



“2018 – AÑO DEL CENTENARIO DE LA REFORMA UNIVERSITARIA”

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica
UNITEFA-CONICET

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS SUPRAMOLECULARES DE SÓLIDOS FARMACÉUTICOS

Farm. Julieta Abraham Miranda

Director de Tesis: Prof. Dra. Marcela Longhi

Córdoba, Argentina

Comisión Evaluadora:

Dra. Nancy Ferreyra

Dra. Mariana Fernández

Dra. Claudia Garnero

Dr. Darío Leonardi

El presente trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo económico obtenido a través de becas y subsidios otorgados por: Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT-UNC) y al **recientemente cerrado** Ministerio de Ciencia y Tecnología (MinCyT).

Dedicada a las personas que, sin buscarlo, me enseñaron a mirar la vida de otra manera...

A las personas que empatizan con el resto...

A los que entendieron que es más fácil si estamos acompañados...

AGRADECIMIENTOS

Estoy segura que al nombrarlos me voy a olvidar de mucha gente por lo que voy a comenzar agradeciendo a todas las personas que se cruzaron en mi camino en estos años tanto a nivel personal, en el área de ciencia y de docencia, ya que a su manera todos aportaron un poquito para que complete esta hermosa etapa.

Agradezco...

...a mi directora, Dra. Marcela Longhi, por brindarme la posibilidad de iniciarme en este mundo que es la investigación, por darme la libertad de ir eligiendo mi propio camino y apoyarme en las decisiones que se fueron presentando durante este recorrido y en el que está por venir.

...a la comisión asesora, Dra. Nancy Ferreyra, Dra. Mariana Fernández y Dra. Claudia Garnero, por la paciencia durante las charlas de avance de resultados, por tomarse el tiempo de leer este trabajo y por los excelentes aportes efectuados a lo largo de los años.

...al evaluador externo, Dr. Darío Leonardi, por aceptar evaluar este trabajo y por las acertadas devoluciones realizadas.

...al Dr. Alejandro Pedro Ayala y su grupo de trabajo quienes me recibieron en su laboratorio en el departamento de física de la Universidad Federal de Ceará (Fortaleza, Brasil) donde pude realizar gran parte de la caracterización de los sistemas supramoleculares. Muchas gracias también Alejandro por tu ayuda en el análisis y en la interpretación de los resultados obtenidos.

...al Dr. Guilles Ponchel y su grupo de trabajo quienes me recibieron en su laboratorio en el *Institut Galien* de la Facultad de Farmacia de la Universidad Paris-Sud (Châtenay-Malabry, Francia) donde, a pesar de no haber obtenido resultados para este trabajo, se interesaron en mi proyecto de tesis y me ayudaron en la interpretación de mis resultados previos.

...a mis jefas y compañeros de docencia, que fueron muchos y muy cambiantes a lo largo de estos años pero que siempre estuvieron presentes para brindar apoyo y un “cambio de comisión” cuando era necesario.

...a todo el grupo de personas que conforman UNITEFA, con quienes además de compartir charlas, seminarios y organizaciones/asistencias a congresos (esperamos no organizar más congresos por un buen tiempo) compartimos eventos extraacadémicos con el propósito de unirnos y motivar al personal científico y no científico que forman este instituto

(siempre estamos dispuestos a aumentar el número de actividades extraacadémicas para continuar motivados).

...al departamento de Ciencias Farmacéuticas en su totalidad, con su personal docente, no docente y los alumnos/practicantes (especialmente a Juli Zallio) que pasaron por esas paredes durante estos años. Gracias por las charlas en los pasillos, en el destilador, en la salita de instrumental, en la cocina y hasta en el baño con las mujeres.

...a la Facultad de Ciencias Químicas por darme la posibilidad de acceder a mi título de farmacéutica y muy pronto al de doctora, porque soy quien soy en gran parte gracias a esta institución que me vio crecer a lo largo de más de 10 años.

...a la Universidad Nacional de Córdoba por su sistema de enseñanza público, laico y gratuito. Espero de corazón que las futuras generaciones tengan la posibilidad de acceder a esta casa de estudios bajo las condiciones de excelencia y calidad que aún hoy conocemos.

Un poco más en lo personal voy a agradecer...

...a todo el "*Longhi's Team*" (Marcela, Ari, Clau, Vicky, Caro, Vane, Anto, Sole, Agus, Mica, Juampi) por la ayuda brindada en estos años en lo laboral y en lo personal, por las charlas compartidas, por los mates (ya sea por los dulces, amargos, lavados o fríos) y por tantas comidas ricas con o sin motivo de festejo alguno. Además, dentro del grupo no puedo dejar de nombrar especialmente a Vane (gracias por hacer más disfrutables los días de cursos y experimentos, por las divertidas mañanas y tardes en el disolutor y por sufrir conmigo por nuestros experimentos fallidos, cuando se nos cortaba la luz, cuando algo se nos contaminada o no nos daba como esperábamos), a Ari (gracias por ese primer llamado telefónico para invitarme a formar parte del grupo, por confiar en mí desde un principio y por tomarte el tiempo de leerme la tesis), a Caro (gracias por los consejos laborales/personales desde el primer día hasta el último, por los millones de mates compartidos y por los "afterlab" que tanto te gusta organizar) y a Mica (gracias por todas las charlas compartidas en estos últimos meses, por el apoyo/incentivo en "la cocina" mientras intentaba escribir la tesis y por los lindos recuerdos en tan poco tiempo). También agradecer a Vicky, Anto, Sole y Agus por contribuir a que las horas en el labo sean más divertidas, por las risas y los momentos compartidos. No me olvidé de la doc y de Clau sino que a ellas ya les agradecí más arriba.

...a la gente que formó y forma parte del 116 (Gladys, Julia, Renée, Romi, Nadina), 202-203 (Fredy, Sergio, Esteban), 205 (Cristina, Sole, Jime, Cin, Paula, Noel) por los consejos, las comidas, los festejos y sin dudarlo ¡por sufrir junto a mí dos mundiales!

...a esas bellas personas y amigas que me dejó el doctorado Flora, Romi, Vane, Meli, Nati, Lauri, CaroBe, Lina (perdón si me olvido de alguna). Gracias por las mañanas y tardes de cursos, por las charlas académicas y extraacadémicas, por los consejos científicos y personales, por las meriendas y cenas de catarsis, por estar presentes en todo momento durante este período.

...a “los olímpicos” por los divertidos eventos para recaudar fondos, por los entrenamientos y los viajes a los juegos, pero por sobre todo por las juntadas en Córdoba que no involucraban nada de deporte y por todas esas charlas compartidas que te abren cada vez un poco más la cabeza y te cambian la forma de ver y sentir el mundo. Especialmente a “las olímpicas” por las tardes/noches de charlas y cervezas que te renuevan y te hacen olvidar por un rato todos los problemas.

...a “las fanáticas de Lisa de la embajada francesa” por compartir tantas cosas lindas en tan bella ciudad como lo es París. A Jime por sus innumerables consejos y por la buena onda de siempre. A Mara por la confianza y la amistad construida en tan sólo 30 minutos. A Rachi que, aunque apareció tarde a todas las juntadas, siempre llegó con una historia para contar y hacernos reír. Gracias también por los días de picnics y mates en el Montsouris o en el Parc de la Cité y por tantos días de compras en decathlon o en “el primark de creteil” (me parece que nos la pasamos comiendo y comprando). Gracias por hacerme sentir que la “*Maison de l'Argentine*” era nuestro pedacito de Argentina en el viejo continente.

...a los amigos que te da la vida. Especialmente a Iris (gracias amiga por mantenerte cerca siempre a pesar de la distancia y por ser de esas personas que, aunque no entiende mucho de lo que hago, cada vez que hablamos me pregunta “¿cómo va la tesis?”) y a Ro (gracias por enseñarme durante mis prácticas de grado en el hospital, por convertirte en una amiga, por interesarte siempre en mi trabajo y por confiar en mí el cuidado de Cami y Agus).

...a “los chicos de la facu” que me bancaron y me bancan en todas. Gracias a “los farma” Giu, Nati, Anin, Tefy, Ana y Quino, a “las bioq” Jan y Sami y a mi licenciado (perdón, doctor) favorito Agu (sin “s” porque te aprecio). Gracias por los más de 10 años de amistad, por los mates dulces (casi almíbar) compartidos allá por el año 2008 y los mates amargos del 2018, por los viajes, por las charlas hasta la madrugada y por acompañarme durante todo mi paso por la FCQ porque estoy segura que sin su ayuda hoy no estaría donde estoy.

...a “los Roselli” y a “los Bianco” por estar presentes todos estos años y siempre preocuparse por cómo estaba o si necesitaba algo. Especialmente agradecer a Patricia por ser incondicional conmigo sin pedir nada a cambio.

...a mis abuelos, tíos y primos por contribuir, de mil maneras diferentes, en la formación de mi personalidad que fue el pilar para ser quien soy hoy. Gracias a los que están y a los que

nos dejaron más rápido de lo que imaginábamos y deseábamos, nunca nos vamos a cansar de extrañarlos.

...a mis padres y hermanas por estar siempre cerca a pesar de los kilómetros físicos que nos separan. Puntualmente a mis padres por darme la libertad de decidir qué estudiar, dónde hacerlo y por apoyar continuamente mis decisiones. A mi madre quien me llamaba todas las mañanas en 2008 para que llegue a horario a los teóricos, prácticos o seminarios. A mi padre quien me demostró con el ejemplo que nunca hay que quedarse con una idea o una opinión sin escuchar la otra versión de los hechos. A mis hermanas Mori y Anto, gracias por ser incondicionales en todos los aspectos de mi vida. Gracias Mo por escuchar mi charla de admisión sin entender ni una palabra de lo que decía, por leer los primeros capítulos de esta tesis para ver si tenía lógica alguna y gracias sin lugar a dudas por aguantarme en los años de convivencia en Córdoba. Gracias Anto por ser tan parecida y tan distinta a mí, mejorándome de mil maneras positivas.

...a Emi. Gracias Emi por ser la persona que me escucha, me aconseja y hasta me reta cuando no entro en razón. Gracias por siempre confiar en mí, en mis capacidades y en mi potencial. Gracias por ayudarme a abrir los ojos cuando lo necesito, por ser mi sostén emocional a lo largo de estos años y por unirte en todas y cada una de mis ideas locas. Muchas gracias por ofrecerte a entregarme tu vida, pero prefiero que la sigas compartiendo cada día conmigo. Yo también te amodoro (palabra compuesta, léase: te amo y adoro). ¡Gracias por todo!

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	7
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	13
CONSIDERACIONES GENERALES	15
SÓLIDOS FARMACÉUTICOS	16
SÓLIDOS UNI Y MULTICOMPONENTES	16
PROBLEMAS EVIDENCIADOS POR LOS FÁRMACOS EN ESTADO SÓLIDO	17
SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA	18
SULFONAMIDAS	19
SULFAMETOXAZOL	19
PROPIEDADES FÍSICAS	20
FARMACODINAMIA	20
FARMACOCINÉTICA	20
ESTABILIDAD	21
FUROSEMIDA	21
PROPIEDADES FÍSICAS	21
FARMACODINAMIA	21
FARMACOCINÉTICA	22
ESTABILIDAD	22
ESTRATEGIAS Y LIGANDOS UTILIZADOS EN EL SECTOR FARMACÉUTICO	23
ESTRATEGIAS UTILIZADAS PARA MEJORAR LAS PROPIEDADES BIOFARMACÉUTICAS	23
LIGANDOS	24
OLIGOSACÁRIDOS	24
CICLODEXTRINA	24
PROPIEDADES	26
FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN	26
APLICACIONES EN EL ÁREA FARMACÉUTICA	27
MALTODEXTRINA	28
PROPIEDADES	29
FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN	29
APLICACIONES EN EL ÁREA FARMACÉUTICA	30

AMINOACIDOS	30
CLASIFICACIÓN	30
PROPIEDADES	31
APLICACIÓN EN EL ÁREA FARMACÉUTICA	32
ETANOLAMINAS	33
PROPIEDADES	33
APLICACIÓN EN EL ÁREA FARMACÉUTICA	33
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	34
<u>CAPÍTULO 2: ESTUDIOS EN SOLUCIÓN</u>	37
CONSIDERACIONES GENERALES	39
ANÁLISIS DE SOLUBILIDAD DE FASES	39
TIPOS DE ISOTERMAS DE SOLUBILIDAD	40
ESTIMACIÓN DE LA CONSTANTE DE FORMACIÓN DEL SISTEMA	42
MATERIALES Y MÉTODOS	43
MATERIALES	43
INSTRUMENTAL	43
DESARROLLO EXPERIMENTAL	44
ANÁLISIS DE SOLUBILIDAD	44
EFECTO DEL MEDIO	44
EFECTO DE DIFERENTES AMINOÁCIDOS	45
EFECTO DE LOS SISTEMAS BINARIOS	45
EFECTO DE LOS SISTEMAS TERNARIOS	45
CLASIFICACION DE LOS SISTEMAS DE ACUERDO AL SCB	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
ANÁLISIS DE SOLUBILIDAD DE SULFAMETOXAZOL	46
EFECTO DEL MEDIO	46
EFECTO DE LOS AMINOÁCIDOS	47
EFECTO DE LOS SISTEMAS BINARIOS	49
CLASIFICACION DE LOS SISTEMAS DE SMZ DE ACUERDO AL SCB	52
ANÁLISIS DE SOLUBILIDAD DE FUROSEMIDA	53
EFECTO DEL MEDIO	53
EFECTO DE LOS AMINOÁCIDOS	54
EFECTO DE LOS SISTEMAS BINARIOS	55
LIGANDOS BÁSICOS: ARG y TEA	55
OLIGOSACÁRIDOS: β -CD y MD	58
EFECTO DE LOS SISTEMAS TERNARIOS	60

