



La Universidad Autónoma de Guadalajara

a través del

Decanato de Diseño, Ciencia y Tecnología

otorga el presente

Reconocimiento

a

López Pablos AL, López Martínez LA, Martínez Juárez LG, Leyva Porras CC, Silva Cázares MB, y Saavedra Leos MZ.

Por la presentación en formato CARTEL del trabajo

MODIFICACIÓN DE UNA METODOLOGÍA YA EXISTENTE EN LA OBTENCIÓN DE Beta-LACTOSA PARA AUMENTAR SU GRADO DE PUREZA.

durante el **6° Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía "Ciencia e innovación para la Salud"**, llevado a cabo del 27 al 29 de septiembre.

Zapopan, Jalisco, México, 29 de septiembre de 2017.

MSC. Tomas Ornelas Salas
Director de la Facultad de Ciencias Químicas

MVZ Fernando Gabriel Cinco Castellanos
Director de la Facultad de Ciencias Biológico Agropecuarias

Capítulos temáticos de Biología, Química y Agronomía.

Ciencia e innovación para la salud.

José Luis Zavala Aguirre
Juan Villafaña Rojas
Froylán Mario Espinoza Escalante
Editores

Editorial Universidad Autónoma de Guadalajara

MODIFICACIÓN DE UNA METODOLOGÍA YA EXISTENTE DE OBTENCIÓN DE B-LACTOSA PARA AUMENTAR SU GRADO DE PUREZA.

^{1,2}López-Pablos, A.L., ¹Silva-Cázares, M.B., ³López-Martínez, L.A., ³Martínez-Juárez, L.G., ⁴Leyva-Porras, C.C., y ^{1*}Saavedra-Leos, M.Z.

1. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Coordinación Académica Región Altiplano, Carretera a Cedral km. 5+600, Ejido San José de las Trojes, Matehuala, S.L.P., C.P. 78700, México.
2. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Doctorado Institucional en Ingeniería y Ciencia de Materiales (DICIM), Sierra Leona 530, Col. Lomas, 2a. Sección, Planta Baja, San Luis Potosí, S.L.P, México.
3. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Coordinación Académica Región Altiplano Oeste, Carretera Salinas-Santo Domingo # 200, C.P. 78600 Tel. +52(496)963.4030 Salinas de Hidalgo, S.L.P México.
4. Centro de Investigación de Materiales Avanzados (CIMA), Miguel de Cervantes # 120, Complejo Industrial Chihuahua. C.P. 31109 Chihuahua, Chih., México.

*Autor para correspondencia: zenaida.saavedra@uaslp.mx

Área del conocimiento: Química Farmacobiológica

RESUMEN

La lactosa puede cristalizar en diferentes formas: α -lactosa monohidratada, β -lactosa anhidra, α -lactosa anhidra higroscópica inestable y α -lactosa anhidra estable. De éstas, la α -lactosa monohidratada y la β -lactosa anhidra son las más utilizadas como excipientes en la industria farmacéutica, debido a la gran estabilidad termodinámica que presentan. Comercialmente, la α -lactosa monohidratada puede encontrarse con niveles de pureza mayores o iguales al 99%; por otro lado, la β -lactosa anhidra no está disponible como una fase única, ya que usualmente es una mezcla de β -lactosa anhidra y α -lactosa anhidra estable, normalmente en una proporción 60 β :40 α . Aunado a esto, una gran cantidad de investigadores han realizado trabajos encaminados a la obtención de una metodología de producción de este polimorfo con una pureza mayor a la comercial. El porcentaje de pureza más alto de β -lactosa anhidra obtenido hasta la fecha ha sido el logrado por la metodología de Olano y Ríos en 1978, quienes lograron la obtención de este polimorfo con un rendimiento de aproximadamente el 94%. Por lo que, en este trabajo de investigación, se llevó a cabo la modificación de esta metodología, consiguiendo la obtención de una β -lactosa anhidra con un porcentaje de pureza del 100%, lo cual no se había logrado anteriormente.

Palabras clave: β -lactosa; pureza; metodología.

INTRODUCCIÓN

La lactosa (4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucopiranososa), conocida también como el azúcar de la leche, es un disacárido constituido por una molécula de D-galactosa y otra de D-glucosa, unidas mediante un enlace glucosídico β (1,4) [1]. Existe en los estereoisómeros α y β , los cuales difieren en el arreglo espacial del grupo hidroxilo en el carbono 1 del grupo hemiacetal [2,3]. En solución, la tasa de transformación entre los anómeros α y β es llamada mutarrotación, y es dependiente de la temperatura y el pH [4,5].

