MX en disolución, pasando de 12 mM (S_0) a 23.5 mM con β -CDs 13 mM. El valor de K_c para MX y β -CDs fue de 834 M^{-1} . Habitualmente, β -CDs suele dar valores de constantes de asociación del orden de 100 M^{-1} (J. Szejtli, 1988), por lo que se aproxima a los resultados obtenidos en este estudio.

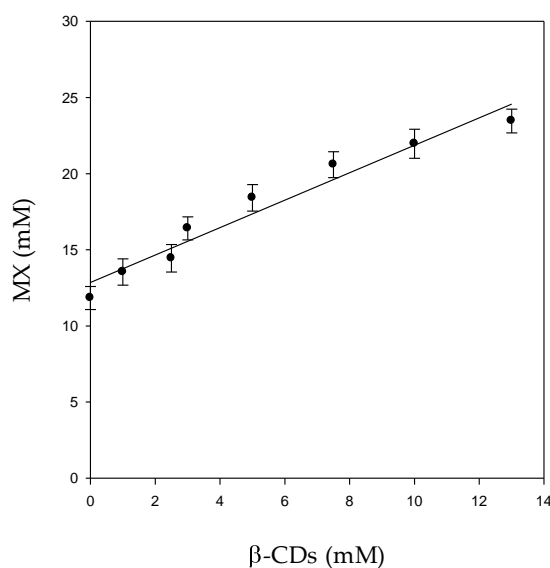


Figura VI.2: Diagrama de fases de MX con β -CDs (●).

Se han descrito en la literatura estudios previos de complejación de MX con β -CDs (Calderini & Pessine, 2008), en los que se muestran diagramas de fases de tipo A_L , con estequiometría 1:1 para los complejos formados. Sin embargo, en dicho estudio la K_c obtenida entre MX y β -CDs es menor que la obtenida en nuestro estudio (151 M^{-1} frente a 834 M^{-1}), aunque ambas constantes se encuentran en el mismo orden de magnitud.

Para completar el estudio de solubilidad de MX con CDs nativas, se estudió la complejación con γ -CDs. Como se puede observar en la **Figura VI.3** el diagrama de fases fue de tipo A_L con pendiente inferior a 1, por lo que la estequiometría de los complejos formados fue 1:1. Cuando analizamos el incremento de solubilidad de MX en presencia de γ -CDs, observamos que éste era muy limitado, no llegando ni siquiera a duplicar la concentración de MX en presencia de una concentración de CDs 20 mM. La concentración de MX pasó de 12 mM (S_0) a 20 mM en presencia de 20 mM de γ -CDs.

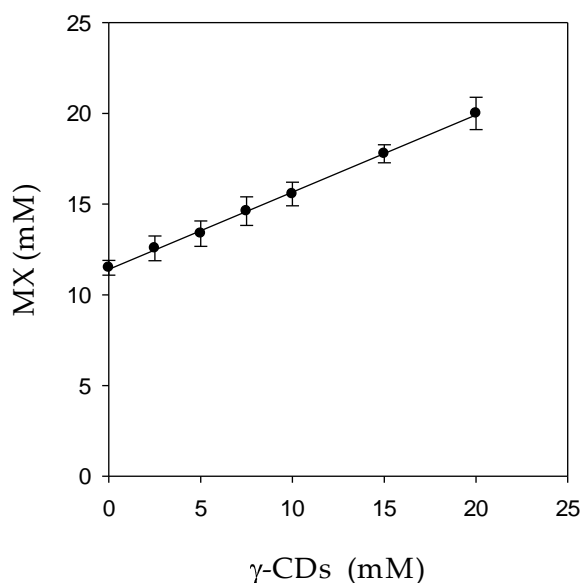


Figura VI.3: Diagrama de fases de MX con γ -CDs (●).

El valor de K_c obtenido a partir de los estudios de solubilidad de MX con γ -CDs fue 66 M^{-1} .

Comparando los valores de K_c obtenidos para los tres tipos de CDs nativas ensayadas, pudimos concluir que β -CDs son las CDs nativas que forman complejos más estables con MX, con un valor de K_c (834 M^{-1}), mayor que los obtenidos para α -CDs o γ -CDs, cuyos valores de K_c fueron 24 M^{-1} y 66 M^{-1} , respectivamente (**Tabla VI.1**).

Teniendo en cuenta estos resultados, pasamos a estudiar la solubilidad acuosa de MX en presencia de un tipo de CDs modificadas de β -CDs, al ser las que presentaron un valor más alto de K_c entre las CDs nativas: HP- β -CDs. Tal y como se muestra en la **Figura VI.4**, la concentración de MX también aumentó de forma lineal con la concentración de HP- β -CDs en el medio, mostrando un diagrama de fases de tipo A_L , con una pendiente de 0.95, indicando que la estequiometría de los

complejos de inclusión formados era 1:1. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos de complejación de MX en los que también se utilizaban HP- β -CDs (Calderini & Pessine, 2008; Chen y col, 2017; Kwon & Kim, 2010; Lopedota y col, 2018).

La solubilidad acuosa de MX aumentó de 12 mM (S_0) en ausencia de CDs, a 105.5 mM en presencia de HP- β -CDs 100 mM, es decir, se incrementó 8.5 veces. El valor de K_c calculado para MX con HP- β -CDs fue de 1877 M^{-1} . Los resultados obtenidos indicaron que la adición de grupos hidroxipropilo a las β -CDs nativas, favorece el atrapamiento de MX en la cavidad hidrofóbica de las CDs. Comparando estos resultados con los descritos por otros autores en la literatura, observamos que el valor de K_c que aquí describimos es mayor que el obtenido por Kim y col., en 2003, utilizando el mismo tipo de CDs de (350 M^{-1}). Sin embargo, el valor de K_c descrito por Lopedota y col., en 2017 fue 2039 M^{-1} , similar al obtenido en nuestro estudio.

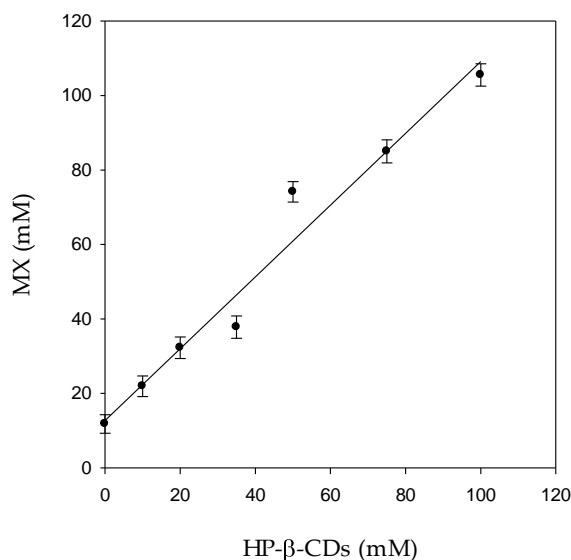


Figura VI.4: Diagrama de fases de MX con HP- β -CDs (●).