CON CONCENTRACIÓN FIJA DE OLIGOSACÁRIDOS	60
CON CONCENTRACIÓN FIJA DE LIGANDOS BÁSICOS	64
CLASIFICACION DE LOS SISTEMAS DE FUR DE ACUERDO AL SCB	68
CONCLUSIONES PARCIALES	69
SULFAMETOXAZOL	69
FUROSEMIDA	69

CAPÍTULO 3: ESTUDIOS EN ESTADO SÓLIDO **71**

CONSIDERACIONES GENERALES	73
PREPARACIÓN DE SISTEMAS EN ESTADO SÓLIDO	74
MOLIENDA ASISTIDA POR SOLVENTE	74
LIOFILIZACIÓN	74
EVAPORACIÓN LENTA	74
MEZCLA FÍSICA	75
CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS EN ESTADO SÓLIDO	75
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	75
ESPECTROSCOPIA RAMAN	75
RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO	76
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	76
ANÁLISIS TÉRMICO	77
CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO	77
TERMOGRAVIMETRÍA	78
DIFRACTOMETRÍA DE RAYOS X DE POLVOS	78
MATERIALES Y MÉTODOS	79
MATERIALES	79
INSTRUMENTAL Y DESARROLLO EXPERIMENTAL	79
OBTENCIÓN DE POLIMORFOS	79
PREPARACIÓN DE SISTEMAS EN ESTADO SÓLIDO	79
MOLIENDA ASISTIDA POR SOLVENTE	79
LIOFILIZADO	80
EVAPORACIÓN LENTA	80
MEZCLA FÍSICA	80
CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS EN ESTADO SÓLIDO	80
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	80
ESPECTROSCOPIA RAMAN	81
RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO	81
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	81

ANÁLISIS TÉRMICO	81
DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO	82
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
SULFAMETOXAZOL	83
SELECCIÓN DEL MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS SÓLIDOS	83
CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS SÓLIDOS	83
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	83
RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO	86
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	88
ANÁLISIS TÉRMICO	89
DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO	91
FUROSEMIDA	92
OBTENCIÓN DE FURII Y CARACTERIZACIÓN DE LOS POLIMORFOS	92
SELECCIÓN DEL MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS SÓLIDOS	97
CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS SÓLIDOS	97
SISTEMAS BINARIOS CON OLIGOSACÁRIDOS	98
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	98
ESPECTROSCOPIA RAMAN	99
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	100
ANÁLISIS TÉRMICO	102
DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO	104
SISTEMA BINARIO CON TRIETANOLAMINA	105
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	105
ESPECTROSCOPIA RAMAN	106
RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO	107
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	108
ANÁLISIS TÉRMICO	109
DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO	109
SISTEMAS TERNARIOS CON TRIETANOLAMINA Y OLIGOSACÁRIDOS	110
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	111
ESPECTROSCOPIA RAMAN	112
RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO	113
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	115

ANÁLISIS TÉRMICO	116
DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO	117
SISTEMA BINARIO CON ARGININA	119
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	119
ESPECTROSCOPIA RAMAN	120
RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO	120
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	121
ANÁLISIS TÉRMICO	122
DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO	123
SISTEMAS TERNARIOS CON ARGININA Y OLIGOSACÁRIDOS	124
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	124
ESPECTROSCOPIA RAMAN	126
RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO	127
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	128
ANÁLISIS TÉRMICO	129
DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO	130
CONCLUSIONES PARCIALES	132
SULFAMETOXAZOL	132
FUROSEMIDA	132
<u>CAPÍTULO 4: ENSAYOS DE DISOLUCIÓN Y PERMEABILIDAD</u>	135
CONSIDERACIONES GENERALES	137
ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN	137
EQUIPOS DE DISOLUCIÓN	138
MEDIO DE DISOLUCIÓN	138
MÉTODO	138
COMPARACIONES DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN	139
ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD	140
DIFUSIÓN A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS	140
PREDICCIÓN DE LA PERMEABILIDAD	141
MÉTODOS	142
MATERIALES Y MÉTODOS	143
MATERIALES	143
INSTRUMENTAL Y DESARROLLO Y EXPERIMENTAL	143
PREPARACIÓN DE SISTEMAS EN ESTADO SÓLIDO	143

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE IFA	144
ENSAYOS DE DISOLUCIÓN	144
ENSAYOS DE PERMEABILIDAD	145
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	146
DISOLUCIÓN	146
SULFAMETOXAZOL	146
SISTEMAS BINARIOS CON HISTIDINA	146
SISTEMAS BINARIOS CON ARGININA	148
FUROSEMIDA	149
SISTEMAS BINARIOS CON OLIGOSACÁRIDOS	149
SISTEMAS BINARIOS Y TERNARIOS CON TRIETANOLAMINA	150
SISTEMAS BINARIOS Y TERNARIOS CON ARGININA	152
PERMEABILIDAD	154
CONCLUSIONES PARCIALES	156
SULFAMETOXAZOL	156
FUROSEMIDA	157
<u>CAPÍTULO 5: ESTUDIOS DE ESTABILIDAD</u>	<u>159</u>
CONSIDERACIONES GENERALES	161
FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE UN IFA	161
ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE UN IFA	162
TIPOS DE ESTUDIOS DE ESTABILIDAD	162
ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN FORZADA	162
ESTUDIOS DE ESTABILIDAD ACELERADOS	162
ESTUDIOS DE LARGA DURACIÓN O EN TIEMPO REAL	162
ESTABILIDAD QUÍMICA	163
PROCEDIMIENTO ANALÍTICO	163
DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO	163
VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO	163
MODELO CINÉTICO	164
ESTABILIDAD FÍSICA	166
MATERIALES Y MÉTODOS	167
MATERIALES	167
INSTRUMENTAL Y DESARROLLO EXPERIMENTAL	167
PREPARACIÓN DE SISTEMAS EN ESTADO SÓLIDO	167
DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE IFA	167
ESTUDIO DE ESTABILIDAD	168

ESTUDIO DE HIGROSCOPICIDAD	168
ESTUDIO DE ESTABILIDAD QUÍMICA	168
SELECCIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO	168
VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO	169
RECUPERACIÓN DE FUROSEMIDA EN LAS MUESTRAS SÓLIDAS	173
ESTUDIO DE ESTABILIDAD FÍSICA	173
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	173
ESTUDIO DE ESTABILIDAD	173
ESTUDIO DE HIGROSCOPICIDAD	173
ESTUDIO DE ESTABILIDAD QUÍMICA	176
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE FUR Y DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE REACCIÓN	176
ESTUDIO DE ESTABILIDAD FÍSICA	179
CONCLUSIONES PARCIALES	182
<u>CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES</u>	183
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	189
<u>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA</u>	203
TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL	205
EN REVISTAS CIENTÍFICAS INTERNACIONALES	205
EN REVISTAS CIENTÍFICAS NACIONALES	205
TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN PRESENTADOS EN CONGRESOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL	205
EN REUNIONES CIENTÍFICAS INTERNACIONALES	205
EN REUNIONES CIENTÍFICAS NACIONALES	206

RESUMEN

RESUMEN

El objetivo general de la presente tesis doctoral se enfocó en el desarrollo de estrategias que permitieran optimizar propiedades biofarmacéuticas desfavorables (solubilidad, disolución, permeabilidad, estabilidad) de ingredientes farmacéuticos activos (IFAs) ampliamente utilizados en terapia humana, como sulfametoxazol y furosemida. Para cumplir con este propósito, se utilizaron en el estudio diferentes aminoácidos y etanolaminas, así como también oligosacáridos derivados de glucosa, como β -ciclodextrina (β -CD) y maltodextrina (MD).

Teniendo en cuenta que sulfametoxazol (SMZ) es un antimicrobiano que presenta problemas de solubilidad en medio acuoso y consecuentemente baja disolución en los fluidos gastrointestinales, y que furosemida (FUR) es un diurético que exhibe baja solubilidad en medio acuoso, baja permeabilidad intestinal e inestabilidad fotoquímica, se diseñaron y desarrollaron estudios en solución y en estado sólido. En solución se estudió el efecto de varios ligandos, a distintas concentraciones, sobre la solubilidad de los IFAs en diferentes medios acuosos. A partir de la obtención de sistemas solubles con arginina (un aminoácido básico) se logró incrementar la solubilidad en agua 10 veces para SMZ y 112 veces para FUR.

Con el fin de determinar la formación en estado sólido de los sistemas obtenidos en solución, se prepararon por diferentes métodos (como molienda asistida por solvente, liofilización, evaporación lenta y mezcla física) muestras binarias y ternarias. Los componentes puros y los sólidos obtenidos se caracterizaron utilizando diversas técnicas como espectroscopia infrarroja y Raman, resonancia magnética nuclear de estado sólido, microscopía electrónica de barrido, análisis térmico (calorimetría diferencial de barrido y termogravimetría) y difracción de rayos X de polvo con el objeto de confirmar la obtención de un nuevo sistema supramolecular a partir de la combinación de SMZ o FUR con los ligandos. Luego de una exhaustiva caracterización se confirmó la formación de sales farmacéuticas binarias de SMZ con dos ligandos: histidina y arginina. En el caso de FUR se evidenció la formación de sales farmacéuticas binarias con trietanolamina o arginina y de sistemas ternarios combinando FUR con trietanolamina o arginina y con un oligosacárido (β -CD o MD).

Adicionalmente se evaluaron propiedades como disolución, permeabilidad y estabilidad (dependiendo de los problemas evidenciados por cada IFA en particular) con el propósito de analizar si la formación de los sistemas supramoleculares sólidos produce un efecto positivo sobre las propiedades biofarmacéuticas de los fármacos. En el caso de SMZ se observó que las sales farmacéuticas obtenidas con los aminoácidos logran duplicar la cantidad de IFA disuelto en fluido gástrico simulado. Los sistemas de FUR no evidenciaron cambios en la

permeabilidad por difusión pasiva respecto a la permeabilidad del IFA libre, sin embargo, la disolución y la fotoestabilidad de FUR se ven favorecidas en varios sistemas tanto binarios como ternarios, siendo el mejor para ambas propiedades la sal farmacéutica de estequiometría 1:2 con arginina la cual incrementó aproximadamente 6 veces la cantidad de FUR disuelta y se mantuvo estable el triple de tiempo que el fármaco libre.

SUMMARY

The main objective of this doctoral thesis focused in the development of strategies that could allow the optimization of unfavorable biopharmaceutical properties (solubility, dissolution, permeability, stability) of active pharmaceutical ingredients (APIs) widely used in human therapy such as sulfamethoxazole and furosemide. In order to achieve this goal, we used different amino-acids and ethanolamines, as well as oligosaccharides derived from glucose, as β -cyclodextrin (β -CD) and maltodextrin (MD).

Taking into account that sulfamethoxazole (SMZ) is an antimicrobial that presents problems of solubility and consequently low dissolution in the gastrointestinal fluids, and furosemide (FUR) is a diuretic which exhibits low solubility, low intestinal permeability and photochemical instability, studies in solution and in solid state were designed and developed. In solution we studied the effect of several ligands, at various concentrations, on the solubility of the APIs in different aqueous media. After the attainment of soluble systems with arginine (a basic amino-acid) we achieved an increase in the solubility in water of 10-fold for SMZ and 112-fold for FUR.

In order to determine in the solid state, the formation of the systems obtained in solution, binary and ternary samples were prepared by different methods (such as kneading with solvent, lyophilization, slow evaporation and physical mixing). The free components and the solids obtained were characterized using various techniques such as Fourier transform infrared and Raman spectroscopy, solid state Nuclear Magnetic Resonance, scanning electron microscopy, thermal analysis (differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis) and x-ray diffraction of dust in order to confirm the formation of a new supramolecular system from the combination of SMZ or FUR with ligands. After a thorough characterization the formation of binary pharmaceutical salts of SMZ with two ligands was confirmed: histidine and arginine. FUR showed the formation of binary pharmaceutical salts with triethanolamine and arginine, and ternary systems combining FUR with triethanolamine or arginine and an oligosaccharide (β -CD or MD).