En estado sólido, la lactosa puede ser encontrada en forma amorfa, cristalina o una mezcla de ambas. En la lactosa amorfa las moléculas no están ordenadas de acuerdo a un patrón regular y es una mezcla de moléculas de α - y β -lactosa. Tiene un alto estado de energía, comparada con la lactosa cristalina, por lo que es termodinámicamente inestable. La lactosa amorfa se obtiene cuando una solución se seca rápidamente, tal como en el secado por aspersión o la liofilización; aunque también puede formarse mediante procesos mecánicos, como la molienda [5,6]. Por otro lado, la lactosa cristalina presenta una estructura muy ordenada y la forma exacta del cristal depende de las condiciones del proceso de cristalización. Ésta puede cristalizar en diferentes formas, es decir, presenta polimorfismo [1,7]. Existen cuatro formas polimórficas reconocidas de la lactosa, que consisten en una forma hidratada: α -lactosa monohidratada; y tres anhidras: β -lactosa anhidra, α -lactosa anhidra higroscópica inestable y α -lactosa anhidra estable [7,8,9].

Actualmente, sólo la α -lactosa monohidratada y la β -lactosa anhidra son producidas de manera comercial. La α -lactosa monohidratada es la única forma disponible en una sola fase (libre del anómero β -) por lo que gran parte de las investigaciones relacionadas con la caracterización de la lactosa han sido sobre este polimorfo. En cambio, la β -lactosa anhidra sólo puede ser encontrada comercialmente como una mezcla de β -lactosa anhidra y α -lactosa anhidra estable, normalmente en una proporción 60 β :40 α [7]. Las versiones más puras pueden contener alrededor de un 85% del anómero β - y el resto de α -lactosa monohidratada o α -lactosa anhidra [10].

Una gran cantidad de trabajos han sido encaminados al establecimiento de una metodología de purificación de la β -lactosa anhidra con el fin de obtener una muestra policristalina monofásica (totalmente libre del anómero α -); sin embargo, todos ellos han dado como resultado la producción de cristales con más de una fase que contienen a este polimorfo en porcentajes no mayores al 98%. Por ejemplo, en el procedimiento descrito por Parrish y colaboradores en 1979 [11], se utilizaron α -lactosa monohidratada, octaacetato de α -lactosa y octaacetato de β -lactosa como reactivos iniciales, los cuales se pusieron en contacto (cada uno) con soluciones metanólicas de metóxido de potasio. Las reacciones de conversión se llevaron a cabo a dos temperaturas, ambiente y de ebullición (alrededor de 65°C), en tiempos que oscilaban entre las 0.5 horas a las 24 horas. Al analizar las muestras resultantes mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), se determinó que la más pura contenía un 98% de β -lactosa, obtenida al poner en contacto α -lactosa monohidratada, como reactivo inicial, con una solución 0.014M de metóxido de potasio en metanol, durante 2 horas y a una temperatura de reflujo. Sin embargo, estos autores no mencionan con claridad si el producto obtenido es cristalino o amorfo, y tampoco presentan los difractogramas que determinan la estructura del estado sólido de su muestra. Por otro lado, Olano y Ríos, en 1978 [12], estudiaron la producción de β -lactosa anhidra a partir de α -lactosa monohidratada, utilizando soluciones alcohólicas de hidróxido de sodio en metanol. En sus experimentos probaron el efecto de diversos factores sobre la reacción de conversión, como la temperatura (ambiente y de ebullición), la concentración de las soluciones alcohólicas, la humedad en el metanol utilizado, así como la proporción de α -lactosa monohidratada y solución alcohólica. Determinaron que la mayor conversión fue lograda a temperatura ambiente y después de 10 horas de reacción con agitación constante, utilizando una proporción 1:10 de α -lactosa monohidratada y una solución al 0.2% de hidróxido de sodio en metanol anhidro, respectivamente. El producto obtenido bajo estas condiciones fue analizado mediante cromatografía de gas-líquido y se determinó que contenía un 93.6% de β -lactosa. No obstante,

estos autores no analizaron sus muestras mediante Rayos X para determinar si efectivamente se trataba de lactosa cristalina.

Las metodologías establecidas por Parrish y colaboradores, así como la de Olano y Ríos, 1978, son las que mayor éxito han tenido en cuanto a la obtención de una β -lactosa con alto grado de pureza; no obstante, sus resultados no son suficientes para demostrar que efectivamente obtuvieron al polimorfo en la pureza que ellos manifiestan, ya que carecen del análisis de sus muestras mediante técnicas que determinan la estructura del estado sólido, como la de Rayos X (XRD). Parrish y colaboradores, mencionan en sus resultados el uso de esta técnica, sin embargo, no muestran los difractogramas y tampoco hacen una descripción de los mismos. Por otro lado, Olano y Ríos dicen haber obtenido al polimorfo en una pureza que sobrepasa el 90%; no obstante, la técnica que utilizaron para establecerlo fue la de cromatografía gas-líquido, la cual sólo cuantifica la proporción del anómero (α - β), más no la de los polimorfos presentes en la muestra, es decir, es una técnica que no determina la estructura del estado sólido. Por esa razón, en el presente trabajo de investigación se escogió una de las metodologías establecida por los autores anteriores: la de Olano y Ríos, por ser la más sencilla y obtener los máximos rendimientos a temperaturas ambientales, con el fin de mejorarla y lograr la producción de una β -lactosa anhidra con una pureza mayor a las obtenidas anteriormente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó α -lactosa monohidratada con una pureza $\geq 99\%$ marca Sigma, para la obtención de la β -lactosa anhidra. Para la preparación de la solución alcohólica de sal inorgánica se empleó Hidróxido de sodio (NaOH) marca MACRON y Metanol (CH_3OH) marca Sigma-Aldrich, grado HPLC, con una pureza $\geq 99.9\%$.