Como conclusión de este estudio y a la luz de los valores de K_c obtenidos (**Tabla VI.1**), se puede afirmar que entre las CDs nativas, fueron las β -CDs las que mostraron un valor de K_c más elevado ($834 \pm 16 \text{ M}^{-1}$), siendo 34 veces superior al obtenido para α -CDs ($24 \pm 0.28 \text{ M}^{-1}$), y casi 13 veces mayor que el obtenido para γ -CDs ($66 \pm 0.45 \text{ M}^{-1}$). Por otro lado, si comparamos los valores de K_c obtenidos para β -CDs y para su modificada HP- β -CDs, observamos que la adición de grupos hidroxipropilo a las β -CDs favorece el atrapamiento del MX, generando complejos de inclusión más estables, con un valor de K_c para HP- β -CDs 2.25 veces superior al mostrado por β -CDs ($834 \pm 16 \text{ M}^{-1}$ para β -CDs frente a $1877 \pm 42 \text{ M}^{-1}$ para HP- β -CDs) (**Tabla VI.1**).

Comparando nuestros resultados con los recogidos en la literatura para la complejación de MX, pudimos corroborar que HP- β -CDs son las CDs más interesantes a la hora de encapsular MX, ya que forman complejos más estables que sus nativas β -CDs (Calderini & Pessine, 2008; Chen y col, 2017; Kwon & Kim, 2010; Lopodota y col, 2015, 2018) y, por otra parte, son más económicas que otras CDs modificadas de β -, como pueden ser Methyl- β -CDs, además de ofrecer mejores perfiles de citotoxicidad (Malanga y col, 2016).

1.2.2. Cálculo de CE y MR

Con el fin de comparar el efecto de β -CDs y HP- β -CDs sobre la solubilidad acuosa de MX, se calculó su eficacia de complejación. CE representa la relación molar entre la concentración de CDs en disolución formando complejos y la concentración de CDs libres (Thorsteinn Loftsson y col, 2007). Para los complejos que presentan una estequiometría 1:1, CE se puede calcular a partir de la pendiente del diagrama de fases con la **Ecuación III.2** del Capítulo de Materiales y Métodos. Los valores de CE obtenidos para MX con β - o HP- β -CDs se muestran en la **Tabla VI.2**.

Tal y como queda reflejado en la **Tabla VI.2**, el valor de CE obtenido para HP- β -CDs (21.9) fue 2.2 veces mayor que el obtenido para β -CDs (9.8). Los valores obtenidos en ambos casos, que están muy por encima de la unidad, lo que nos

indican que la cantidad de CDs que forman complejos solubles con MX es superior a la cantidad de CDs libres en la disolución.

Tabla VI.2: Coeficiente de correlación del diagrama de fases (R^2), eficacia de complejación (CE) y relación molar (MR).

Tipo de CDs	S_0 (mM)	R^2	CE	MR
β -CDs	12	0.947	9.8	1:1
HP- β -CDs	12	0.977	21.9	1:1

Los resultados de CE obtenidos para MX fueron superiores a los obtenidos para FIN y DUT en capítulos anteriores, así como los observados en otras publicaciones. Esto es debido a la mayor solubilidad de MX, siendo MX más soluble que FIN 80 veces y 5000 veces más soluble que DUT. Además, la naturaleza química de MX y las condiciones de trabajo, favorecieron los valores altos de CE ya que, MX a pH 6.7 (al cual se realizaron los ensayos) se encuentra completamente ionizado ya que estamos a un pH superior a los tres valores de pKa 1.68, 4.35 y 6.32 que tiene el compuesto. Para compuestos poco solubles en agua, cuando el pH de trabajo está por encima del pKa del compuesto, éste se ioniza y aumenta el valor de S_0 y por consiguiente el valor de CE. En este caso, el pH está por encima de los tres valores de pKa del MX, encontrándose ionizado. Estas conclusiones coinciden con los resultados obtenidos por Loftsson y Brewster para el ácido fenitoínico con estructura molecular similar a MX, que observaron un valor de CE de 14 a un pH de trabajo de 11 por encima del pKa del ácido (pKa=8.06) (T.Loftsson y Brewster, 2012).

Además de calcular la CE de MX con β -CDs y HP- β -CDs también se calculó la relación molar (MR) entre MX y ambos tipos de CDs (MX: CDs). Este valor es calculado a partir del valor de CE y aplicando la **Ecuación III.3** del Capítulo de Materiales y Métodos (**Tabla VI.2**). A partir de los valores obtenidos de MR pudimos determinar que las CDs más eficaces en la complejación de MX fueron HP- β -CDs cuyo valor de MR (1:1) indica que todas las moléculas de HP- β -CDs en

solución forman complejos solubles con MX. Este dato coincide con los determinados por distintos autores (Chen y col, 2017; Lopedota y col, 2018). En el caso de β -CDs, también todas las moléculas en solución se encontraban formando complejos solubles con MX (1:1) (**Tabla VI.2**).

En resumen, HP- β -CDs fueron más eficaces que β -CDs en la complejación MX, tal y como indican los valores CE (**Tabla VI.2**). Además, los complejos formados por HP- β -CDs también son los más estables, tal y como indican los valores de Kc obtenidos (**Tabla VI.1**).

1.2.3. Efecto de la temperatura sobre la complejación de MX

La temperatura del medio de reacción es un parámetro que puede influir en el proceso de encapsulación de MX con β -CDs y HP- β -CDs.

Para estudiar la influencia de la temperatura del medio en la complejación de MX con β - y HP- β -CDs, los estudios de solubilidad se llevaron a cabo a tres temperaturas: 4, 25 y 65°C (**Tabla VI.3**). En el caso de β -CDs, los resultados obtenidos mostraron que el valor más alto de Kc se obtuvo a 25°C ($834 \pm 80 \text{ M}^{-1}$) mientras que a 65°C se obtuvo el valor más bajo de Kc ($246 \pm 79 \text{ M}^{-1}$). En cuanto a CE también se observó que el mayor valor se obtuvo a 25°C (9.8) y el más bajo a 65°C (5.2). El hecho de que los valores más bajos de Kc y CE se obtuvieran a 65°C es debido al aumento de la S_0 del MX con la temperatura, pasando de 12 a 21.1 mM. Sin embargo, estas variaciones en los valores de Kc y CE no fueron suficientes para afectar al valor de MR, que permaneció en 1:1 para las tres temperaturas estudiadas.