In addition, properties such as dissolution, permeability and stability were evaluated (depending upon the problems evidenced by each API in particular) with the purpose of analyzing whether the formation of solid supramolecular systems produces a positive effect on the biopharmaceutical properties of these drugs. In the case of SMZ it was observed that the pharmaceutical salts obtained with amino-acids are able to double the quantity of API dissolved in simulated gastric fluid. The FUR systems showed no changes in the permeability by passive diffusion compared to the permeability of the free API, however, the dissolution and

the photo-stability of FUR are favored in multiple systems both binary and ternary, being the best for both properties the pharmaceutical salt of stoichiometry 1:2 with arginine which increased 6-fold the amount of FUR dissolved and remained stable triple the time that the free drug.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A: Arginina

AA: Aminoácidos

ARG: Arginina

AS: Análisis de solubilidad

ASP: Ácido aspártico

C: β -ciclodextrina

CD: Ciclodextrina

CV%: Coeficiente de variación porcentual

CV: Coeficiente de variación

DEA: Dietanolamina

DRXP: Difracción de Rayos X de Polvo

DSC: Calorimetría diferencial de barrido, de sus siglas en inglés "*Differential Scanning Calorimetry*"

ED: Equivalentes de dextrosa

EL: Evaporación lenta

ETA: Etanolaminas

F: Furosemida

f_1 : Factor de diferencia

f_2 : Factor de similitud

FA²_{MAS}: Sistema sólido (de estequiometría 1:2) formado entre furosemida y arginina a partir de la técnica de molienda asistida por solvente

FA²_{MF}: Sistema sólido (de estequiometría 1:2) formado entre furosemida y arginina a partir de la técnica de mezcla física

FAC_{MAS}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1:1) formado entre furosemida, arginina y β -ciclodextrina a partir de la técnica de molienda asistida por solvente

FAC_{MF}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1:1) formado entre furosemida, arginina y β -ciclodextrina a partir de la técnica de mezcla física

FA_{MAS}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1) formado entre furosemida y arginina a partir de la técnica de molienda asistida por solvente

FA_{MF}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1) formado entre furosemida y arginina a partir de la técnica de mezcla física

FAM_{MAS}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1:1) formado entre furosemida, arginina y maltodextrina a partir de la técnica de molienda asistida por solvente

FAM_{MF}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1:1) formado entre furosemida, arginina y maltodextrina a partir de la técnica de mezcla física

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos (de sus siglas en inglés "*Food and Drug Administration*")

FGS: Fluido gástrico simulado

FIS: Fluido intestinal simulado

FT: Sistema sólido (de estequiometría 1:1) formado entre furosemida y trietanolamina a partir de la técnica de molienda asistida por solvente

FT^A_{EL}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1) formado entre furosemida y trietanolamina a partir de la técnica de evaporación lenta con acetona

FTC: Sistema sólido (de estequiometría 1:1) formado entre furosemida, trietanolamina y β -ciclodextrina a partir de la técnica de mezcla física

FTC_{MAS}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1) formado entre furosemida, trietanolamina y β -ciclodextrina a partir de la técnica de molienda asistida por solvente

FTC_{MF}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1) formado entre furosemida, trietanolamina y β -ciclodextrina a partir de la técnica de mezcla física

FT-IR: Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier

FTM: Sistema sólido (de estequiometría 1:1) formado entre furosemida, trietanolamina y maltodextrina a partir de la técnica de mezcla física

FT_{MAS}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1) formado entre furosemida y trietanolamina a partir de la técnica de molienda asistida por solvente

FT^M_{EL}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1) formado entre furosemida y trietanolamina a partir de la técnica de evaporación lenta con metanol

FT_{MF}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1) formado entre furosemida y trietanolamina a partir de la técnica de mezcla física

FTM_{MAS}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1) formado entre furosemida, trietanolamina y maltodextrina a partir de la técnica de molienda asistida por solvente

FTM_{MF}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1) formado entre furosemida, trietanolamina y maltodextrina a partir de la técnica de mezcla física

FUR: Furosemida

FURII: Polimorfo II de furosemida

GLI: Glicina

GLU: Ácido glutámico

H: Histidina

HIS: Histidina

HR: Humedad relativa

IFA: Ingrediente Farmacéutico Activo

ILE: Isoleucina

k: Constante de velocidad de degradación

K_C: Constante de formación, estabilidad o asociación de sistemas binarios

K_{CT}: Constante de formación, estabilidad o asociación de sistemas ternarios

L: Ligando

LEU: Leucina

LF: Liofilizado; liofilización

M: Maltodextrina

MAS: Molienda asistida por solvente

MD: Maltodextrina

MEA: Monoetanolamina

MF: Mezcla física

P: Producto de degradación

PAMPA: Ensayo de permeabilidad de membranas artificiales paralelas, de sus siglas en inglés *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*

PBS: Solución de buffer fosfato

PM: Peso molecular

PRO: Prolina

RMNss: Resonancia magnética nuclear de estado sólido

S: Sulfametoxazol

S₀: Solubilidad intrínseca

S_{0L}: Solubilidad en presencia de un ligando a concentración fija

SA_{LF}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1) formado entre sulfametoxazol y arginina a partir de la técnica de liofilización

SA_{MF}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1) formado entre sulfametoxazol y arginina a partir de la técnica de mezcla física

SCB: Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

SEM: Microscopia electrónica de barrido, de sus siglas en inglés "*Scanning Electron Microscopy*"

SER: Serina

SH_{LF}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1) formado entre sulfametoxazol e histidina a partir de la técnica de liofilización

SH_{MAS}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1) formado entre sulfametoxazol e histidina a partir de la técnica de molienda asistida por solvente

SH_{MF}: Sistema sólido (de estequiometría 1:1) formado entre sulfametoxazol e histidina a partir de la técnica de mezcla física

S_{máx}: Solubilidad máxima

SMZ: Sulfametoxazol

T: Trietanolamina

t_0 : Tiempo inicial

t_{1-6} : 1 – 6 meses, según corresponda

t_{50} : tiempo de vida media

t_{90} : tiempo de vida útil

TEA: Trietanolamina

TG: Termogravimetría

USP: Farmacopea estadounidense

VAL: Valina

β -CD: β -ciclodextrina

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

CONSIDERACIONES GENERALES

El principal objetivo del sector farmacéutico es mejorar la calidad de vida de las personas por lo que es requisito fundamental asegurar que los pacientes reciban medicamentos que sean eficaces, seguros y de calidad. La Farmacopea Argentinaⁱ define a un **medicamento** como una preparación empleada para prevenir, diagnosticar o tratar una enfermedad donde la sustancia que ejerce la acción es denominada **Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA)**; también conocida como fármaco o principio activo. Un IFA es toda sustancia química (o mezcla de sustancias) que se emplea en medicina humana debido a que posee un efecto farmacológico específico. No obstante, los medicamentos además de estar compuestos por ingredientes farmacéuticos activos (IFAs) contienen otras sustancias denominadas **excipientes**; éstos carecen de actividad farmacológica a las concentraciones empleadas, pero son sumamente importantes ya que son los encargados de dar forma o consistencia adecuada a la preparación y además se utilizan para brindar características que aseguren estabilidad, aceptabilidad y facilidad de administración de los medicamentos. Un medicamento está compuesto por uno o varios IFAs y excipientes formulados bajo una determinada **forma farmacéutica**ⁱⁱ con el objetivo de conferir al producto final características adecuadas para su correcta conservación, dosificación, administración y acción farmacológica.¹

Para administrar un medicamento al paciente existen diversas vías: intravenosa, intramuscular, subcutánea, oral, ocular, dérmica, entre otras. En la actualidad, la vía de elección por parte de los pacientes es la vía oral, a través de la cual se administra la mayor parte de los medicamentos ya que presenta numerosas ventajas, como por ejemplo fácil administración por parte del propio paciente o versatilidad en la cantidad de formas farmacéuticas que se pueden administrar.² Además, brinda la posibilidad de generar un efecto tanto local como sistémico dependiendo del requerimiento del tratamiento el cual puede ser inmediato o tardío (medicamentos de liberación prolongada).³ Dentro de las formas farmacéuticas que pueden administrarse por vía oral encontramos las líquidas (soluciones,

ⁱ La Farmacopea es el texto oficial que codifica los ingredientes farmacéuticos activos, excipientes y productos farmacéuticos y contiene las especificaciones que éstos deben cumplir para demostrar su calidad y resguardar la salud de la población.

ⁱⁱ La forma farmacéutica se encuentra definida según Farmacopea Argentina como el producto proveniente de la transformación de un principio activo o de una asociación de los mismos mediante procedimientos farmacotécnicos, a fin de conferirles características físicas y morfológicas particulares para su adecuada dosificación y conservación, y que faciliten su administración y acción farmacológica.

jarabes, emulsiones, suspensiones, etc.) y sólidas (polvos, cápsulas, comprimidos, etc.). Entre ellas, las formas sólidas presentan la ventaja de tener, generalmente, mayor estabilidad.

SÓLIDOS FARMACÉUTICOS

SÓLIDOS UNI Y MULTICOMPONENTES

Los sólidos farmacéuticos pueden encontrarse en estado amorfo o cristalino y estar formados por uno (unicomponente) o más componentes (multicomponentes) (Figura 1.1). Las partículas que conforman a los sólidos amorfos carecen de estructura ordenada por lo que tienen elevada movilidad molecular. Este comportamiento se traduce en un buen perfil de disolución y por lo tanto en una alta biodisponibilidadⁱⁱⁱ oral. Desafortunadamente, los sólidos amorfos presentan la desventaja de poseer baja estabilidad química y física, alta higroscopicidad y tendencia a cristalizar. Por el contrario, en los sólidos cristalinos las moléculas se ordenan de manera regular formando redes cristalinas, por lo que estos adquieren una estructura bien definida con menor movilidad molecular que los sólidos amorfos y presentan la ventaja de ser física y químicamente más estables.

Una particularidad de la mayoría de los sólidos cristalinos es su capacidad de existir en más de una forma polimórfica; entendiéndose por **polimorfismo** a la habilidad que posee una sustancia de existir en varias formas cristalinas con diferente disposición espacial de las moléculas que conforman el cristal. Cada una de estas formas cristalinas tiene una estructura única y es un material con propiedades fisicoquímicas y mecánicas propias en estado sólido, tales como solubilidad, disolución, punto de fusión, estabilidad, higroscopicidad, densidad, fluidez, compactabilidad, entre otras.^{4,5}

Los sólidos multicomponentes pueden estar formados por diferentes tipos de uniones dando como resultado: sales, solvatos y cocrisales/coamorfos. Las **sales** son sistemas formados por dos componentes que se encuentran ionizados, por lo que sus interacciones se encuentran asistidas por cargas. Los **solvatos o hidratos** se forman cuando una molécula presenta en su estructura moléculas de solvente; cuando es agua hablamos de hidratos y cuando tenemos un solvente distinto del agua los llamamos solvatos. Finalmente, un **cocrystal** se define como un cristal multicomponente en el cual todos sus componentes son sólidos en condiciones ambientales cuando están en su forma pura. Dichos componentes coexisten en una proporción estequiométrica entre el IFA y el coformador.⁶⁻⁸ Cuando el sistema obtenido entre el fármaco y el coformador presenta características de un sólido amorfo es denominado **coamorfo**. Las sales, los solvatos, los hidratos y los cocrisales pueden encontrarse tanto en

ⁱⁱⁱ La biodisponibilidad es un parámetro farmacocinético definido como la velocidad y cantidad con la cual un IFA es absorbido desde la forma farmacéutica y se encuentra disponible inalterado en la circulación general.

estado amorfo como cristalino, por lo que, pueden existir diferentes polimorfos de los sistemas multicomponentes.

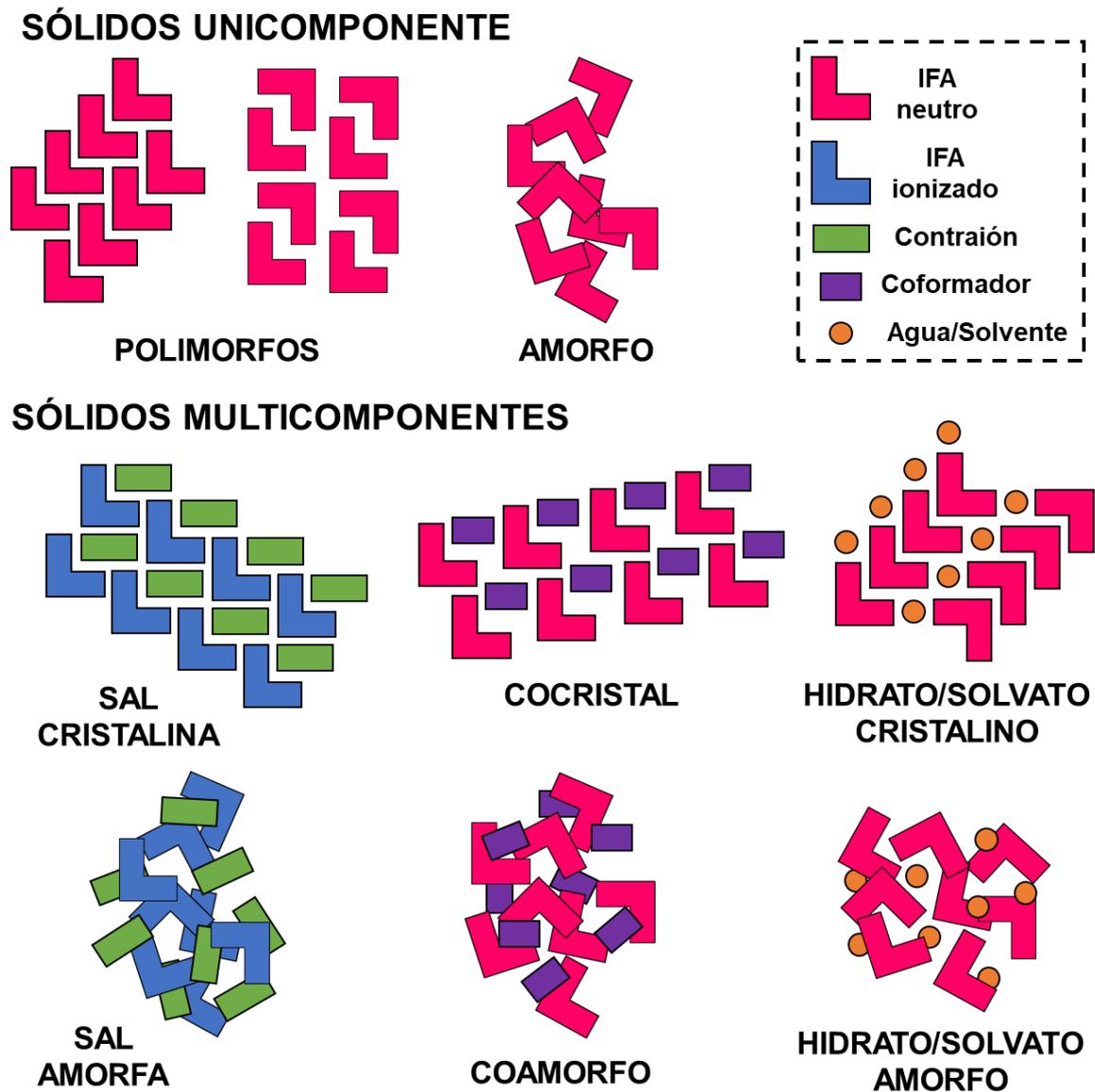


Figura 1.1. Estados en los que se puede encontrar un sólido.