La metodología del presente trabajo de investigación se describe en los siguientes puntos.

Análisis de la metodología de Olano y Ríos y puesta a punto de la técnica.

La metodología de Olano y Ríos, 1978, así como las condiciones de experimentación de la misma, se describen a continuación de manera general:

1. Preparar una solución alcohólica al 0.2% de hidróxido de sodio utilizando metanol como solvente.
2. Poner en contacto la α -lactosa monohidratada y la solución alcohólica, en una proporción 1:10, durante 10 horas, a temperatura ambiente (25°C) y con agitación, para lograr la conversión máxima a β -lactosa anhidra.
3. Filtrar la mezcla de α -lactosa monohidratada y solución alcohólica.
4. Poner a secar el polvo retenido en el filtro, con vacío y a temperatura ambiente, durante dos horas.

Con base en esta metodología se realizaron 5 ensayos, variando algunos parámetros de la misma, como la temperatura, el tiempo de contacto del polvo de α -lactosa monohidratada con la solución alcohólica de base inorgánica, la agitación de los lotes y el modo de secado de los polvos. Las condiciones experimentales de estos ensayos, así como las de la metodología de Olano y Ríos, 1978, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones experimentales de los ensayos realizados y de la metodología de Olano y Ríos, 1978.

Ensayo	Reactivos de la solución alcohólica	Concentración de la solución alcohólica (%)	Proporción de la suspensión (L _α .H ₂ O : solución alcohólica)	Temperatura del ensayo (°C)	Tiempo de contacto (h)	Agitación	Secado	
							Tiempo	Vacío
1	NaOH y CH ₃ OH	0.2	1:10	64.7 ^a	1.5	Constante	1 semana	No
2	NaOH y CH ₃ OH	0.2	1:10	Ambiente ^b	72	Nula	1 semana	No
3	NaOH y CH ₃ OH	0.2	1:10	50 a 55	1.5	Nula	1 semana	No
4	NaOH y CH ₃ OH	0.2	1:10	24 a 29	15	Constante	1 semana	No
5	NaOH y CH ₃ OH	0.2	1:10	26, 29 y 32 ^c	72	Nula	1 semana	No
OR ^d	NaOH y CH ₃ OH	0.2	1:10	25	10	Constante	2 horas	Si

a Temperatura de ebullición del metanol.

b Temperatura ambiental no registrada.

c Temperatura controlada con incubadora.

d Metodología de Olano y Ríos, 1978.

En los ensayos 1 al 4 se manejó, en cada uno, sólo un lote de 40 g de α -lactosa monohidratada con 489.5 mL de solución alcohólica, que equivale a una proporción 1:10, lactosa:solución alcohólica. En el ensayo 5, se manejaron tres lotes, con las mismas cantidades y proporciones que en los otros ensayos. En los ensayos 1 y 3, la mezcla de α -lactosa monohidratada y la solución alcohólica fue reflujada; en los ensayos 2 y 4, fue mantenida a temperatura ambiente, y en el ensayo 5, cada uno de los tres lotes estuvieron a diferentes temperaturas: 26°C, 29°C y 32°C, respectivamente. Los polvos obtenidos al filtrar, en todos los ensayos, fueron colocados en un desecador por una semana a temperatura ambiente. Sólo en los ensayos 1 y 4, la mezcla de α -lactosa monohidratada y solución alcohólica se mantuvo con agitación constante; en el resto de los ensayos, la agitación fue nula.

Caracterización térmica por DSC.

Se caracterizaron térmicamente los polvos obtenidos en cada uno de los cinco ensayos experimentales, empleando la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC), para dilucidar la presencia de β -lactosa anhidra en las muestras analizadas, mediante el establecimiento de parámetros termodinámicos, como la entalpía (ΔH) y la capacidad calorífica (C_p).

Las muestras se pesaron en un rango de 5 a 10 mg y se utilizaron celdas de aluminio Tzero® (TA Instruments) para ser analizadas en un equipo DSC Q200 (TA Instruments, U.S.A.), equipado con un sistema de enfriamiento RCS90, para efectuar el análisis en un rango de temperatura de -90 a 550°C,

con precisión y sensibilidad de $\pm 0.1^\circ\text{C}$ y $\pm 0.2 \mu\text{W}$. La línea base fue calibrada con Indio (156.60°C , 28.47 J/g) y la capacidad calorífica, con zafiros. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Caracterización por espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

Una vez realizada la caracterización térmica de los polvos, la muestra a 29°C del ensayo 5 fue sometida a un análisis de espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), con el fin de corroborar la presencia de β -lactosa anhidra en la misma. El análisis fue realizado en un espectrofotómetro de infrarrojo marca Thermo, modelo Nicolet iS50 FTIR, empleando su accesorio Smart Orbit de reflectancia total atenuada (ATR) con cristal de diamante. Para la interpretación de los espectros se usó el software Omnic 9.3.32., que fueron adquiridos en un intervalo de 4000 a 600 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} y 32 barridos por análisis. Antes de cada análisis se registró la lectura de un blanco correspondiente al portamuestras sin muestra.