Por otro lado, la complejación de MX con HP- β -CDs se ve ligeramente favorecida con la temperatura, alcanzando un mayor valor nivel de complejación a 65°C (22.4). En este caso, los diferentes valores obtenidos de Kc y CE para HP- β -CDs, han mantenido el valor de MR en su máximo, siendo 1:1 en los tres casos (**Tabla VI.3**).

Tabla VI.3: Estudio de solubilidad de MX con β - y HP- β -CDs. Efecto de la temperatura en: la solubilidad acuosa (S_0), constante de complejación (K_c), coeficiente de correlación del diagrama de fase (R^2), eficacia de complejación (CE) y molar ratio (MR).

Tipo de CDs	T ^o C	S ₀ (mM)	K _c (M ⁻¹)	R ²	CE	MR
β -CDs	4	11.7±2	562±75	0.967	6.6	1:1
	25	12±1	834±80	0.958	9.8	1:1
	65	21.1±5	246±79	0.968	5.2	1:1
HP- β -CDs	4	11.7±1	1555±194	0.979	18.2	1:1
	25	12±2	1877±203	0.999	21.9	1:1
	65	21.1±4	2242±215	0.987	22.4	1:1

1.2.4 Análisis de los parámetros termodinámicos del proceso de complejación de MX con β - y HP- β -CDs

A partir de estos diagramas de fases para MX con β - y HP- β -CDs, realizados a 4, 25 y 65°C, se calcularon los parámetros termodinámicos del proceso de encapsulación. Los resultados se representaron en las **Tablas VI.4.** y **VI.5.**

Para definir si la formación de los complejos de inclusión sigue un proceso espontáneo es preciso el cálculo de los parámetros termodinámicos mediante entalpía (ΔH^0) y entropía (ΔS^0) (**Ecuación III.7** de Materiales y Métodos). La variación de energía libre de Gibbs (ΔG^0) representa la energía libre de transferencia de un compuesto, desde el agua a la cavidad interna de las CDs y proporciona información sobre si la reacción es favorable o desfavorable. Este valor proporciona una relación entre los valores de (ΔH^0) y de (ΔS^0) que definen la cantidad de energía liberada o absorbida y el grado de desorden en la reacción, respectivamente.

Tabla VI.4: Energía de transferencia libre de Gibbs (ΔG_{tr}^0) del proceso de solubilización de MX a 4, 25 y 65° a distintas concentraciones de CDs (mM).

		ΔG_{tr}^0 (kJ/mol)		
Tipo de CDs	mM	4°C	25°C	65°C
β -CDs	1	-6.20	-6.71	-9.47
	5.0	-6.69	-7.51	-9.75
	7.5	-7.18	-7.75	-10.12
	13.0	-7.55	-8.06	-10.24
HP- β -CDs	10.0	-7.10	-7.74	-9.15
	50.0	-9.95	-10.76	-12.69
	75.0	-10.33	-11.10	-13.10
	100.0	-10.80	-11.63	-13.40

Los valores de ΔG_{tr}^0 con concentraciones crecientes de CDs se calcularon utilizando la **Ecuación III.5** de Materiales y Métodos (Hadžiabdić y col., 2012a) (**Tablas VI.4, VI.5**). Los valores negativos obtenidos en todos los casos estudiados, indicaron la inclusión espontánea de MX en ambas CDs, β - y HP- β -CDs, siendo más favorable la reacción al aumentar la concentración de CDs.

En la bibliografía se han descrito estudios similares de solubilidad para otros fármacos con estructura parecida como la piperidina, la fexofenadina y la loratadina, donde se obtuvieron resultados similares a los obtenidos para MX (Omar y col, 2007).

Tabla VI.5: *Parámetros termodinámicos del proceso de solubilización de MX a 4, 25 y 65° a distintas concentraciones de CDs (mM). Variación estándar de energía libre (ΔG°), variación estándar de entalpía (ΔH°) y variación estándar de entropía (ΔS°).*

	ΔG° (kJ/mol)	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (J/mol)
β -CDs	-15.58	-11.851	16.16
HP- β -CDs	-19.10	4.590	78.08

Además, el estudio llevado a cabo por Lopedota y col, en 2017, incluye el análisis termodinámico del proceso de inclusión de MX con HP- β -CDs, donde se indica que es un proceso exotérmico y espontáneo (**Tabla VI.5**), esto difiere de los resultados obtenidos en nuestro estudio, donde la (ΔH°) es positiva porque las Kc aumentan con la temperatura, aunque pequeños cambios en los valores de Kc podrían modificar la tendencia por el valor próximo a 0 (4.59 KJ/mol).

En cuanto a los valores de entalpía (ΔH°) y de entropía (ΔS°) fueron diferentes para β -CDs (-11.851 KJ/mol y 16.16 J/mol, respectivamente) (**Tabla VI.4**) y HP- β -CDs (4.59 KJ/mol y 78.08 J/mol) (**Tabla VI.5**). La presencia de grupos hidroxipropilo en las HP- β -CDs provocó un aumento en ambos parámetros termodinámicos. Sin embargo, la variación en ΔH° fue compensada por una alta T ΔS° que no supuso casi ninguna variación en ΔG° (-15.58 kJ/mol para β -CDs y -19.10 kJ/mol para HP- β -CDs) (**Tabla VI.4, VI.5**). Estos valores negativos de ΔG° indicaban la complejación espontánea de MX con ambos tipos de CDs, β - y HP- β -CDs. Por otro lado, los valores cercanos a cero de ΔH° y los grandes valores positivos de ΔS° concuerdan con una interacción hidrofóbica entre MX y las CDs.

Para β -CDs es un proceso exotérmico y espontáneo a todas las temperaturas y en el caso de HP- β -CDs la reacción es endotérmica y espontánea por encima de la temperatura de equilibrio.