PROBLEMAS EVIDENCIADOS POR LOS FÁRMACOS EN ESTADO SÓLIDO

El principal desafío de la industria farmacéutica a la hora de diseñar formas sólidas de dosificación oral es optimizar su **biodisponibilidad**. Éste es un parámetro sumamente importante que depende de varios factores como el metabolismo de primer paso,^{9,10} el metabolismo pre-sistémico, la susceptibilidad de los IFAs a los mecanismos de eflujo, la solubilidad y permeabilidad.¹¹ Entre ellas, la causa más frecuente de baja biodisponibilidad oral de un medicamento se atribuye a la **baja solubilidad** acuosa del IFA, lo que genera

escasa disolución en los fluidos gastrointestinales acuosos y, por consiguiente, **baja permeabilidad**.

Otro parámetro importante a tener en cuenta a la hora de estudiar un IFA sólido es su **estabilidad**, ya que la misma puede afectar la seguridad y eficacia del medicamento. Por ejemplo, la formación de impurezas de degradación podría causar pérdida o potenciación del efecto terapéutico e iniciar posibles efectos adversos. Por lo tanto, el estudio de la estabilidad química y física de los IFAs es esencial para garantizar la calidad, eficacia y seguridad de un medicamento.

SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA

Teniendo en cuenta los problemas de solubilidad, disolución y permeabilidad que pueden presentar los sólidos farmacéuticos, Amidon y colaboradores idearon un marco científico para clasificar a los IFAs en función de su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal: el **Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB)**.¹²⁻¹⁴ La creación del SCB fue un gran avance en el área farmacéutica, ya que permitió reemplazar los estudios de bioequivalencia *in vivo* suplantándolos por pruebas *in vitro*. Es por esto que el SCB ha obtenido reconocimiento internacional en la industria, las instituciones académicas y las autoridades públicas. Una de las limitaciones de este sistema es que sólo puede ser utilizado para clasificar a los IFAs que van a ser administrados a pacientes por vía oral en forma de medicamento de liberación inmediata con acción sistémica.

Dado que la solubilidad, la disolución y la permeabilidad gastrointestinal de un IFA son las características fundamentales que rigen su velocidad y cantidad de absorción oral, el SCB se basa exclusivamente en estos parámetros y clasifica a los IFAs en cuatro categorías:

- **Clase I:** Alta solubilidad - Alta permeabilidad
- **Clase II:** Baja solubilidad - Alta permeabilidad
- **Clase III:** Alta solubilidad - Baja permeabilidad
- **Clase IV:** Baja solubilidad - Baja permeabilidad

Una sustancia es considerada **altamente soluble** cuando la máxima dosis terapéutica es soluble en un volumen igual o menor a 250 mL^{iv} de agua en un intervalo de pH de 1 a 7,5; **altamente permeable** cuando se determina que el grado de absorción en seres humanos es mayor al 90% de la dosis administrada, basándose en el balance de masa o en comparación con una dosis de referencia intravenosa, y **de rápida disolución** cuando más del 85% del IFA

^{iv} El SCB fija como criterio 250 mL para la relación dosis:solubilidad debido a que, en los estudios de bioequivalencia farmacocinética, la formulación del IFA debe ser administrada con un vaso de agua.

se disuelve en 30 min utilizando el aparato USP I o II, en un volumen igual o menor a 900 mL de soluciones buffer o reguladoras de pH.¹⁵

Gran parte de los medicamentos que se utilizan en la actualidad contienen IFAs de clase II o IV, por lo que a menudo se requieren altas dosis con el fin de alcanzar concentraciones plasmáticas terapéuticas, lo que puede generar una gran cantidad de efectos adversos y tóxicos en los pacientes. A partir de esto se puede decir que la solubilidad es el parámetro limitante para lograr una concentración deseada en la circulación sistémica y de esta manera, una respuesta farmacológica eficiente para los medicamentos administrados por vía oral.

SULFONAMIDAS

La industria farmacéutica se enfoca en la optimización de la eficacia terapéutica de IFAs ya conocidos, debido a que desarrollar un nuevo principio activo implica costos muy elevados y conlleva más de 10 años de investigación y desarrollo. Teniendo esto en cuenta, en este trabajo se seleccionaron IFAs pertenecientes a la familia de las sulfonamidas a partir de la valoración de sus propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas, el valor terapéutico y las alternativas disponibles para la determinación de dichos fármacos.

Las sulfonamidas fueron los primeros agentes quimioterapéuticos eficaces que se utilizaron por vía sistémica para evitar y curar infecciones bacterianas en seres humanos.¹⁶ Además, se descubrieron otros usos para IFAs de esta familia. Está reportado, por ejemplo, que algunas sulfonamidas son eficaces en el tratamiento de ciertos tipos de alergias e incluso para aliviar la tos; otras tienen propiedades como diuréticos y como antiinflamatorios intestinales.¹⁷

En este trabajo, con el objetivo de evaluar y optimizar su eficacia terapéutica, se seleccionaron dos sulfonamidas: una de clase II y otra de clase IV según el SCB.

SULFAMETOXAZOL

Sulfametoxazol (SMZ) es un antibiótico perteneciente a la clase II del SCB debido a que posee una muy baja solubilidad en medio acuoso. Su estructura química se presenta en la Figura 1.2. Este IFA se utiliza clínicamente en combinación con trimetoprima para el tratamiento de infecciones bacterianas, incluyendo infecciones del tracto gastrointestinal, de las vías respiratorias y, principalmente, en infecciones de las vías urinarias.¹⁸ La dosis utilizada por vía oral varía, dependiendo del tipo de infección, entre 100, 400 u 800 mg de SMZ combinado con 20, 40 u 80 mg de trimetoprima por comprimido.^{19,20}

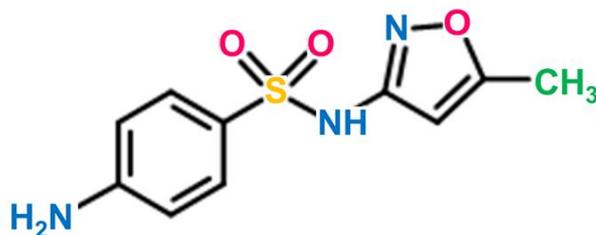


Figura 1.2. Estructura de SMZ.

PROPIEDADES FÍSICAS

Este antibiótico se presenta como un polvo cristalino blanco que funde a 167 °C. Es prácticamente insoluble en agua (0,459 mg en 1 mL), éter y cloroformo; relativamente soluble en alcohol (1 g en 50 mL) y acetona (1 g en 4 mL), y se disuelve con facilidad en solución acuosa de HCl o NaOH, debido a la formación de una sal en dichas soluciones. Su peso molecular es de 253,28 g/mol. Los valores de pK_a son: pK_{a1}= 1,97 y pK_{a2}= 5,7, para el grupo básico (NH₂) y ácido (NH), respectivamente.^{19,20}

FARMACODINAMIA

SMZ es un bacteriostático por naturaleza ya que inhibe la síntesis bacteriana del ácido dihidrofólico compitiendo con el ácido para-aminobenzoico por la unión a la dihidrofolato sintetasa. La inhibición de la síntesis de ácido dihidrofólico disminuye la síntesis de nucleótidos bacterianos inhibiendo el crecimiento bacteriano.^{19,20}

FARMACOCINÉTICA

Luego de la administración de SMZ por vía oral es rápidamente absorbido. Una vez absorbido, se distribuye en la mayoría de los tejidos corporales ya que alrededor del 70% se encuentra unido a las proteínas plasmáticas. Su T_{max} (tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima en el plasma) ocurre de 1 a 4 h post-administración oral y su vida media en suero es de 10 h. SMZ es metabolizado en el hígado en 5 metabolitos (N4-acetil-SMZ, N4-hidroxi-SMZ, 5-metilhidroxi-SMZ, N4-acetil-5-metilhidroxi-SMZ y un conjugado N-glucurónido). La excreción se da principalmente por vía renal a través de filtración glomerular y secreción tubular. Aproximadamente el 20% de SMZ se encuentra en la orina inalterado, entre el 15% y el 20% como el conjugado N-glucurónido y entre un 50 y 70% como el metabolito acetilado. También puede ser excretado en leche materna.^{19,20}

ESTABILIDAD

SMZ es un compuesto que presenta dos formas polimórficas, siendo la forma I la más estable y la que se encuentra disponible comercialmente.²¹ Este fármaco es sensible a la luz y es incompatible con agentes oxidantes fuertes, sin embargo es considerado un IFA estable.²²

FUROSEMIDA

Furosemida (FUR) es un diurético del asa ampliamente utilizado en el tratamiento de hipertensión y edema asociado a falla cardíaca, renal y hepática. Sin embargo, su biodisponibilidad es variable cuando es administrado por vía oral ya que posee baja solubilidad en medio acuoso y baja permeabilidad intestinal (clase IV del SCB), además presenta tendencia a absorberse principalmente en estómago y en intestino delgado superior.^{23,24} La dosis empleada por vía oral varía entre 20, 40 u 80 mg por comprimido, siendo la de 40 mg la más utilizada. En la Figura 1.3 se puede observar su estructura química.

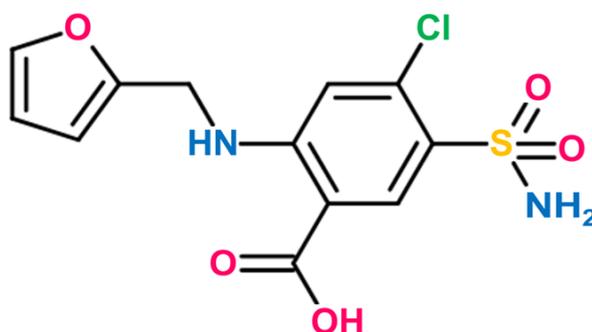


Figura 1.3. Estructura de FUR.

PROPIEDADES FÍSICAS

Este IFA se presenta como un polvo cristalino blanco o amarillento que funde a 206 °C. Es prácticamente insoluble en agua (0,496 mg en 1 mL); poco soluble en etanol; ligeramente soluble en cloroformo y éter; soluble en acetona, metanol, DMF y en soluciones acuosas por encima de pH 8,0. Su peso molecular es de 330,74 g/mol. Los valores de pK_a son: pK_{a1}= 3,8 y pK_{a2}= 7,5 para el grupo COOH y NH₂, respectivamente.^{25,26}

FARMACODINAMIA

FUR es un diurético del asa tipo sulfonamida que inhibe la reabsorción de agua en la nefrona al bloquear el cotransportador de Na-K-Cl en la rama ascendente gruesa del asa de

Henle. Al bloquear este transportador no sólo se inhibe la reabsorción de Na^+ , K^+ y Cl^- sino también la de cationes como Ca^{2+} y Mg^{2+} y, en consecuencia, el lumen se vuelve más hipertónico mientras que el intersticio se vuelve hipotónico disminuyendo el gradiente osmótico para la reabsorción de agua a lo largo de la nefrona. FUR es un diurético muy potente debido a que la rama gruesa ascendente es responsable del 25% de la reabsorción de Na^+ en la nefrona.