Caracterización mediante Rayos X (XRD).

Se sometió la muestra a 29°C del ensayo 5 a un análisis para dilucidar la estructura del estado sólido. Para ello, se utilizó un difractómetro de rayos X marca PANalytical, modelo Empyrean, equipado con un detector X'Celerator en una geometría Bragg-Brentano. El barrido de las muestras se realizó en un rango de 2θ de 0° a 100° .

Determinación de la pureza.

Se determinó la pureza de la muestra a 29°C del ensayo 5 utilizando el Método de refinamiento Rietveld, mediante el análisis de dos patrones de difracción de Rayos X (XRD) en el software Xpert HighScore Plus: uno experimental y otro teórico. El patrón experimental utilizado fue el de los parámetros de difracción de los cristales de β -lactosa obtenida en el laboratorio, y el teórico, una base de datos con parámetros de difracción de una mezcla de α -lactosa monohidratada y β -lactosa anhidra, tomada de la librería del software antes mencionado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Primeramente, se realizó la caracterización térmica por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de la α -lactosa monohidratada marca Sigma y de los polvos de los ensayos 1 al 4. Los termogramas de DSC se muestran en la Figura 1. Para la α -lactosa monohidratada, pueden observarse dos eventos térmicos característicos de este polimorfo: uno en aproximadamente 145°C , correspondiente a la evaporación de la molécula de agua, y otro a 220°C , perteneciente a la degradación del compuesto. Este termograma coincide con los obtenidos por Figura y Epple en 1995 y por Brittain y Blaine [13,14], para la α -lactosa monohidratada. Con respecto a los termogramas de los polvos de los ensayos 1, 3 y 4, se observan igualmente los endotermas presentados en la α -lactosa monohidratada, a las mismas temperaturas, lo cual significa que no hubo conversión a β -lactosa anhidra. No obstante, el termograma del ensayo 2 muestra sólo un evento térmico a aproximadamente 235°C , que de acuerdo a estudios realizados por Figura y Epple, 1995, y Brittain y Blaine, corresponde al endoterma característico de la β -lactosa anhidra, el cual pertenece a la degradación térmica de la misma. Con esto se concretó la transformación de α -lactosa monohidratada a β -lactosa anhidra en este ensayo.

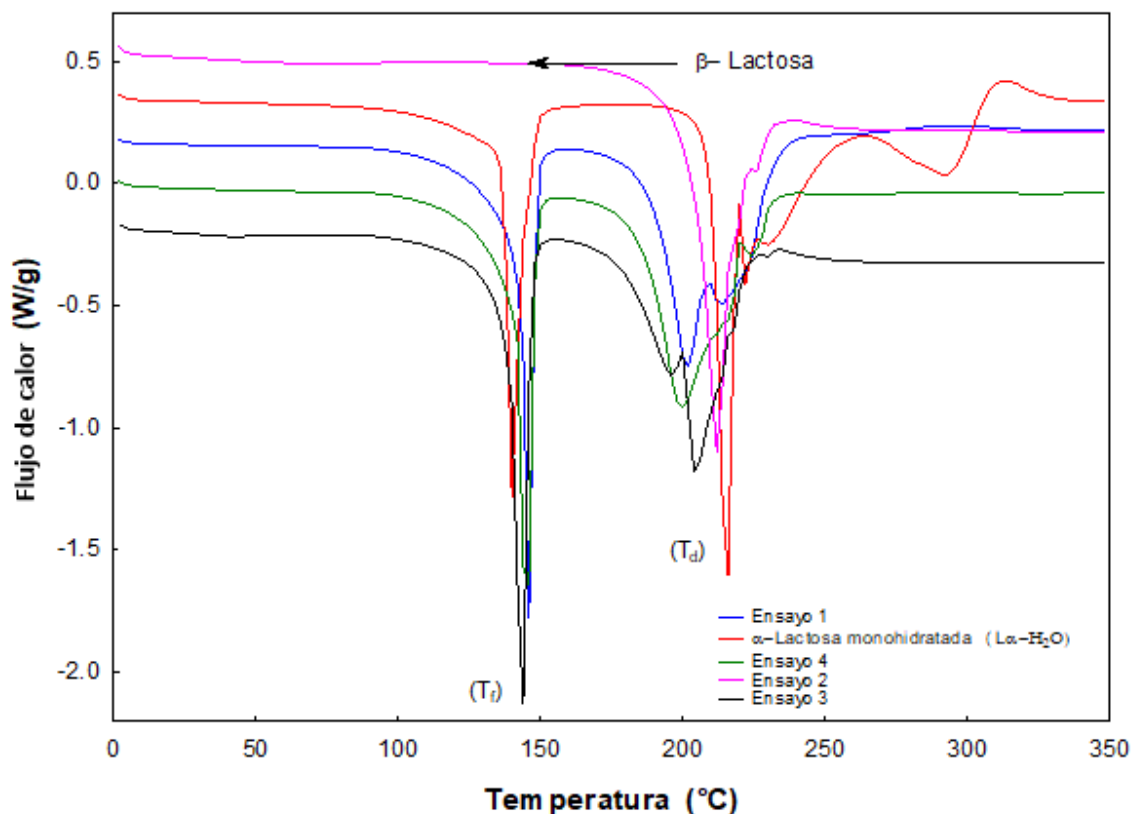


Figura 1. Termogramas de DSC de la α -Lactosa monohidratada y de las muestras de los ensayos experimentales 1 al 4.