VII - CONCLUSIONES

VII-CONCLUSIONES

A la luz de los resultados obtenidos en cada uno de los capítulos que componen esta tesis doctoral y una vez analizados teniendo en cuenta los datos disponibles en la literatura, las conclusiones que podemos destacar son:

1. Los compuestos con actividad farmacológica en AGA: FIN, DUT y MX incrementan su solubilidad acuosa por la complejación con CDs tanto nativas como modificadas. En el caso de FIN, las CDs que más incrementaron su solubilidad acuosa fueron las γ -CDs, en el caso de DUT fueron las HP- γ -CDs y en el caso de MX fueron las HP- β -CDs.
2. En el caso de FIN, los complejos más estables y los que presentaron mayor eficacia de complejación son los formados con γ -CDs, con una estequiometría 1:1, un valor de K_c de $9687 \pm 51 \text{ M}^{-1}$, un valor de CE de 1.5 y una MR de 1:2.
3. En el caso de DUT, los complejos más estables y los que presentaron una mayor eficacia de complejación son los formados con HP- γ -CDs con estequiometría 1:1, un valor de K_c de $23784 \pm 118 \text{ M}^{-1}$, un valor de CE de 0.057 y una MR de 1:19.
4. En el caso de MX, los complejos más estables y los que presentaron una mayor eficacia de complejación son los formados con HP- β -CDs, con estequiometría 1:1, un valor de K_c de $1877 \pm 42 \text{ M}^{-1}$, un valor de CE de 21.9 y una MR de 1:1.
5. En el caso de FIN, ni el pH ni la temperatura afecta a su solubilidad acuosa. Sin embargo, el pH sí afecta al proceso de encapsulación con CDs, siendo 5.5 el valor idóneo para llevar a cabo este proceso. El proceso de encapsulación de FIN es un proceso exotérmico y espontáneo, con una temperatura óptima de encapsulación a 4 °C.
6. En el caso de DUT, el proceso de encapsulación es endotérmico y espontáneo y la temperatura óptima de encapsulación es 25 °C.

7. En el caso de MX, el proceso de encapsulación volvió a ser endotérmico y espontáneo, pero su temperatura óptima para llevar a cabo el proceso de encapsulación fueron 65 °C.

VIII - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal, S., Thareja, S., Verma, A., Bhardwaj, T. R., & Kumar, M. (2010). An overview on 5 α -reductase inhibitors. *Steroids*, 75(2), 109-153.
- Aicart, E., & Junquera, E. (2003). Complex Formation between Purine Derivatives and Cyclodextrins: A Fluorescence Spectroscopy Study. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 47(3), 161-165.
- Almeida, H. M., & Cabral Marques, H. M. (2011). Physicochemical characterization of finasteride:PEG 6000 and finasteride:Kollidon K25 solid dispersions, and finasteride: β -cyclodextrin inclusion complexes. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 70(3-4), 397-406.
- Anwer, M. K., Jamil, S., Ansari, M. J., Al-Shdefat, R., Ali, B. E., Ganaie, M. A., Abdel-Kader, M. S., & Shakeel, F. (2014). Water soluble binary and ternary complexes of diosmin with β -cyclodextrin: Spectroscopic characterization, release studies and anti-oxidant activity. *Journal of Molecular Liquids, Complete*(199), 35-41.
- Asada, Y., Sonoda, T., Ojira, M., Kurata, S., Sato, T., Ezaki, T., & Takayasu, S. (2001). 5 α -Reductase Type 2 Is Constitutively Expressed in the Dermal Papilla and Connective Tissue Sheath of the Hair Follicle in Vivo But Not during Culture in Vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(6), 2875-2880.
- Asbahr, A. C. C., Franco, L., Barison, A., Silva, C. W. P., Ferraz, H. G., & Rodrigues, L. N. C. (2009). Binary and ternary inclusion complexes of finasteride in HP β CD and polymers: Preparation and characterization. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(7), 2718-2723.
- Bax, A., & Davis, D. G. (1985). Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 63(1), 207-213.

- Beak, I.-H., & Kim, M.-S. (2012). Improved Supersaturation and Oral Absorption of Dutasteride by Amorphous Solid Dispersions. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 60(11), 1468-1473.
- Besler, B. H., Merz, K. M., & Kollman, P. A. (1990). Atomic charges derived from semiempirical methods. *Journal of Computational Chemistry*, 11(4), 431-439.
- Bodó, E., Kany, B., Gáspár, E., Knüver, J., Kromminga, A., Ramot, Y., Bíró, T., Tiede, S., van Beek, N., Poeggeler, B., Meyer, K. C., Wenzel, B. E., & Paus, R. (2010). Thyroid-Stimulating Hormone, a Novel, Locally Produced Modulator of Human Epidermal Functions, Is Regulated by Thyrotropin-Releasing Hormone and Thyroid Hormones. *Endocrinology*, 151(4), 1633-1642.
- Boys, S. F., & Bernardi, F. (2002). The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. *Molecular Physics*, 100(1), 65-73.
- Brewster, M. E., Simpkins, J. W., Hora, M. S., Stern, W. C., & Bodor, N. (1989). The Potential Use of Cyclodextrins in Parenteral Formulations. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 43(5), 231-240.
- Brockschmidt, F. F., Hillmer, A. M., Eigelshoven, S., Hanneken, S., Heilmann, S., Barth, S., Herold, C., Becker, T., Kruse, R., & Nöthen, M. M. (2010). Fine mapping of the human AR/EDA2R locus in androgenetic alopecia. *British Journal of Dermatology*, 162(4), 899-903.
- Buffoli, B., Rinaldi, F., Labanca, M., Sorbellini, E., Trink, A., Guanziroli, E., Rezzani, R., & Rodella, L. F. (2014). The human hair: From anatomy to physiology. *International Journal of Dermatology*, 53(3), 331-341.
- Bunagan, M. J. K., Banka, N., & Shapiro, J. (2013). Hair Transplantation Update: Procedural Techniques, Innovations, and Applications. *Dermatologic Clinics*, 31(1), 141-153.

- Calderini, A., & Pessine, F. B. T. (2008). Synthesis and characterization of inclusion complex of the vasodilator drug minoxidil with β -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 60(3), 369-377.
- Caserini, M., Radicioni, M., Leuratti, C., Terragni, E., Iorizzo, M., & Palmieri, R. (2015). Effects of a novel finasteride 0.25% topical solution on scalp and serum dihydrotestosterone in healthy men with androgenetic alopecia. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 52, 842-849.
- Casida, M. E., Chermette, H., & Jacquemin, D. (2009). Time-dependent density-functional theory for molecules and molecular solids. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 914(1-3), 1-2.
- Chandrashekar, B. S., Nandhini, T., Vasanth, V., Sriram, R., & Navale, S. (2015). Topical minoxidil fortified with finasteride: An account of maintenance of hair density after replacing oral finasteride. *Indian Dermatology Online Journal*, 6(1), 17-20.
- Chen, T. C., Yu, S.-C., Hsu, C.-M., Tsai, F.-J., & Tsai, Y. (2017). Minoxidil-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes: Characterization and in vivo evaluation of an aqueous solution for hair growth in rats. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 88(1), 27-34.
- Choi, J.-S., Lee, S.-E., Jang, W. S., Byeon, J. C., & Park, J.-S. (2018). Solid dispersion of dutasteride using the solvent evaporation method: Approaches to improve dissolution rate and oral bioavailability in rats. *Materials Science and Engineering: C*, 90, 387-396.
- Chumlea, W. C., Rhodes, T., Girman, C. J., Johnson-Levonas, A., Lilly, F. R. W., Wu, R., & Guo, S. S. (2004). Family History and Risk of Hair Loss. *Dermatology*, 209(1), 33-39
- Chung, J.-Y., Brown, S., Chen, H., Liu, J., Papadopoulos, V., & Zirkin, B. (2020). Effects of pharmacologically induced Leydig cell testosterone production