FUR inhibe la enzima prostaglandina deshidrogenasa provocando un incremento del flujo renal sanguíneo debido al aumento de la capacitancia venosa y a la disminución de la resistencia vascular renal. A su vez, el aumento de la capacitancia provoca disminución de la presión de llenado del ventrículo izquierdo beneficiando a los pacientes con enfermedad arterial periférica.^{25,26}

FARMACOCINÉTICA

Luego de la administración de FUR por vía oral, aproximadamente un 60% es absorbido en pacientes con función renal normal. Sin embargo, la fracción absorbida puede variar notablemente de un paciente a otro debido a la baja solubilidad y permeabilidad del IFA en los fluidos gastrointestinales. Alrededor del 95% del IFA disuelto se encuentra unido a las proteínas plasmáticas. Su T_{max} ocurre 3 h post-administración oral y su vida media varía entre 3 y 4 h. Sólo una pequeña cantidad de FUR es metabolizada hepáticamente al derivado defurfurilado ácido 4-cloro-5-sulfamoilantranílico. Aproximadamente el 80-90% de FUR se encuentra en la orina en forma inalterada.^{25,26}

ESTABILIDAD

FUR es un compuesto que presenta varias formas polimórficas, siendo la forma I la más estable y la que se encuentra disponible comercialmente. Este fármaco contiene un grupo amino secundario susceptible a hidrólisis catalizada por ácido. A altas temperaturas se hidroliza a ácido 4-cloro-5-sulfamoil-antranílico y alcohol furfurílico que se convierte rápidamente en ácido levulínico. Varios autores demostraron que FUR es susceptible a la luz ya que exhibe fotooxidación, fotohidrólisis y fotodescloración.²⁷⁻³⁰

ESTRATEGIAS Y LIGANDOS UTILIZADOS EN EL SECTOR FARMACÉUTICO

ESTRATEGIAS UTILIZADAS PARA MEJORAR LAS PROPIEDADES BIOFARMACÉUTICAS

Numerosas metodologías fueron desarrolladas para mejorar la solubilidad, permeabilidad o estabilidad de los IFAs entre las cuales se pueden mencionar la formación de complejos o sales,^{31,32} cocrystalización o coamorfización,^{33,34} preparación de dispersiones moleculares utilizando polímeros como sistemas portadores,^{35,36} reducción de tamaño de partículas o micronización,³⁷ selección y estabilización del polimorfo de mayor relevancia terapéutica,³⁸ entre otras.

Un **sistema supramolecular** o supramolécula es una entidad formada por dos o más especies químicas unidas entre sí a través de fuerzas intermoleculares del tipo no covalentes (interacciones electrostáticas, enlaces puente hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones hidrofóbicas, entre otras).³⁹⁻⁴² La gran variedad de posibles interacciones disponibles ofrece diversas posibilidades para la construcción de estructuras supramoleculares con propiedades y funcionalidades variables. Dichos sistemas han encontrado aplicaciones en sensores,⁴³ materiales luminiscentes,⁴⁴ sondas biológicas y de imágenes celulares,^{45,46} entre otros. Dado que la química supramolecular se ha expandido y encontrado aplicación en muchas otras áreas de estudio, este campo multidisciplinario involucra las ciencias químicas, físicas y biológicas.⁴⁷ Es por esto que los sistemas supramoleculares son una interesante estrategia a la hora de optimizar propiedades biofarmacéuticas de un IFA.

A lo largo de los años se ha demostrado que una gran variedad de ligandos son capaces de formar **complejos de inclusión** con compuestos orgánicos entre los cuales los complejos de inclusión de ciclodextrinas son ampliamente estudiados por su aplicación en el área farmacéutica.^{48,49} Por otra parte, las **sales farmacéuticas** también son muy utilizadas debido a que proporcionan un medio para mejorar la solubilidad, velocidad de disolución y/o absorción de los fármacos. Asimismo, algunas propiedades fisicoquímicas de los IFAs como higroscopicidad, punto de fusión, cristalinidad, estabilidad química y física, entre otras, pueden mejorarse mediante la selección de una sal.⁵⁰

A diferencia de las sales farmacéuticas, en un **cocrystal o coamorfo** las interacciones son no iónicas y los componentes se encuentran en estado neutro, lo que da la ventaja de generar nuevas formas sólidas de los IFAs incluso cuando no tienen grupos funcionales ionizables en su estructura. Generalmente, se obtienen materiales con propiedades que difieren de las de los IFAs puros, de sus solvatos o de sus sales y esto se logra sin crear o romper enlaces covalentes. La principal ventaja de los coamorfos sobre los cocrystal es su potencial para

mejorar la biodisponibilidad de un IFA poco soluble por aumento en la solubilidad y/o disolución de éste como resultado de la naturaleza amorfa del material.^{51,52}

Adicionalmente, en los últimos años los **polimorfos** se han convertido en una importante área de investigación ya que se estima que aproximadamente el 50% de los IFAs tiene más de una forma polimórfica. El fenómeno del polimorfismo tiene importantes implicancias en la industria farmacéutica. Puede afectar a la estabilidad química del principio activo ya que al tener propiedades físicas diferentes los polimorfos pueden ser más o menos inertes a diferentes condiciones de humedad y temperatura. La velocidad de absorción también se ve afectada, algunos polimorfos del mismo compuesto muestran una actividad muy baja frente a otros con superiores velocidades de disolución.⁵³

A la hora de formular un medicamento debemos tener en cuenta que el polimorfo en cuestión sea suficientemente estable, soluble y que sobreviva sin experimentar ninguna transformación polimórfica a las condiciones de procesado y fabricación del medicamento. En consecuencia, para poder evaluar estos factores es necesario conocer el número de polimorfos del principio activo, su estabilidad relativa, si las formas metaestables pueden ser estabilizadas y las propiedades particulares de cada uno de ellos.⁵³

LIGANDOS

Numerosos compuestos son utilizados en química farmacéutica con el fin de optimizar las propiedades biofarmacéuticas de los fármacos. En esta sección se describirán las familias de ligandos que serán utilizados en la presente tesis doctoral.

OLIGOSACÁRIDOS

Los oligosacáridos son polímeros que contienen un número pequeño, entre 3 y 20, de azúcares simples (monosacáridos) conectados por enlaces O-glicosídicos (enlace covalente que se establece entre los grupos alcohol de dos azúcares). Los oligosacáridos que se forman pueden ser lineales, cíclicos o ramificados.

CICLODEXTRINA

Las **ciclodextrinas (CDs)** son una familia de oligosacáridos cíclicos constituidos generalmente por 6, 7 u 8 unidades de D-glucopiranosas unidas por enlaces glicosídicos α 1 \rightarrow 4 y se denominan α -ciclodextrina (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD) y γ -ciclodextrina (γ -CD), respectivamente (Figura 1.4). Estas macromoléculas son obtenidas a partir de la degradación

enzimática del almidón y difieren en sus propiedades fisicoquímicas dependiendo del número de monómeros que las forman.⁵⁴

Las CDs, como resultado de la conformación silla de las unidades de glucopiranosas, poseen una disposición molecular que adopta una forma toroidal o de cono truncado donde todos los grupos hidroxilos se encuentran orientados hacia el exterior dándole un carácter marcadamente hidrófilo. Los grupos hidroxilo secundarios se orientan hacia la parte de mayor diámetro del cono y los grupos hidroxilo primarios a la de menor diámetro. Este comportamiento ocurre debido a que la rotación libre de los grupos hidroxilo primarios reduce el diámetro efectivo de la cavidad. Por otra parte, el interior de las CDs está formado por átomos de hidrógeno de los grupos CH y pares electrónicos de los enlaces glicosídicos, por lo que presentan una cavidad de carácter hidrofóbico y apolar.⁵⁵

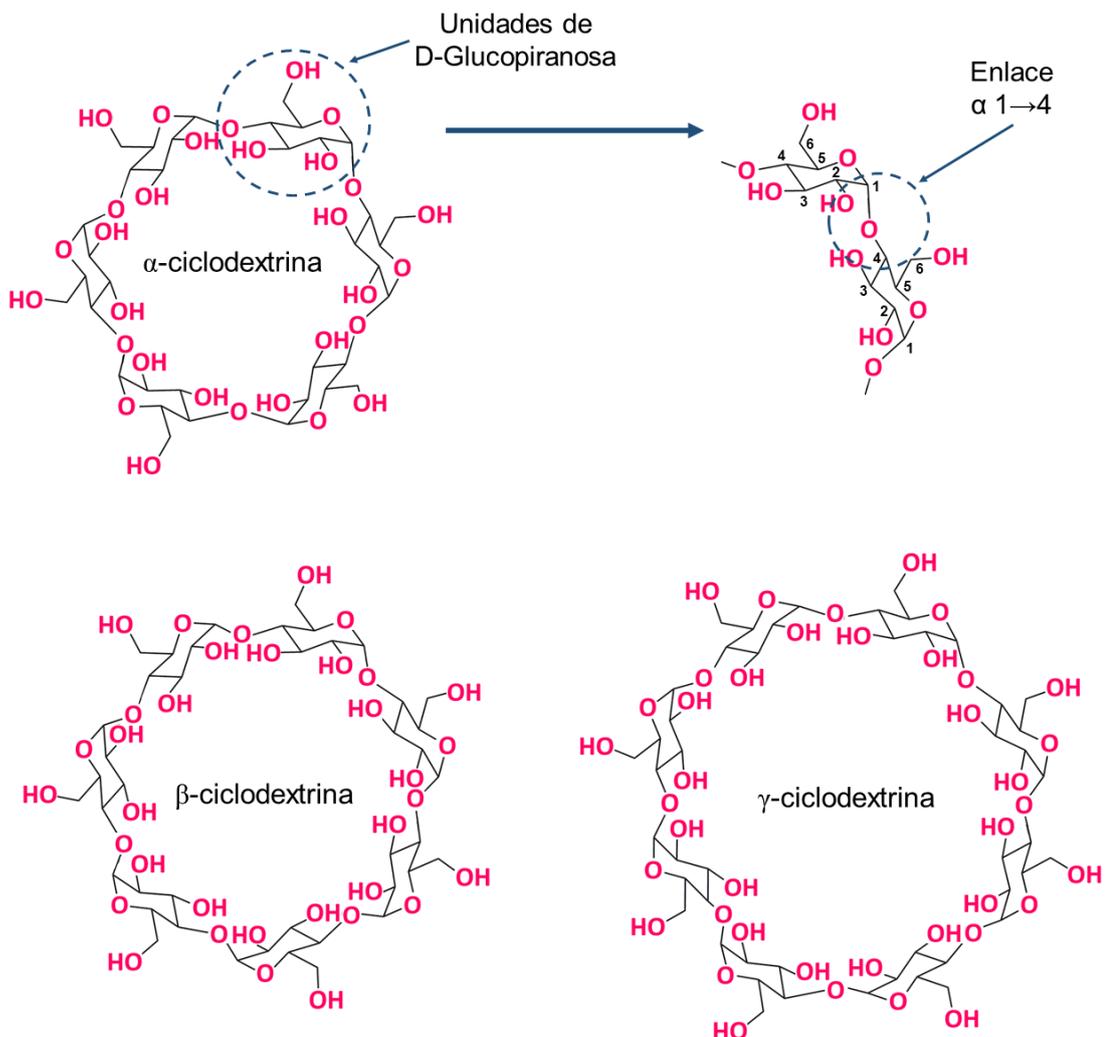


Figura 1.4. Estructura de: α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina.

Esta característica dual de poseer un exterior hidrófilo y una cavidad hidrofóbica le confiere a las CDs la capacidad de albergar moléculas orgánicas en su interior, formando los denominados complejos de inclusión.⁵⁴

PROPIEDADES

Las CDs presentan una elevada estabilidad en medio alcalino, pero hidrolizan en medio ácido fuerte transformándose en oligosacáridos lineales. La solubilidad de β -CD es notablemente inferior a la solubilidad de α -CD y γ -CD debido a que al poseer un número impar de unidades de glucopiranososa se forman seis enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los grupos hidroxilo secundarios, evitando la formación de enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua circundantes. Las propiedades y características más relevantes de las diferentes CDs se resumen en la Tabla 1.1.⁵⁴

Tabla 1.1. Características estructurales y propiedades fisicoquímicas de las CDs.

Propiedades	α -CD	β -CD	γ -CD
Nº de unidades de Glucosa	6	7	8
Peso Molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidad en agua (g/100mL, 25°C)	14,5	1,85	23,2
Diámetro de cavidad, Å	5,7	7,8	9,5
Diámetro total, Å	13,7	15,3	16,9
Altura, Å	7,8	7,8	7,8
Altura de la cavidad, Å ³	174	262	427
Moléculas de agua en la cavidad	6	11	17
pK _a (25°C)	12,33	12,20	12,08
Punto de fusión (°C)	255-260	255-262	240-245

Las CDs pueden ser modificadas químicamente por sustitución de sus grupos hidroxilos por otros grupos funcionales. Entre las diferentes modificaciones existen tres grupos principales de CDs modificadas: metiladas, hidroxipropiladas (ambas neutras) o sulfobutiladas (cargadas negativamente). Las CDs modificadas mantienen la capacidad de incluir moléculas en su cavidad hidrofoba con una afinidad diferente a la de la CD natural de la que derivan.

FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

Una de las características más importantes de las CDs es su capacidad para formar complejos de inclusión con una gran variedad de compuestos sólidos, líquidos o gaseosos

incluyéndolos en su cavidad hidrofóbica. Estos complejos de inclusión pueden obtenerse tanto en solución como en estado sólido. La fuerza que impulsa la formación de los complejos es la liberación de las moléculas de agua de la cavidad de las CDs, es decir que no se forman ni se rompen enlaces covalentes. En solución acuosa, la cavidad hidrofóbica de las CDs se encuentra ocupada por moléculas de agua las cuales pueden ser desplazadas por moléculas más hidrofóbicas, produciendo de esta manera una disminución en la tensión de la cavidad. La unión del huésped a la CD no es permanente, la fuerza de la asociación depende del tamaño del huésped, del anfitrión, así como del tipo y cantidad de interacciones que puedan generarse entre ambos compuestos. La disociación de los complejos de inclusión es un proceso rápido (minutos).⁵⁴

Los complejos de inclusión permiten modificar diferentes propiedades de las moléculas huésped como por ejemplo su solubilidad, volatilidad, estabilidad frente a la luz, oxígeno o calor. También son utilizados para ocultar sabores y olores desagradables, para realizar separaciones enantioméricas o para controlar la liberación de un IFA, entre otras aplicaciones. Por estas razones, las CDs son ampliamente utilizadas en las industrias alimentaria, cosmética, textil, farmacéutica, agropecuaria, etc.^{54,56}

APLICACIONES EN EL ÁREA FARMACÉUTICA

En el área de la química farmacéutica, las CDs son utilizadas para incrementar la solubilidad, estabilidad o biodisponibilidad de los fármacos, para prevenir interacciones IFA-IFA o IFA-excipientes, para aminorar la irritación, ya sea ocular o gastrointestinal, para reducir o eliminar sabores y olores desagradables, entre otros.⁵⁷

Numerosos complejos (o sistemas) binarios y ternarios con CDs han sido reportados a lo largo de los años.^{58,59} Los sistemas binarios involucran un IFA como huésped y una CD, ya sea natural o modificada, como receptor. Los sistemas ternarios, además de estos componentes, incluyen un tercer constituyente que es utilizado generalmente para potenciar el efecto que se esté buscando modificar (solubilidad, estabilidad, permeabilidad, entre otros). Como ejemplo prometedor de un sistema binario se ha reportado recientemente la encapsulación de eugenol en β -CD como un método excelente para proteger al IFA de la degradación térmica, permitiéndole mantener la acción antibacteriana a temperaturas superiores a su temperatura de volatilización. Estos resultados apoyan la aplicación del sistema binario eugenol: β -CD como aditivo antimicrobiano en materiales que requieren procesamiento térmico.⁶⁰ Otros ejemplos de sistemas ternarios serán desarrollados más adelante (página 30-32).

Las CDs se encuentran presentes en numerosas formulaciones farmacéuticas que son actualmente dispensadas para la vía oral, bucal, tópica, rectal, intravenosa, etc. En 1976 se

aprobó en Japón el primer medicamento conteniendo CD el cual contenía el complejo prostaglandina E2: β -CD y se comercializó en forma de comprimidos sublinguales (Prostarmon E™). Doce años más tarde, en Europa se aprobó la comercialización de un medicamento conteniendo piroxicam: β -CD en forma de comprimidos (Brexin®). Recién en 1997, Estados Unidos aprobó una solución oral con el sistema itraconazol:2-hydroxypropyl- β -CD (Sporanox®).⁶¹ Actualmente, más de 40 medicamentos conteniendo CDs se comercializan en gran parte del mundo, incluyendo Argentina.

MALTODEXTRINA

Las **maltodextrinas (MDs)** son polisacáridos de cadena lineal que se obtienen a partir de la hidrólisis parcial del almidón de grado alimentario, el cual consiste en una proporción particular de amilosa y amilopectina.

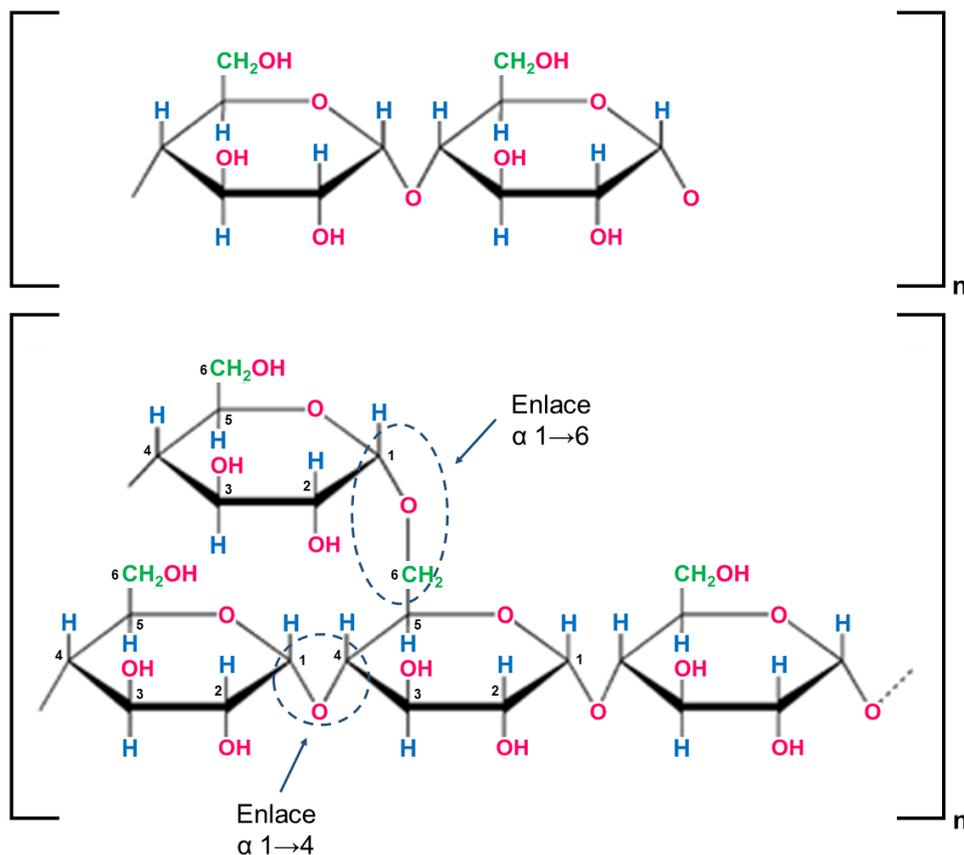


Figura 1.5. Estructura general de: MD lineal y MD ramificada.

La amilosa está compuesta por varios oligómeros de D-glucosa unidos principalmente por enlaces α 1 \rightarrow 4, mientras que la amilopectina posee unidades de glucosa unidas linealmente con enlaces glicosídicos α 1 \rightarrow 4 y presenta ramificaciones que ocurren cada 24 a 30 unidades

de glucosa, donde los oligómeros se encuentran unidos por enlaces α 1→6 (Figura 1.5). Generalmente, se clasifican en base a su contenido de azúcares reductores directos, expresados como equivalentes de dextrosa (ED), los cuales pueden variar entre 2 y 20.⁶²

PROPIEDADES

En la Tabla 1.2 se presentan las diferentes tendencias en las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las MDs, las cuales dependen del perfil de carbohidratos que las integran y de su contenido de ED.

Tabla 1.2. Tendencia en las propiedades de las MDs.

Equivalente de Dextrosa (%)	MALTODEXTRINA				
	5	10	15	18	20
Viscosidad y cuerpo	←				
Higroscopicidad	→				
Prevención de cristales gruesos	←				
Solubilidad	→				
Osmolaridad	→				
Dulzor	→				

FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

Las MDs presentan forma de hélice y son capaces de albergar un huésped en su interior y formar complejos de inclusión. La cavidad interna de esta hélice es hidrofóbica, equivalente al interior de las CDs, por lo que también pueden alojar en su interior diferentes moléculas hidrofóbicas. Al igual que en el caso de los complejos de inclusión con CDs, la unión de MD al huésped es reversible y los complejos se disocian con facilidad en el organismo. Es por esto que las MDs poseen una gran variedad de aplicaciones en la industria alimentaria donde funcionan como agentes estabilizantes, espesantes y encapsulantes. Además, al formar estos complejos de inclusión, ayudan a controlar la textura, dulzor, higroscopicidad y densidad de algunos alimentos, reducen la cristalización del huésped e incrementan su solubilidad en agua. A su vez, se han utilizado soluciones concentradas con MDs como alimento para personas que presentan falla renal crónica, cirrosis hepática, trastornos en el metabolismo de aminoácidos y en ciertas condiciones diabéticas debido a que generan un alto aporte energético con poco volumen y bajo contenido de electrolitos.⁶²

APLICACIONES EN EL ÁREA FARMACÉUTICA

Por su amplio uso en alimentos y su conocida seguridad, es que en la última década el área farmacéutica comenzó a mostrar interés en emplear MDs como modificadores de ciertas propiedades biofarmacéuticas. En la actualidad, aún no se encuentran disponibles comercialmente formando complejos de inclusión con fármacos, pero sí se comercializan medicamentos que incluyen MD como excipiente. Sin embargo, recientemente, sistemas basados en MD han demostrado generar una máxima liberación y estabilidad de Efavirenz.⁶³ Así mismo, el perfil de disolución *in vitro* y la permeación *ex vivo* (a través del intestino de rata) de valsartán mejoraron al ser formulado en proniosomas basados en MD.⁶⁴

AMINOACIDOS

Un **aminoácido (AA)** es una molécula orgánica que está formada por un carbono central unido a un grupo amino, un grupo carboxilo, un hidrógeno y una cadena lateral (X) específica para cada aminoácido (Figura 1.6). Generalmente, los AA se encuentran ionizados en solución debido a que tanto el grupo carboxilo como el grupo amino son susceptibles a ionización.⁶⁵

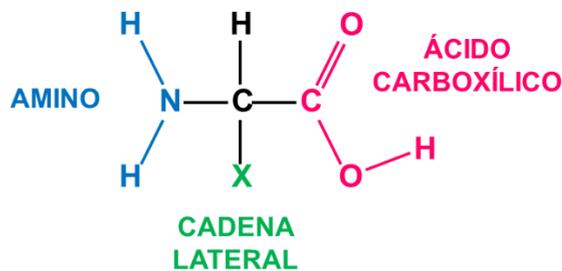


Figura 1.6. Estructura general de un aminoácido.

CLASIFICACIÓN

Se puede clasificar a los AA en función de una gran variedad de características como, por ejemplo, si pueden ser sintetizados por el organismo o deben ser adquiridos a través de la dieta, en base a sus propiedades químicas, entre otras. No obstante, la clasificación más utilizada se realiza teniendo en cuenta el tipo de cadena lateral que presentan:

- AA Neutros polares o hidrófilos: serina (SER), treonina (TRE), glutamina (GLN), asparagina (ASN), tirosina (TIR) y cisteína (CIS).

- AA Neutros no polares o hidrofóbicos: alanina (ALA), valina (VAL), leucina (LEU), isoleucina (ILE), metionina (MET), prolina (PRO), fenilalanina (FEN), triptófano (TRI) y glicina (GLI).
- AA Ácidos: ácido aspártico (ASP) y ácido glutámico (GLU).
- AA Básicos: arginina (ARG), histidina (HIS) y lisina (LIS).

PROPIEDADES

Entre las propiedades que poseen los AA, una de las más importantes para el área farmacéutica es la capacidad de comportarse como un ácido o como una base dependiendo el valor de pH de la solución donde se encuentren. Los compuestos que presentan este tipo de característica se denominan **anfóteros**. Generalmente, el pK_a del grupo básico (amino) se encuentra entre 9 y 10, mientras que el del grupo ácido (carboxilo) cercano a 2. Por lo tanto, todos los AA cuando se someten a cambios en el pH pasan por un estado en el que tienen una **carga neta cero**, debido a que hay igual número de cargas positivas y negativas en la molécula. El pH al que esto ocurre se conoce como el punto isoeléctrico. Sin embargo, no existe un valor de pH en el que los AA tengan una **carga absoluta cero** (ausencia completa de cargas positivas y negativas). La capacidad de solubilizarse en agua de cada AA es diferente debido a la naturaleza de su cadena lateral y decrece hasta un mínimo a valores de pH cercanos al valor de su punto isoeléctrico.

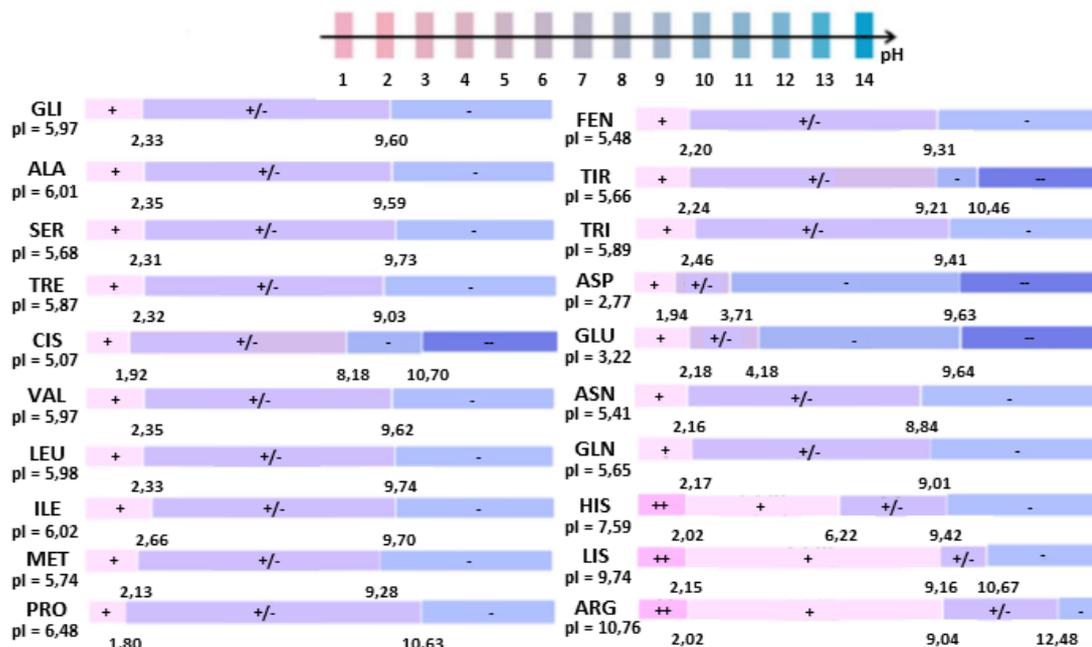


Figura 1.7. Rango de protonación en función del pH (++, +, +/- = zwitterión, -, --). Las zonas se encuentran delimitadas por los valores de pK_a . Imagen adaptada del trabajo publicado por Tilborg et al (2014).⁶⁶