El termograma del ensayo 2 sirvió para concretar las condiciones experimentales en las que se llevó a cabo la conversión de α -lactosa monohidratada en β -lactosa anhidra, que fueron: una temperatura ambiente (la cual no se registró, pero estuvo en un rango aproximado de 25 a 29°C), agitación nula, un tiempo de contacto de la α -lactosa monohidratada con la solución alcohólica de entre 1 a 72 horas y secado de los polvos en un desecador a temperatura ambiente. Con el fin de poner a punto la técnica de obtención de β -lactosa, se realizó el ensayo 5, cuyas condiciones experimentales se basaron en las del ensayo 2. En el ensayo 5, tres lotes de proporción 1:10 (α -lactosa monohidratada:solución alcohólica) fueron sometidos a diferentes temperaturas cada uno: 26°C, 29°C y 32°C, por 72 horas. Al final de ese tiempo, fueron filtrados y secados en un desecador por una semana a temperatura ambiente. Finalmente, fueron sometidos a un análisis por DSC y los termogramas resultantes se muestran en la Figura 2. Puede observarse que los termogramas de los ensayos a 26°C y 32°C muestran los endotermas característicos de la α -lactosa monohidratada, lo que significa que no hubo conversión a β -lactosa. Esto no sucede con el termograma a 29°C, en el cual sólo se observa un endoterma aproximadamente a 235°C, característico de la forma β -anhidra. Con estos resultados, se pudo determinar que la temperatura a la cual se llevó a cabo la conversión del 100% fue la de 29°C.

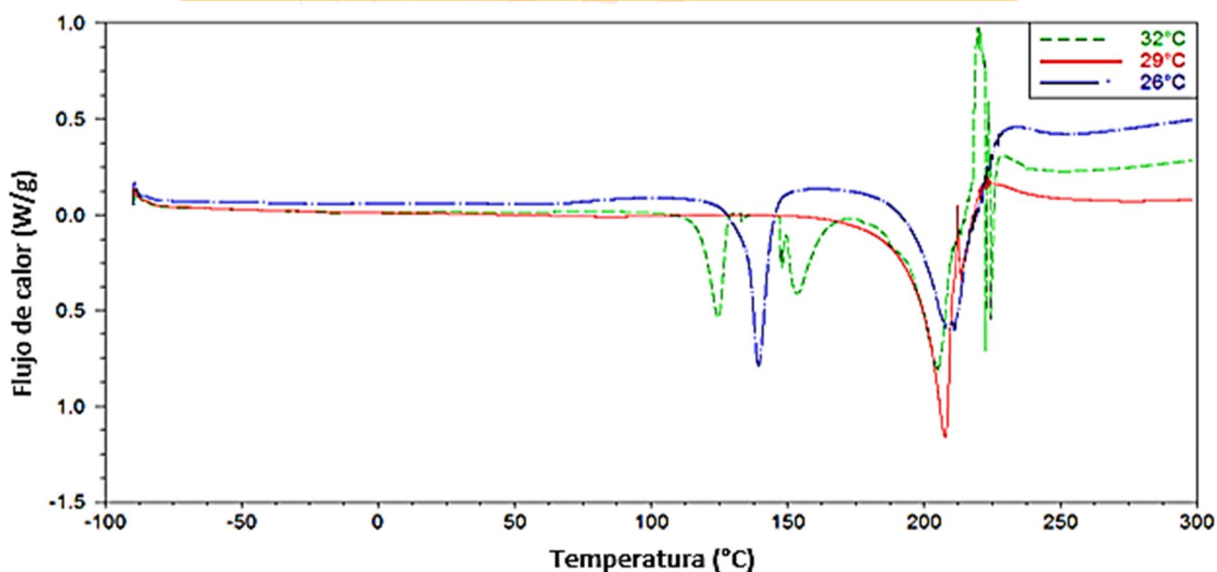


Figura 2. Termogramas de DSC de las muestras del ensayo 5.

Espectros de Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).

Una vez realizado el análisis térmico de los polvos obtenidos en los ensayos 1 al 5, se procedió al análisis de la muestra de 29°C del ensayo 5 por FTIR, que fue en la que se obtuvo la β -lactosa. El espectro resultante se muestra en la Figura 3. En éste se exhibe una banda en 3200 a 3600 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de estiramiento simétrico de los grupos hidroxilo, así como la banda en 1070 a 1200 cm^{-1} , perteneciente a la vibración de flexión del enlace glicosídico. La banda característica del anómero β puede observarse a 948 cm^{-1} , la cual coincide con el espectro de IR de este polimorfo, reportado ya anteriormente por otros investigadores, para la β -lactosa anhidra [7,8]. Con este análisis se corrobora la presencia de este polimorfo en la muestra.