- on intratesticular testosterone and spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, 102(2), 489-498.
- Clark, R. V., Hermann, D. J., Cunningham, G. R., Wilson, T. H., Morrill, B. B., & Hobbs, S. (2004). Marked Suppression of Dihydrotestosterone in Men with Benign Prostatic Hyperplasia by Dutasteride, a Dual 5 α -Reductase Inhibitor. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(5), 2179-2184.
- Cobb, J. E., White, S. J., Harrap, S. B., & Ellis, J. A. (2009). Androgen Receptor Copy Number Variation and Androgenetic Alopecia: A Case-Control Study. *PLOS ONE*, 4(4), e5081.
- Del Valle, E. M. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochemistry*, 39(9), 1033-1046.
- Dona, A. C., Pages, G., Gilbert, R. G., & Kuchel, P. W. (2010). Digestion of starch: In vivo and in vitro kinetic models used to characterise oligosaccharide or glucose release. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 599-617.
- Ellis, J. A., Scurrah, K. J., Cobb, J. E., Zaloumis, S. G., Duncan, A. E., & Harrap, S. B. (2007). Baldness and the androgen receptor: The AR polyglycine repeat polymorphism does not confer susceptibility to androgenetic alopecia. *Human Genetics*, 121(3), 451-457.
- Famenini, S., & Goh, C. (2014). Evidence for Supplemental Treatments in Androgenetic Alopecia. *Journal of Drugs in Dermatology*, 13(7), 809-812.
- Fernández, L., Martínez-Ohárriz, M. C., Martín, C., Vélaz, I., Sánchez, M., & Zornoza, A. (2008). Analysis of the complexation of gemfibrozil with γ - and hydroxypropyl- γ -cyclodextrins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(4), 943-948.
- Fernandez-Flores, A., Saeb-Lima, M., & Cassarino, D. S. (2019). Histopathology of aging of the hair follicle. *Journal of Cutaneous Pathology*, 46(7), 508-519.

- Floc'h, C. L., Cheniti, A., Connétable, S., Piccardi, N., Vincenzi, C., & Tosti, A. (2015). Effect of a nutritional supplement on hair loss in women. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 14(1), 76-82
- French, D. (1957). The Schardinger Dextrins. En M. L. Wolfrom & R. S. Tipson (Eds.), *Advances in Carbohydrate Chemistry* (Vol. 12, pp. 189-260). Academic Press.
- Friedman, E. S., Friedman, P. M., Cohen, D. E., & Washenik, K. (2002). Allergic contact dermatitis to topical minoxidil solution: Etiology and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 46(2), 309-312.
- Fritsch, M., Orfanos, C. E., & Zouboulis, C. C. (2001). Sebocytes are the Key Regulators of Androgen Homeostasis in Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 116(5), 793-800.
- Frömming, K.-H., & Szejtli, J. (1993). *Cyclodextrins in Pharmacy*. Springer Science & Business Media.
- Gaidamauskas, E., Norkus, E., Butkus, E., Crans, D. C., & Grincienė, G. (2009). Deprotonation of β -cyclodextrin in alkaline solutions. *Carbohydrate Research*, 344(2), 250-254.
- González-Louzao, R., Lucas-Abellán, C., Pérez-Sánchez, H., Pedro Cerón-Carrasco, J., Antonio Gabaldón, J., López-Miranda, S., Josefa Yáñez-Gascón, M., Asín-Llorca, M., & Núñez-Delicado, E. (2020). Encapsulation of finasteride with native and modified γ -cyclodextrins. Extensive characterization of the complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 587, 119619.
- Gould, S., & Scott, R. C. (2005a). 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. *Food and Chemical Toxicology*, 43(10), 1451-1459.
- Hadžiabdić, J., Elezović, A., Rahić, O., & Mujezin, I. (2012a). Effect of Cyclodextrin Complexation on the Aqueous Solubility of Diazepam and Nitrazepam:

- Phase-Solubility Analysis, Thermodynamic Properties. *American Journal of Analytical Chemistry*, 03(12), 811-819.
- Hadžiabdić, J., Elezović, A., Rahić, O., & Mujezin, I. (2012b). Effect of Cyclodextrin Complexation on the Aqueous Solubility of Diazepam and Nitrazepam: Phase-Solubility Analysis, Thermodynamic Properties. *American Journal of Analytical Chemistry*, 03(12), 811.
- Hamilton, J. B. (1951). Patterned Loss of Hair in Man: Types and Incidence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 53(3), 708-728.
- Harding, R. M. (1992). VNTRs in review. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 1(2), 62-71.
- Heemers, H. V., & Tindall, D. J. (2007). Androgen receptor (AR) coregulators: A diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocrine Reviews*, 28(7), 778-808.
- Herz-Ruelas, M. E., Álvarez-Villalobos, N. A., Millán-Alanís, J. M., León-Gutiérrez, H. de, Ocampo-Garza, S. S., Gómez-Flores, M., & Grimalt, R. (2020). Efficacy of Intralesional and Oral Dutasteride in the Treatment of Androgenetic Alopecia: A Systematic Review. *Skin Appendage Disorders*, 6(6), 338-345.
- Hibberts, N., Howell, A., & Randall, V. (1998). Balding hair follicle dermal papilla cells contain higher levels of androgen receptors than those from non-balding scalp. *The Journal of endocrinology*, 156, 59-65.
- Hillmer, A. M., Hanneken, S., Ritzmann, S., Becker, T., Freudenberg, J., Brockschmidt, F. F., Flaquer, A., Freudenberg-Hua, Y., Jamra, R. A., Metzen, C., Heyn, U., Schweiger, N., Betz, R. C., Blaumeiser, B., Hampe, J., Schreiber, S., Schulze, T. G., Hennies, H. C., Schumacher, J., ... Nöthen, M. M. (2005). Genetic Variation in the Human Androgen Receptor Gene Is the Major Determinant of Common Early-Onset Androgenetic Alopecia. *The American Journal of Human Genetics*, 77(1), 140-148.