En la Figura 1.7 se puede observar que a pH fisiológico (alrededor de 7,0-7,4), no todos los aminoácidos están presentes como iones dipolares o "zwitteriones" (estado en el que poseen el mismo número de grupos cargados positiva y negativamente). Este comportamiento se debe a que el sustituyente de la cadena lateral modifica fuertemente el comportamiento de la molécula. Esta observación es de gran importancia para una mayor comprensión de los sistemas multicomponentes que implican AA como sales o cocristales.⁶⁶

APLICACIÓN EN EL ÁREA FARMACÉUTICA

En las últimas décadas los AA fueron muy utilizados en el área de la química farmacéutica como excipientes de distintos medicamentos. Un trabajo publicado en 2013 definió a los AA como excipientes prometedores para estabilizar la forma amorfa de un IFA y contribuir a incrementar la disolución de fármacos poco solubles en agua. Demostraron que ARG, FEN y TRI estabilizaban la forma amorfa de indometacina tanto en sistemas binarios como en sistemas ternarios y revelaron que la forma amorfa de carbamazepina era estabilizada al formar un sistema binario con TRI.³⁴ Posteriormente, otro estudio evidenció que las formas amorfas de simvastatina y glibenclamida también podían ser estabilizadas al formar sistemas coamorfos con AA. La primera fue estabilizada al interaccionar con lisina, mientras que glibenclamida formó sistemas coamorfos binarios con serina y treonina, y un sistema coamorfo ternario conteniendo ambos AA.⁶⁷ Recientemente, se describió que ARG, CIS, ASP y GLU estabilizaron la forma amorfa de ciprofloxacina y en todos los casos se observaron mejoras significativas en la solubilidad del IFA. A pesar de que los sistemas con ASP y GLU ofrecían el mayor incremento de la solubilidad, dichos sistemas mostraron una disminución en la cantidad de IFA permeado con respecto al IFA cristalino puro. Por el contrario, los sistemas conteniendo ARG y CIS mejoraron significativamente la permeabilidad del fármaco, pero tuvieron un efecto mucho más modesto sobre su solubilidad.⁶⁸

Otro aspecto ampliamente estudiado es la capacidad que presentan los AA de optimizar la permeabilidad de fármacos que presentan dificultades con esta propiedad. Recientemente, experimentos de permeación *in vitro* realizados empleando una membrana artificial que simula la barrera de la piel demostraron que el sistema binario aciclovir:ácido ursodesoxicólico genera incremento en la permeabilidad del IFA. Sin embargo, al adicionar LIS a este sistema binario se observó un fuerte efecto sinérgico sobre la permeabilidad.⁶⁹ Otro estudio analizó diferentes AA catiónicos (ARG, LIS e HIS) con el objetivo de optimizar la absorción intestinal de insulina y sorprendentemente demostró que sólo ARG presenta potencial para mejorar dicha propiedad.⁷⁰

Varios trabajos demostraron que la formación de sistemas multicomponente de fármacos con AA y CDs es una interesante estrategia para incrementar la solubilidad en medio acuoso,

debido a la capacidad potencial de los AA para interactuar simultáneamente con el IFA, a través de interacciones electrostáticas, y con la CD, a través de enlaces puente hidrógeno. En este sentido, naproxeno fue combinado con hidroxipropil- β -CD y diferentes AA (LIS, ARG, ILE y VAL) con el objetivo de estudiar el efecto sobre la solubilidad. Entre los AA probados, ARG fue el mejor candidato para aumentar la solubilidad del IFA y el único AA que demostró un efecto sinérgico cuando se lo usó en combinación con hidroxipropil- β -CD.⁷¹ Otro ejemplo de este comportamiento fue demostrado al combinar cloranfenicol con β -ciclodextrina y diferentes AA (CIS y GLI). En este caso, ambos sistemas ternarios mostraron aumento en la solubilidad del IFA y, a su vez, no interfirieron con su actividad microbiológica.⁷²

ETANOLAMINAS

Las **etanolaminas (ETA)** pertenecen al grupo de las alcanolaminas ya que son compuestos que presentan dos grupos funcionales una amina y un alcohol, por lo que pueden sufrir reacciones características de aminas y de alcoholes. En las ETA el grupo alcohol es siempre primario, mientras que la amina puede ser primaria (monoetanolamina, MEA), secundaria (dietanolamina, DEA) o terciaria (trietanolamina, TEA). Las estructuras se pueden observar en la Figura 1.8.

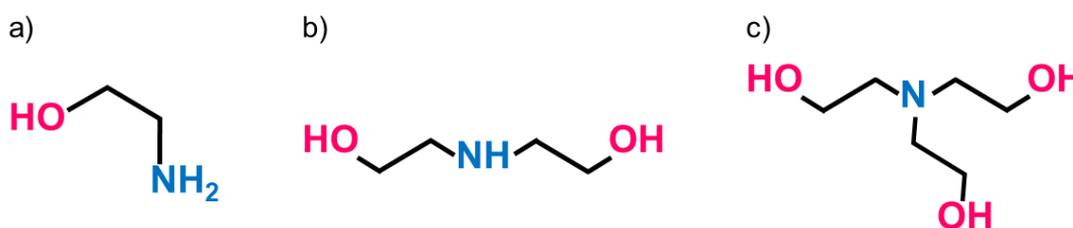


Figura 1.8. Estructura general de: a) MEA, b) DEA y c) TEA.

PROPIEDADES

Las ETA son líquidos viscosos, completamente solubles en agua, acetona y metanol, y parcialmente solubles en otros solventes orgánicos.⁷³ Además, son muy higroscópicas e inestables cuando se las expone a la luz y el oxígeno.

APLICACIÓN EN EL ÁREA FARMACÉUTICA

Las ETA son generalmente utilizadas en formulaciones farmacéuticas cosméticas como agentes alcalinizantes, humectantes y emulsificantes.^{74,75}

En los últimos años se ha estudiado la utilización de ETA para optimizar las propiedades biofarmacéuticas desfavorables de IFAs como su solubilidad o permeabilidad. Se obtuvieron sales binarias de meloxicam con las distintas ETA y se evaluó la solubilidad y permeabilidad transdérmica en ratón sin pelo observándose que las sales con MEA y DEA aumentaban la solubilidad con respecto del IFA puro y que las tasas de permeación, en todos los casos, fueron superiores a la del IFA.⁷⁶ Además, se determinó que la disolución *in vitro* de meloxicam y sus sales fueron bajas a pH 1,2 (menores al 10% en todos los casos), pero los porcentajes de meloxicam disuelto mejoraron significativamente a pH 6,8 (superiores al 40% para todas las sales). Los perfiles farmacocinéticos *in vivo* revelaron que todas las sales facilitaron la rápida absorción del fármaco al tiempo que mantuvieron la exposición prolongada de éste en el organismo.⁷⁷

En bibliografía también se describen sistemas multicomponentes con CDs y ETA como estrategia para mejorar la solubilidad, velocidad de disolución o permeabilidad de fármacos poco solubles en agua. En particular, sistemas binarios y ternarios de hidroxipropil- β -CD y MEA, DEA o TEA incrementaron la solubilidad y velocidad de disolución de flurbiprofeno.⁷⁸ Adicionalmente se demostró que la permeación transcutánea *in vitro* de diclofenac mejoró levemente en presencia de un sistema con metil- β -CD. Sin embargo, la adición de MEA a dicho sistema binario aumentó 67 veces la cantidad de IFA permeado.⁷⁹

Un sistema multicomponente de β -CD, TEA y sulfisoxazol aumentó la solubilidad y velocidad de disolución del IFA como resultado de un efecto combinado de la formación de una sal entre el fármaco y TEA y de la formación de un complejo de inclusión con la CD.⁸⁰ Además, se demostró que TEA y β -CD forman un sistema ternario sólido con metotrexato produciendo un aumento significativo de la solubilidad y una disolución más rápida del fármaco *in vitro*.⁸¹ Por otra parte, TEA aumentó significativamente el poder de solubilización de hidroxipropil- β -CD para acetazolamida, en comparación con el IFA libre, así como con el sistema binario entre el fármaco y la CD. El sistema ternario también incrementó la permeabilidad corneal *in vitro*, mostró un aumento en la eficacia y una reducción en los efectos secundarios del IFA en estudios de presión intraocular *in vivo*.⁸²⁻⁸⁴

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Actualmente, aproximadamente el 40% de los medicamentos aprobados y comercializados y casi el 90% de los IFAs en proceso de desarrollo presentan problemas en su biodisponibilidad oral debido principalmente a problemas de solubilidad,⁸⁵ aunque también la biodisponibilidad se puede ver afectada por parámetros como la permeabilidad o la estabilidad.

Particularmente SMZ presenta problemas de solubilidad en medio acuoso lo que genera una baja disolución en los fluidos gastrointestinales. Por tal motivo, este IFA es ampliamente estudiado en el sector farmacéutico. Investigaciones previas lograron la formación de cocristales entre SMZ y ácido málico utilizando acetona como solvente. Estos sistemas incrementaron notablemente la velocidad de disolución del IFA en soluciones de pH 7,4.⁸⁶ Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado que el complejo binario con hidroxipropil- β -CD aumenta levemente la solubilidad de SMZ en medio acuoso.⁸⁷

Considerando dichos antecedentes, así como la ausencia de resultados sobre la interacción de SMZ con AA, en el presente trabajo de tesis doctoral se proyectó el desarrollo y estudio de **sistemas binarios** SMZ:AA, tanto en solución como en estado sólido, y el análisis del efecto producido por estos sistemas sobre la **solubilidad** y **disolución** de SMZ.

FUR exhibe baja solubilidad en medio acuoso, baja permeabilidad intestinal e inestabilidad fotoquímica, por lo que su biodisponibilidad oral es muy variable y errática. Es por esto que a lo largo de los años se desarrollaron numerosas estrategias para aumentar su solubilidad, velocidad de disolución y permeabilidad. Entre ellas se pueden mencionar: la síntesis de ésteres de FUR que actúan como profármacos, ya que se hidrolizan en la sangre liberando al fármaco;⁸⁸ la encapsulación de FUR en dendrímeros de poliamidoamina que modifican la solubilidad y disolución;⁸⁹ la formación de dispersiones sólidas con crospovidona (combinada con la micronización del IFA) que permiten alcanzar un mayor grado de biodisponibilidad *in vitro*;⁹⁰ la obtención de un cocrystal con cafeína que combina la mejora en la solubilidad de FUR con el aumento de estabilidad del sistema en relación a las formas polimórficas del IFA o dispersiones amorfas;⁹¹ la preparación de nanopartículas de quitosano/alginate cargadas con FUR que incrementan la permeabilidad intestinal del IFA *ex vivo* y mejoran significativamente sus parámetros farmacocinéticos *in vivo*;⁹² entre otras. Sin embargo, algunas de estas estrategias incluyen el uso de grandes cantidades de solventes orgánicos y dejan residuos de estos en los sistemas obtenidos, otras presentan amplias distribuciones de tamaño de partículas dificultando la homogeneidad en las propiedades obtenidas, por ello aún es de gran interés obtener un sistema que sea reproducible, seguro para uso en medicina humana y que mejore las propiedades biofarmacéuticas desfavorables del fármaco. Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación demostraron que la combinación de FUR con diferentes oligosacáridos (MD y β -CD) mejoran su solubilidad en agua 2,2 y 1,6 veces, respectivamente y reducen el proceso de fotodegradación química.⁹³⁻⁹⁵

Teniendo esto en cuenta, en el presente trabajo de tesis doctoral se proyectó el desarrollo y el estudio de **sistemas binarios** (con AA o ETA) y **sistemas ternarios** (con oligosacáridos y AA o ETA) de FUR, tanto en solución como en estado sólido, y el análisis de su efecto en la

solubilidad, disolución, permeabilidad y estabilidad de FUR, ya que estas propiedades representan un problema farmacotécnico y biofarmacéutico crítico para dicho IFA.

CAPÍTULO 2: ESTUDIOS EN SOLUCIÓN

ESTUDIOS EN SOLUCIÓN

CONSIDERACIONES GENERALES

Como se describió anteriormente a la hora de administrar un medicamento la vía oral es la más conveniente y comúnmente empleada debido a la facilidad de administración, el alto cumplimiento por parte de los pacientes, la relación costo-efectividad, las menores restricciones de esterilidad y la flexibilidad en el diseño de la forma de dosificación. Sin embargo, el principal desafío para el diseño de las formas de dosificación oral radica en su escasa biodisponibilidad, donde la solubilidad juega un rol fundamental, ya que es uno de los parámetros más importantes para lograr la concentración deseada de fármaco en la circulación sistémica y así lograr la respuesta farmacológica requerida.⁹⁶

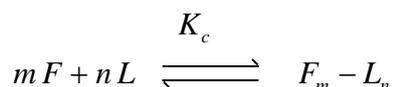
La solubilidad de un compuesto depende principalmente de su estructura ya que ésta determina la lipofilicidad, la posibilidad de formar enlaces puente hidrógeno, el volumen molecular, la energía cristalina y la ionizabilidad. Además, la solubilidad es afectada por el pH de la solución, la fuerza iónica y la temperatura.