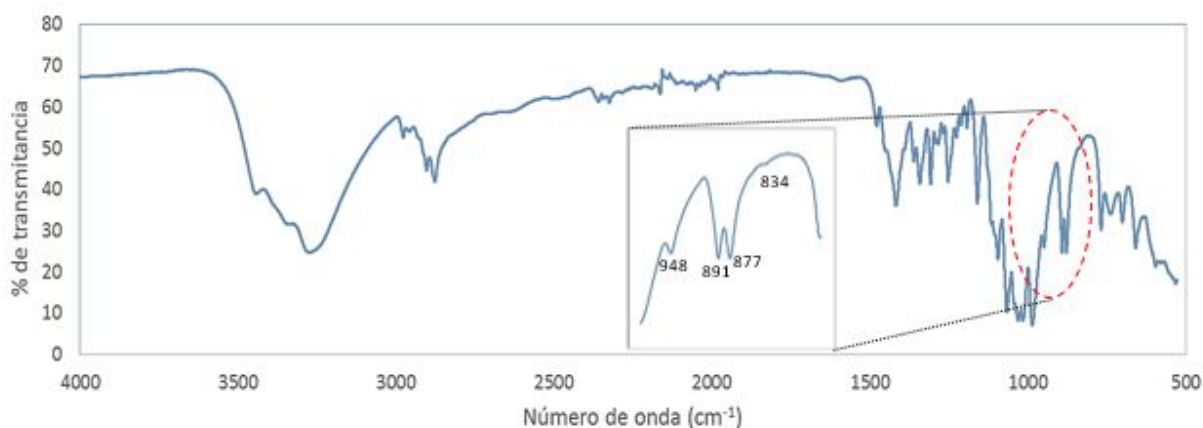


Figura 3. Espectro de FTIR de la muestra de 29°C del ensayo 5.

Difractogramas de Rayos X de Polvos (PXRD).

Con el fin de establecer la estructura del estado sólido de la muestra de 29°C del ensayo 5, ésta fue sometida a un análisis de PXRD. El difractograma obtenido se muestra en la Figura 4 y en él se pueden observar claramente picos bien definidos, propios del estado cristalino. El difractograma concuerda con los obtenidos previamente por otros autores, para la β -lactosa anhidra [7,13,27], y el cual exhibe picos característicos de este polimorfo en 10.5°, 18.8-20° y 20.5-21.5°.

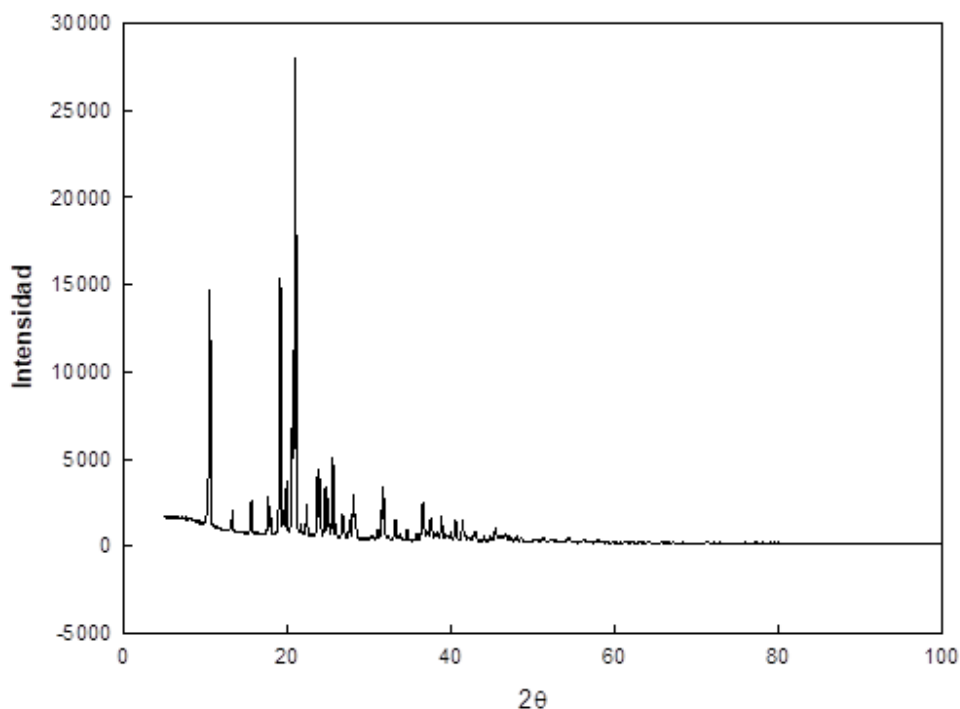


Figura 4. Difractograma de PXRD de la muestra de 29°C del ensayo 5.