- Holland, H. L., Xu, W., & Hughes, D. W. (1989). Stereochemistry of reduction by the 5 α -reductase enzyme of *Penicillium decumbens* and the ¹H NMR assignment of 5 α -dihydrotestosterone. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 22, 1760-1761.
- Hoppe, U., Holterhus, P.-M., Wünsch, L., Jocham, D., Drechsler, T., Thiele, S., Marschke, C., & Hiort, O. (2006). Tissue-specific transcription profiles of sex steroid biosynthesis enzymes and the androgen receptor. *Journal of Molecular Medicine*, 84(8), 651.
- Hu, J., Zhang, Z., Shen, W.-J., & Azhar, S. (2010). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & Metabolism*, 7(1), 47.
- Hussain, A., Yang, T., Zaghloul, A.-A., & Ahsan, F. (2003). Pulmonary Absorption of Insulin Mediated by Tetradecyl- β -Maltoside and Dimethyl- β -Cyclodextrin. *Pharmaceutical Research*, 20(10), 1551-1557.
- Inui, S., Fukuzato, Y., Nakajima, T., Kurata, S., & Itami, S. (2007). Androgen Receptor Co-Activator Hic-5/ARA55 as a Molecular Regulator of Androgen Sensitivity in Dermal Papilla Cells of Human Hair Follicles. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(10), 2302-2306.
- Irwig, M. S. (2020). Finasteride and Suicide: A Postmarketing Case Series. *Dermatology*, 236(6), 540-545.
- Jacob, S., & Nair, A. B. (2018). Cyclodextrin complexes: Perspective from drug delivery and formulation. *Drug Development Research*, 79(5), 201-217.
- Jansook, P., Ogawa, N., & Loftsson, T. (2018). Cyclodextrins: Structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 535(1), 272-284.
- Jansook, P., Pichayakorn, W., Muankaew, C., & Loftsson, T. (2016). Cyclodextrin-poloxamer aggregates as nanocarriers in eye drop formulations:

- Dexamethasone and amphotericin B. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 42(9), 1446-1454.
- Karki, R., Pandya, D., Elston, R. C., & Ferlini, C. (2015). Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Medical Genomics*, 8(1), 37.
- Kiesewetter, F., Langer, P., & Schell, H. (1991). Minoxidil stimulates mouse vibrissae follicles in organ culture. *The Journal of Investigative Dermatology*, 96(2), 295-296.
- Kim, D.-H., Lee, S.-E., Pyo, Y.-C., Tran, P., & Park, J.-S. (2020). Solubility enhancement and application of cyclodextrins in local drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 50(1), 17-27.
- Kim, J.-C., Lee, M.-H., & Rang, M.-J. (2003). Minoxidil-Containing Dosage Forms: Skin Retention and After-Rinsing Hair-Growth Promotion. *Drug Delivery*, 10(2), 119-123.
- Kim, M.-S. (2013). Influence of hydrophilic additives on the supersaturation and bioavailability of dutasteride-loaded hydroxypropyl- β -cyclodextrin nanostructures. *International Journal of Nanomedicine*, (8), 2029-2039.
- Kim, S. M., Kang, J.-I., Yoon, H.-S., Choi, Y. K., Go, J. S., Oh, S. K., Ahn, M., Kim, J., Koh, Y. S., Hyun, J. W., Yoo, E.-S., & Kang, H.-K. (2020). HNG, A Humanin Analogue, Promotes Hair Growth by Inhibiting Anagen-to-Catagen Transition. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4553.
- Köhler, J., Schönbeck, C., Westh, P., & Holm, R. (2016). Hydration Differences Explain the Large Variations in the Complexation Thermodynamics of Modified γ -Cyclodextrins with Bile Salts. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(3), 396-405.
- Krause, K., & Foitzik, K. (2006). Biology of the Hair Follicle: The Basics. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 1(25), 2-10.

- Kurkov, S. V., & Loftsson, T. (2013). Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 453(1), 167-180.
- Küster, W., & Happle, R. (1984). The inheritance of common baldness: Two B or not two B? *Journal of the American Academy of Dermatology*, 11(5, 1), 921-926.
- Kwon, T. K., & Kim, J. C. (2010). In vitro skin permeation of monoolein nanoparticles containing hydroxypropyl β -cyclodextrin/minoxidil complex. *International Journal of Pharmaceutics*, 392(1), 268-273.
- Lee, D. H., Yeom, D. W., Song, Y. S., Cho, H. R., Choi, Y. S., Kang, M. J., & Choi, Y. W. (2015). Improved oral absorption of dutasteride via Soluplus®-based supersaturable self-emulsifying drug delivery system (S-SEDDS). *International Journal of Pharmaceutics*, 478(1), 341-347.
- Li, R., Brockschmidt, F. F., Kiefer, A. K., Stefansson, H., Nyholt, D. R., Song, K., Vermeulen, S. H., Kanoni, S., Glass, D., Medland, S. E., Dimitriou, M., Waterworth, D., Tung, J. Y., Geller, F., Heilmann, S., Hillmer, A. M., Bataille, V., Eigelshoven, S., Hanneken, S., Richards, J. B. (2012). Six Novel Susceptibility Loci for Early-Onset Androgenetic Alopecia and Their Unexpected Association with Common Diseases. *PLOS Genetics*, 8(5), e1002746.
- Lima, S. G. B., Pinho, L. A. G., Pereira, M. N., Gratieri, T., Sa-Barreto, L. L., Gelfuso, G. M., & Cunha-Filho, M. (2018). Preformulation studies of finasteride to design matrix systems for topical delivery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 161, 273-279.
- Liu, Lei, & Guo, Q.-X. (2002). The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 42(1), 1-14.
- Liu, Longxiao, & Zhu, S. (2006). Preparation and characterization of inclusion complexes of prazosin hydrochloride with β -cyclodextrin and

- hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40(1), 122-127.
- Loftsson, T, Guðmundsdóttir, H., Sigurjónsdóttir, J. F., Sigurðsson, H. H., Sigfússon, S. D., Másson, M., & Stefánsson, E. (2001). Cyclodextrin solubilization of benzodiazepines: Formulation of midazolam nasal spray. *International Journal of Pharmaceutics*, 212(1), 29-40.
- Loftsson, Thorsteinn. (2015). Excipient pharmacokinetics and profiling. *International Journal of Pharmaceutics*, 480(1), 48-54.
- Loftsson, Thorsteinn, & Brewster, M. E. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of pharmaceutical sciences*, 85(10), 1017-1025.
- Loftsson, Thorsteinn, & Brewster, M. E. (2012). Cyclodextrins as Functional Excipients: Methods to Enhance Complexation Efficiency. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(9), 3019-3032.
- Loftsson, Thorsteinn, & Duchêne, D. (2007a). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 329(1-2), 1-11.
- Loftsson, Thorsteinn, Hreinsdóttir, D., & Másson, M. (2005). Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 302(1), 18-28.
- Loftsson, Thorsteinn, Hreinsdóttir, D., & Másson, M. (2007). The complexation efficiency. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57(1-4), 545-552.
- Lolli, F., Pallotti, F., Rossi, A., Fortuna, M. C., Caro, G., Lenzi, A., Sansone, A., & Lombardo, F. (2017). Androgenetic alopecia: A review. *Endocrine*, 57(1), 9-17.

- Lopedota, A., Cutrignelli, A., Denora, N., Laquintana, V., Lopalco, A., Selva, S., Ragni, L., Tongiani, S., & Franco, M. (2015). New ethanol and propylene glycol free gel formulations containing a minoxidil-methyl- β -cyclodextrin complex as promising tools for alopecia treatment. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41(5), 728-736.
- Lopedota, A., Denora, N., Laquintana, V., Cutrignelli, A., Lopalco, A., Tricarico, D., Maquoud, F., Curci, A., Mastrodonato, M., la Forgia, F., Fontana, S., & Franco, M. (2018). Alginate-Based Hydrogel Containing Minoxidil/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complex for Topical Alopecia Treatment. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107(4), 1046-1054.
- López-Miranda, S., Guardiola, L., Hernández-Sánchez, P., & Núñez-Delicado, E. (2018). Complexation between oleanolic and maslinic acids with native and modified cyclodextrins. *Food Chemistry*, 240(Supplement C), 139-146.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, M. I., Gabaldón, J. A., & Núñez-Delicado, E. (2008). Complexation of resveratrol by native and modified cyclodextrins: Determination of complexation constant by enzymatic, solubility and fluorimetric assays. *Food Chemistry*, 111(1), 262-267.
- Ludwig, E. (1977). Classification of the types of androgenetic alopecia (common baldness) occurring in the female sex. *British Journal of Dermatology*, 97(3), 247-254.
- Malanga, M., Szemán, J., Fenyvesi, É., Puskás, I., Csabai, K., Gyémánt, G., Fenyvesi, F., & Szente, L. (2016). "Back to the Future": A New Look at Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(9), 2921-2931.
- Manne, S., Kakarla, R., Iraavi, P., & Nalluri, B. (2011). Rapid analysis of Finasteride in bulk and formulations by RP-HPLC-PDA method. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 57, 1469-1471.

- Maquoud, F., Zizzo, N., Mele, A., Denora, N., Passantino, G., Scala, R., Cutrignelli, A., Tinelli, A., Laquintana, V., Forgia, F. la, Fontana, S., Franco, M., Lopodota, A. A., & Tricarico, D. (2020). The hydroxypropyl- β -cyclodextrin-minoxidil inclusion complex improves the cardiovascular and proliferative adverse effects of minoxidil in male rats: Implications in the treatment of alopecia. *Pharmacology Research & Perspectives*, 8(3), 583-585.
- Marenich, A. V., Cramer, C. J., & Truhlar, D. G. (2009). Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(18), 6378-6396.
- Mei, X.-Y., Wu, Z.-W., Zhang, C.-Z., Sun, Y., & Shi, W.-M. (2019). A preliminary study of markers for human hair follicle melanin stem cell. *Chinese Medical Journal*, 132(9), 1117-1119.
- Messner, M., Kurkov, S. V., Jansook, P., & Loftsson, T. (2010). Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 387(1), 199-208.
- Min, M.-H., Park, J.-H., Choi, M.-R., Hur, J.-H., Ahn, B.-N., & Kim, D.-D. (2019). Formulation of a film-coated dutasteride tablet bioequivalent to a soft gelatin capsule (Avodart®): Effect of γ -cyclodextrin and solubilizers. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(3), 313-320.
- Mohammad, A., Singh, S., & Swain, S. (2020). Cyclodextrins: Concept to applications, regulatory issues and challenges. *Nanomedicine Research Journal*, 5(3), 202-214.
- Muankaew, C., Jansook, P., & Loftsson, T. (2017). Evaluation of γ -cyclodextrin effect on permeation of lipophilic drugs: Application of cellophane/fused octanol membrane. *Pharmaceutical Development and Technology*, 22(4), 562-570.

- Mura, P. (2015). Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113, 226-238.
- Mura, P. (2020). Advantages of the combined use of cyclodextrins and nanocarriers in drug delivery: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 579, 119181.
- Norwood, O. (1975). Male Pattern Baldness: Classification and Incidence. *Southern Medical Journal*, 68(11), 1359-1365.
- Omar, L., El-Barghouthi, M. I., Masoud, N. A., Abdoh, A. A., Al Omari, M. M., Zughul, M. B., & Badwan, A. A. (2007). Inclusion Complexation of Loratadine with Natural and Modified Cyclodextrins: Phase Solubility and Thermodynamic Studies. *Journal of Solution Chemistry*, 36(5), 605-616.
- Otberg, N., Finner, A. M., & Shapiro, J. (2007). Androgenetic Alopecia. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 36(2), 379-398.
- Poór, V., Juricskay, S., & Telegdy, E. (2002). Urinary steroids in men with male-pattern alopecia. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 53(1), 123-130.
- Randall, V. A., Thornton, M. J., & Messenger, A. G. (1992). Cultured dermal papilla cells from androgen-dependent human hair follicles (e.g. Beard) contain more androgen receptors than those from non-balding areas of scalp. *Journal of Endocrinology*, 133(1), 141-147.
- Rebora, A., & Guarrera, M. (2004). Teloptosis and Kenogen: Two New Concepts in Human Trichology. *Archives of Dermatology*, 140(5), 619-620.
- Reeve, W., Erikson, C. M., & Aluotto, P. F. (1979). A new method for the determination of the relative acidities of alcohols in alcoholic solutions. The nucleophilicities and competitive reactivities of alkoxides and phenoxides. *Canadian Journal of Chemistry*, 57(20), 2747-2754.