Pureza de la β -lactosa anhidra obtenida en el laboratorio.

Por último, se sometió la muestra de 29°C del ensayo 5 a un análisis de pureza. Para ello, se comparó el patrón del difractograma de PXRD de la muestra de estudio (patrón experimental), con otro (patrón teórico) contenido en el software Xpert HighScore Plus, mediante el refinamiento de Rietveld. Con los resultados de este refinamiento se estableció que la muestra estaba compuesta de un 100% por β -lactosa anhidra. En la Figura 5 se presentan los difractogramas de ambos patrones (experimental y teórico) y en la Figura 6 se muestra la composición de la muestra analizada en una gráfica de pastel.

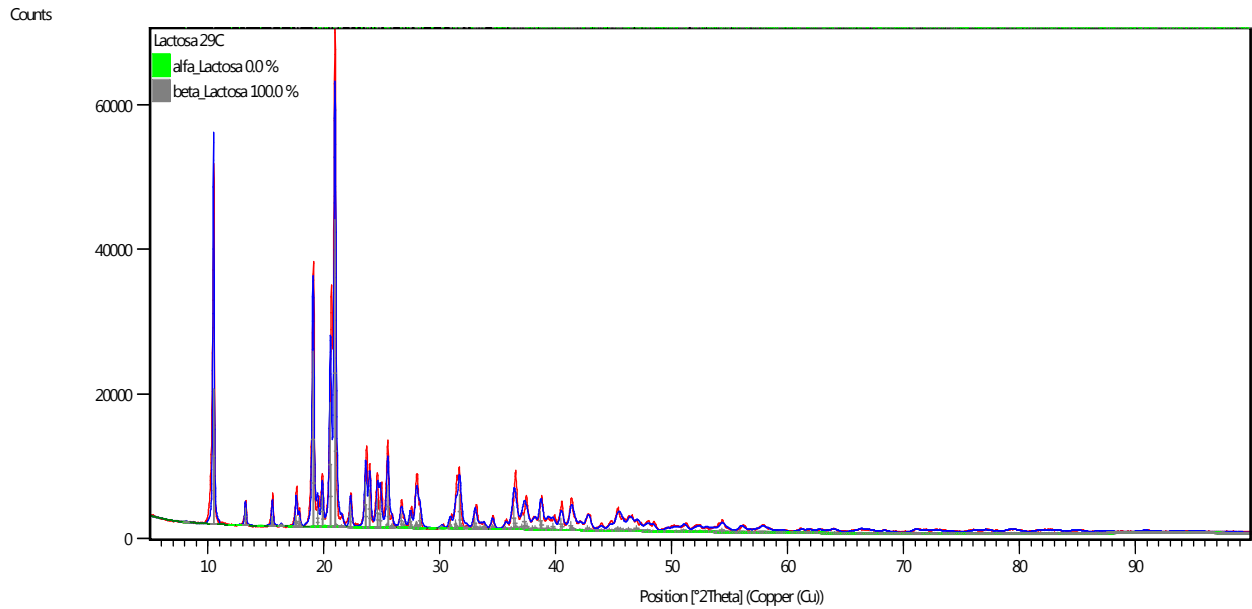


Figura 5. Difractogramas de los patrones experimental y teórico (Software HighScore Plus).

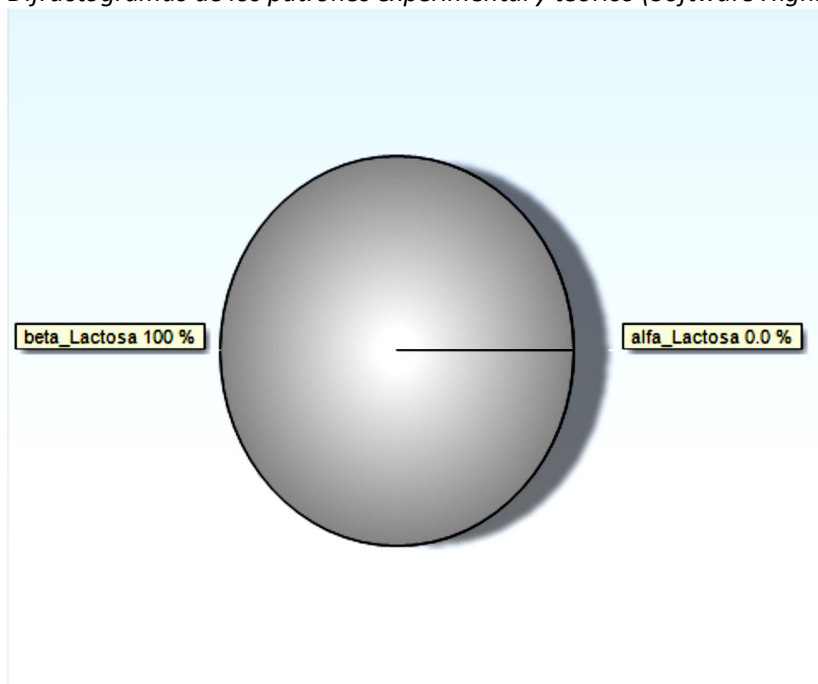


Figura 6. Porcentaje de β -lactosa anhidra en la muestra de 29°C del ensayo 5.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se modificaron algunos parámetros y aspectos de la metodología de Olano y Ríos, 1978, como la temperatura, el tiempo de contacto de la α -lactosa monohidratada con la solución alcohólica, la agitación de los lotes y el modo de secado de los mismos, con el fin de obtener una β -lactosa anhidra con un mayor grado de pureza que las obtenidas por las metodologías ya existentes. Para ello, se realizaron cinco ensayos experimentales, y al analizar mediante diversas técnicas analíticas, como DSC, FTIR y PXRD, las muestras obtenidas en cada uno, se estableció que al poner en contacto el polvo de α -lactosa monohidratada con una solución alcohólica al 0.2% de hidróxido de sodio en metanol, en una proporción 1 a 10 (lactosa:solución alcohólica), sin agitación, durante 72 horas a 29°C y secar el polvo (una vez filtrado) en un desecador por una semana, se obtiene una β -lactosa anhidra con una pureza del 100%. Este resultado no había sido logrado con ninguna de las metodologías de producción ya existentes. Es importante mencionar que, aunque los resultados de esta investigación han sido inéditos, es necesario complementarlos con un análisis de estabilidad de la β -lactosa obtenida. Por lo que, en un trabajo posterior se someterá el polimorfo producido, a diferentes condiciones de humedad y temperatura, y se analizará su comportamiento, con el fin de determinar las condiciones óptimas de su almacenamiento y producción, para así poder garantizar su estabilidad en su uso como excipiente en la elaboración de medicamentos.

REFERENCIAS

- [1] M. Carpin, H. Bertelsen, J.K. Bech, R. Jeantet, J. Risbo, and P. Schuck, "Trends in Food Science & Technology Caking of lactose : A critical review," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 53, pp. 1–12, 2016.
- [2] R. Jawad, C. Elleman, L. Vermeer, A.F. Drake, B. Woodhead, G.P. Martin, and P.G. Royall, "The measurement of the β/α anomer composition within amorphous lactose prepared by spray and freeze drying using a simple ¹H-NMR method," *Pharmaceutical Research*, vol. 29, pp. 511-524, 2012.
- [3] V.H. Holsinger, "Lactose," in *Fundamentals of dairy chemistry*, N. Wong, R. Jenness, M. Keeney and E. Marth, Ed. Springer: U.S., 1988, pp. 279-342.
- [4] S. Badui Dergal, "Química de los alimentos," 4ª edición, Alhambra Mexicana: México, 1986, pp. 373-374.
- [5] V.H. Holsinger, "Physical and chemical properties of lactose," *Advanced dairy chemistry*, vol. 3, pp. 1-38, 1997.
- [6] H. Newell, G. Buckton, D. Butler, F. Thielmann, and W.R. Daryl, "The use of inverse phase gas chromatography to measure the surface energy of crystalline, amorphous, and recently milled lactose," *Pharmaceutical Research*, vol. 18, no. 5, pp. 662-666, 2001.
- [7] J.H. Kirk, S.E. Dann, and C.G. Blatchford, "Lactose: A definitive guide to polymorph determination," *International journal of pharmaceuticals*, vol. 334, pp. 103-114, 2007.
- [8] Y. Listiohadi, J.A. Hourigan, R.W. Sleigh, and R.J. Steele, "Thermal analysis of amorphous lactose and α -lactose monohydrate," *Dairy Science and Technology*, vol. 89, pp. 43-67, 2009.
- [9] S. Ziffels and H. Steckel, "Influence of amorphous content on compactation behavior of anhydrous α -lactose," *International journal of pharmaceuticals*, vol. 387, pp. 71-78, 2010.
- [10] G.K. Bolhuis and K. Zuurman, "Tableting properties of experimental and commercially available lactose granulations for direct compression," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 21, pp. 2057-2071, 1995.

- [11] F.W. Parrish, K.D. Ross, and T.D. Simpson, "Formations of β -lactose from α - and β -lactose octaacetates and from α -lactose monohydrates," *Carbohydrate Research*, vol. 71, pp. 322–326, 1979.
- [12] A. Olano and J.J. Rios, "Treatment of lactose with alkaline methanolic solution: Production of beta-lactose from alpha-lactose hydrate," *Journal of Dairy Science*, vol. 61. pp. 300-302, 1978.
- [13] L.O. Figura and M. Epple, "Anhydrous alpha-lactose: a study with DSC and TXRD," *Journal of Thermal Analysis*, vol. 44. pp. 45–53, 1995.
- [14] H.G. Brittain and R.L. Blaine, " α -Monohydrate Phase in Lactose by DSC", TA instruments, U.S., *Base de datos TA 293*, pp. 10–12.
- [15] A. Gombás, I. Antal, P. Szabo-Révész, S. Marton, and I. Eros, "Quantitative determination of crystallinity of alpha-lactose monohydrate by Near Infrared Spectroscopy (NIRS)," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 256. pp. 25-32, 2002.