- Rishikaysh, P., Dev, K., Diaz, D., Qureshi, W. M. S., Filip, S., & Mokry, J. (2014). Signaling Involved in Hair Follicle Morphogenesis and Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(1), 1647-1670.
- Rompolas, P., & Greco, V. (2014). Stem cell dynamics in the hair follicle niche. *Seminars in cell & developmental biology*, 0, 34-42.
- Rossi, A., Cantisani, C., SCARNÒ, M., Trucchia, A., Fortuna, M. C., & Calvieri, S. (2011). Finasteride, 1 mg daily administration on male androgenetic alopecia in different age groups: 10-year follow-up. *Dermatologic Therapy*, 24(4), 455-461.
- Sagban, H., Abdulbaqi, M., & Ghazy, E. (2020). Enhancement Solubilization of Dutasteride using Microsponge Formulation. *International Journal of Drug Delivery Technology*, 10(1), 60-67.
- Sanderson, J. T. (2006). The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals. *Toxicological Sciences*, 94(1), 3-21.
- Sawaya, M. E., & Price, V. H. (1997). Different Levels of 5 α -Reductase Type I and II, Aromatase, and Androgen Receptor in Hair Follicles of Women and Men with Androgenetic Alopecia. *Journal of Investigative Dermatology*, 109(3), 296-300.
- Sawaya, M. E., & Shalita, A. R. (1998). Androgen Receptor Polymorphisms (CAG Repeat Lengths) in Androgenetic Alopecia, Hirsutism, and Acne. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 3(1), 9-15.
- Schneiderman, E., & Stalcup, A. M. (2000). Cyclodextrins: A versatile tool in separation science. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 745(1), 83-102.
- Severi, G., Sinclair, R., Hopper, J. L., English, D. R., McCredie, M. R. E., Boyle, P., & Giles, G. G. (2003). Androgenetic alopecia in men aged 40–69 years: Prevalence and risk factors. *British Journal of Dermatology*, 149(6), 1207-1213.

- Sigurdsson, H. H., Stefánsson, E., Gudmundsdóttir, E., Eysteinnsson, T., Thorsteinsdóttir, M., & Loftsson, T. (2005). Cyclodextrin formulation of dorzolamide and its distribution in the eye after topical administration. *Journal of Controlled Release*, 102(1), 255-262.
- Sinclair, R. D. (2007). Healthy Hair: What Is it? *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 12(2), 2-5.
- Singh, J., Dartois, A., & Kaur, L. (2010). Starch digestibility in food matrix: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(4), 168-180.
- Singh, U. C., & Kollman, P. A. (1984). An approach to computing electrostatic charges for molecules. *Journal of Computational Chemistry*, 5(2), 129-145.
- Stocco, D. M., Wang, X., Jo, Y., & Manna, P. R. (2005). Multiple Signaling Pathways Regulating Steroidogenesis and Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression: More Complicated than We Thought. *Molecular Endocrinology*, 19(11), 2647-2659.
- Subramanian, P., & Siddalingam, R. (2017). Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems of Poorly Soluble Drug Dutasteride: Formulation and In-Vitro characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(04), 11-22.
- Szejtli, József. (1988). Cyclodextrin Inclusion. *Cyclodextrin Technology* (79-185). s.
- Tang, P., Li, S., Wang, L., Yang, H., Yan, J., & Li, H. (2015). Inclusion complexes of chlorzoxazone with β - and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Characterization, dissolution, and cytotoxicity. *Carbohydrate Polymers*, 131, 297-305.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, NA-NA.
- Uekama, K., Otagiri, M., Uemura, Y., Fujinaga, T., Arimori, K., Matsuo, N., Tasaki, K., & Sugii, A. (1983). Improvement of oral bioavailability of prednisolone

- by beta-cyclodextrin complexation in humans. *Journal of Pharmacobiodynamics*, 6(2), 124-127.
- Uekama, K., Hieda, Y., Hirayama, F., Arima, H., Sudoh, M., Yagi, A & Terashima, H. (2001). Stabilizing and Solubilizing Effects of Sulfobutyl Ether β -Cyclodextrin on Prostaglandin E1 Analogue. *Pharmaceutical Research*, 18, 1578-1585.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., ... Zhu, X. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science*, 291(5507), 1304-1351.
- Ventura, C. A., Giannone, I., Musumeci, T., Pignatello, R., Ragni, L., Landolfi, C., Milanese, C., Paolino, D., & Puglisi, G. (2006). Physico-chemical characterization of disoxaril-dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex and in vitro permeation studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41(2), 233-240.
- Voigt, W., Fernandez, E. P., & Hsia, S. L. (1970). Transformation of Testosterone into 17 β -Hydroxy-5 α -androstan-3-one by Microsomal Preparations of Human Skin. *Journal of Biological Chemistry*, 245(21), 5594-5599.
- Voigt, W., & Hsia, S. L. (1973). Further Studies on Testosterone 5 α -Reductase of Human Skin structural features of steroid inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 248(12), 4280-4285.
- Wagner, L., & Kenreigh, C. (2007). Minoxidil. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (1-5).
- Weigel, N. L., & Moore, N. L. (2007). Steroid Receptor Phosphorylation: A Key Modulator of Multiple Receptor Functions. *Molecular Endocrinology*, 21(10), 2311-2319.

- Woodcock, B.G., Acerbi, D., Merz, P.G, Rietbrock, S & Rietbrock, N. (1993). Supramolecular Inclusion of Piroxicam with β -cyclodextrin: Pharmacokinetic Properties in Man. *European Journal of Rheumatology and Inflammation*, 12 (4), 12-28.
- Yang, C.-C., & Cotsarelis, G. (2010). Review of hair follicle dermal cells. *Journal of Dermatological Science*, 57(1), 2-11.
- Yang, L.-J., Ma, S.-X., Zhou, S.-Y., Chen, W., Yuan, M.-W., Yin, Y.-Q., & Yang, X.-D. (2013). Preparation and characterization of inclusion complexes of naringenin with β -cyclodextrin or its derivative. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 861-869.
- Yi, R. (2017). Mechanisms of Quiescent Hair Follicle Stem Cell Regulation. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 35(12), 2323-2330.
- York, K., Meah, N., Bhojrul, B., & Sinclair, R. (2020). A review of the treatment of male pattern hair loss. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 21(5), 603-612.
- Zhang, C., Qu, Y., Jia, Y.-L., Shang, X.-J., & Bai, S.-P. (2015). Preparation and antitumor effects of glaucocalyxin A- γ -cyclodextrin clathrate. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(8), 14388-14396.
- Zhang, X., Wu, R., Wang, Y., Yu, J., & Tang, H. (2020). Unzipping haplotypes in diploid and polyploid genomes. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 66-72.
- Zhao, Y., & Truhlar, D. G. (2008). Density Functionals with Broad Applicability in Chemistry. *Accounts of Chemical Research*, 41(2), 157-167.
- Zouboulis, C. C. (2009). The skin as an endocrine organ. *Dermato-Endocrinology*, 1(5), 250-252.