La mejora de la solubilidad de los IFAs es uno de los aspectos más desafiantes del proceso de desarrollo de nuevos medicamentos debido al importante papel que juega en la biodisponibilidad oral. En el área farmacéutica, para estudiar la solubilidad de compuestos con baja hidrofiliicidad se emplea principalmente el método de **solubilidad de fases**.

ANÁLISIS DE SOLUBILIDAD DE FASES

El análisis de solubilidad (AS) es un método que se utiliza para estudiar la interacción entre un **sustrato poco soluble** (en este caso un IFA, por lo cual de ahora en adelante lo llamaremos así) y un **ligando soluble**. Si la solubilidad del IFA es alterada por la presencia del ligando dicha modificación puede interpretarse como una evidencia de la presencia de interacciones entre ambas sustancias. Esta metodología, desarrollada por Higuchi y Connors, se usa principalmente para complejos de inclusión de IFAs con CDs.⁹⁷ El AS permite estimar la constante de formación (K_C) como también elucidar la estequiometría de la reacción de interacción.

En un AS las moléculas del sistema están en equilibrio con las moléculas libres en solución (Reacción 2.1). Donde m moléculas de IFA (F) y n moléculas de ligando (L) forman el sistema (F_m-L_n), y K_C es la constante de formación (estabilidad o asociación) del sistema formado.⁹⁸



Reacción 2.1. Reacción general para la formación de sistemas.

La formación del sistema se considera una reacción química reversible, en la cual la velocidad a la que se alcanza el equilibrio es mucho mayor que la velocidad de los procesos de medición.^{99,100}

Experimentalmente se coloca un exceso del IFA sólido con baja solubilidad en medio acuoso en un tubo y se le adiciona un volumen constante de solución acuosa de ligando en concentraciones crecientes del mismo. El exceso de sustrato es añadido para mantener lo más alta posible su actividad termodinámica. Los tubos son agitados y mantenidos a temperatura constante hasta alcanzar el equilibrio. Las suspensiones resultantes son filtradas, y la concentración total del IFA se determina mediante técnicas analíticas como espectrofotometría UV-Vis, HPLC, etc. Finalmente, se construye el perfil o diagrama de solubilidad para evaluar el efecto del ligando sobre la solubilidad aparente del IFA. A partir del análisis de la isoterma generada en el AS pueden identificarse diferentes comportamientos.

TIPOS DE ISOTERMAS DE SOLUBILIDAD

La correlación entre la solubilidad del IFA y la concentración de ligando da origen a diferentes tipos de isotermas de solubilidad. En términos generales, existen dos tipos: A y B (Figura 2.1).^{61,97,101}

En los diagramas de solubilidad de tipo A, la solubilidad aparente del IFA aumenta en función de la concentración de ligando, indicando la formación de sistemas de mayor solubilidad que la del IFA libre. El límite de solubilidad no se alcanza dentro del rango de concentraciones de ligando estudiado. Tres subtipos de isotermas de tipo A han sido definidos:

- Isotermas de tipo A_L: muestran un incremento lineal de la solubilidad en función de la concentración de ligando e indican la formación de sistemas de primer orden respecto al ligando y, a su vez, pueden ser de primer orden o de orden superior respecto al IFA. Si la pendiente de la isoterma tipo A_L es mayor a la unidad, se asume la formación de sistemas de alto orden. Generalmente, cuando la pendiente de la isoterma es menor a la unidad y en ausencia de mayor información, se asume la formación de sistemas solubles 1:1.

- Isotermas de tipo A_P : presentan una desviación positiva de la linealidad a altas concentraciones de ligando, pudiendo sugerir que el ligando es más efectivo a altas concentraciones e indican la formación de sistemas de alto orden respecto al ligando, a altas concentraciones de éste.
- Isotermas de tipo A_N : revelan una desviación negativa de la linealidad sugiriendo que el ligando es menos efectivo a altas concentraciones. Este comportamiento puede estar asociado a cambios en las propiedades del solvente a altas concentraciones de ligando y/o a la autoagregación del ligando a altas concentraciones de éste.

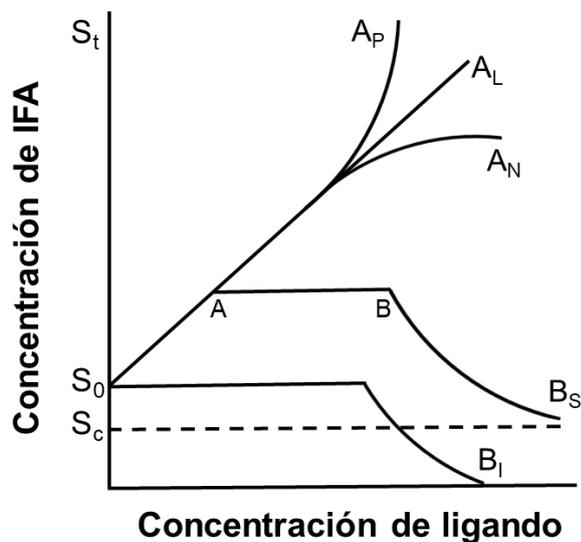


Figura 2.1. Tipos de Isotermas de Solubilidad (S_0 : solubilidad intrínseca de IFA en ausencia de ligando; S_t : concentración disuelta de IFA (libre + sistema); S_c : solubilidad límite del sistema poco soluble).

Los diagramas de solubilidad de tipo B son indicativos de la formación de sistemas con solubilidad en medio acuoso limitada o insolubles. Se han definido dos subtipos de isotermas tipo B:

- Isotermas de tipo B_S : a medida que se incrementa la concentración de ligando ocurre la formación de un sistema soluble que aumenta la solubilidad total del IFA hasta el punto A donde alcanza su límite de solubilidad, esta porción inicial puede considerarse un diagrama de Tipo A. Al incorporar cantidades adicionales de ligando ocurre la formación de un sistema insoluble que precipita y la concentración de IFA libre permanece constante por la disolución de IFA sólido remanente. De esta manera, el IFA sólido se consume y al alcanzar el punto B todo el IFA se ha convertido, ya sea en el sistema soluble o en el sistema insoluble. La posterior adición de ligando resulta en

la formación del sistema insoluble que precipita disminuyendo la concentración total del IFA en solución, la cual se aproxima asintóticamente al límite de solubilidad del sistema (S_c).

- Isotermas de tipo B_i : la interpretación es similar a los perfiles del tipo B_s salvo que la solubilidad aparente del IFA permanece sin cambios perceptibles hasta que se convierte completamente en un sistema insoluble.

ESTIMACIÓN DE LA CONSTANTE DE FORMACIÓN DEL SISTEMA

Teniendo en cuenta la Reacción 2.1, la constante K_c expresa las proporciones de las especies en equilibrio:

$$K_c = \frac{[F_m L_n]}{[F]^m [L]^n} \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

donde $[F_m L_n]$ es la concentración del sistema, $[F]$ la concentración del IFA y $[L]$ la concentración del ligando.

El valor de K_c depende de variables como temperatura y pH del medio de reacción. Por ejemplo, para una reacción que presenta una entalpía negativa (reacción exotérmica), un incremento de temperatura produce disociación del sistema y el valor de K_c disminuye. Por otra parte, para un IFA ionizable el valor de K_c exhibe una fuerte dependencia del valor de pH del medio.^{99,102}

Para las isotermas de solubilidad de tipo A_L , incluyendo la porción inicial de las de tipo A_P , A_N y B_s , la formación del sistema $F_m L_n$ es responsable del incremento de la solubilidad aparente del IFA. Las concentraciones de las especies involucradas en la formación del sistema pueden expresarse como:

$$[F] = S_0 \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

$$[F_m L_n] = \frac{S_t - S_0}{m} \quad (\text{Ecuación 2.3})$$

$$[L] = L_t - n [F_m L_n] \quad (\text{Ecuación 2.4})$$

donde S_0 es la solubilidad del IFA en ausencia de ligando; S_t la concentración total de IFA disuelto, y L_t la concentración total de ligando adicionada; considerando que la concentración de IFA libre permanece constante por la presencia de IFA sólido.

La combinación de las ecuaciones 2.1 – 2.4 permite obtener una expresión para K_C en términos de concentraciones conocidas, m y n . En particular, cuando $n=1$ se obtiene la siguiente ecuación:

$$S_t = \frac{m K_c S_0^m L_t}{1 + K_c S_0^m} + S_0 \quad (\text{Ecuación 2.5})$$

La gráfica de S_t en función de L_t para la formación de un sistema soluble da una recta o isoterma de Tipo A_L .^{97,98} La intersección es igual a S_0 , y para una estequiometría 1:1, $m=1$, es posible calcular el valor de K_C como:

$$K_c = \frac{\text{pendiente}}{S_0 (1 - \text{pendiente})} \quad (\text{Ecuación 2.6})$$

El objetivo del presente capítulo fue seleccionar los ligandos que demuestren mayor capacidad para incrementar la solubilidad de SMZ y FUR. Evaluar la posible formación de sistemas en solución entre los IFAs y los ligandos seleccionados estimando la estequiometría en equilibrio y el valor de K_C para los sistemas obtenidos. Finalmente, clasificarlos en términos de solubilidad según el SCB.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Se utilizaron los siguientes productos de origen comercial: SMZ y FUR (Parafarm®, Argentina), Trietanolamina, L-Leucina, L-Arginina y L-Serina (Sigma-Aldrich®, USA), L-Isoleucina, L-Valina, Prolina, MD (DE17), Glicina (Todo Droga, Argentina), ácido L-aspártico y ácido L (+) glutámico (Anedra®, Argentina) y L-Histidine (Sigma-Aldrich®, Japón). β -CD (PM = 1135) fue cordialmente donada por Ferromet® (Agente de Roquette® en Argentina). Todos los otros reactivos y solventes utilizados fueron de grado analítico. El agua utilizada en todos los ensayos fue obtenida a partir de un sistema de purificación de agua Millipore Milli-Q (Millipore®, USA).

INSTRUMENTAL

Las muestras fueron pesadas en una balanza analítica Mettler H72. Se trabajó a temperatura constante utilizando un agitador orbital Ferca (Argentina) o un baño

termostatzado Lauda con una precisión de 37,0 (± 0,1) °C. La disolución de las muestras se favoreció utilizando un sonicador Elmasonic S40 Elma (Alemania) y/o un vortex Ferca (Argentina). Los espectros UV-Visible de SMZ y FUR se registraron en un espectrofotómetro Agilent® Cary 60 UV-160. Las mediciones de pH fueron realizadas con un pH-metro HANNA modelo SA520, provisto de un electrodo Hanna HI 1330B. La calibración del equipo se realizó con soluciones de referencia de pH 4,0 y 7,0.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

ANÁLISIS DE SOLUBILIDAD

Los AS fueron realizados de acuerdo al método reportado por Higuchi y Connors.⁹⁷ En todos los casos, se utilizó como blanco una solución conteniendo la concentración correspondiente de ligando y los tubos fueron protegidos de la luz. Cada experimento se repitió al menos tres veces y el resultado informado es el valor promedio de estas mediciones. Para realizar la cuantificación se realizaron curvas de calibración para cada muestra estudiada.

En todos los estudios se midió el valor de pH de las soluciones y se calcularon los porcentajes de las especies ionizada y neutra de SMZ y FUR, a partir de la ecuación de Henderson–Hasselbalch,¹⁰³ para determinar si el incremento en la solubilidad aparente de los IFAs debido a la presencia del medio o de los ligandos es ocasionado por cambios del valor de pH de la solución:

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[AH]} \quad (\text{Ecuación 2.7})$$

EFFECTO DEL MEDIO

Se determinó la solubilidad intrínseca (S_0) de SMZ y FUR en agua, fluido gástrico simulado de pH 1,2 (FGS, preparado según USP XXX)¹⁰⁴ y solución de buffer fosfato de pH 6,8 (PBS, preparado según USP XXX)¹⁰⁴. Se seleccionaron estos valores de pH para simular las condiciones a las que está expuesto el fármaco en el organismo, a medida que circula por el tracto gastrointestinal. Un exceso de cada IFA fue suspendido en un volumen final de 5 mL de agua, FGS o PBS en tubos de vidrio con tapa a rosca. Los tubos se colocaron en el agitador orbital a 37 °C y a 180 rpm durante 72 h. Una vez alcanzado el equilibrio, las suspensiones se filtraron con un filtro de membrana de polivinilidenofluoruro de tamaño de poro de 0,45 µm (Millipore®, USA), y el filtrado se diluyó apropiadamente para el análisis cuantitativo del IFA. Las determinaciones cuantitativas se realizaron espectrofotométricamente a 266 nm para SMZ y a 274 nm para FUR.

EFEECTO DE DIFERENTES AMINOÁCIDOS

Para determinar que AA origina el mayor efecto solubilizante, se suspendió un exceso del IFA (50 mg de SMZ o FUR) en 5 mL de una solución acuosa 10 mM de diferentes AA (leucina, LEU; isoleucina, ILE; valina, VAL; arginina, ARG; ácido aspártico, ASP; ácido glutámico, GLU; histidina, HIS; serina, SER; prolina, PRO y glicina, GLI) utilizando tubos de vidrio con tapa a rosca y se siguió el procedimiento antes descrito.

EFEECTO DE LOS SISTEMAS BINARIOS

Se evaluó el efecto de HIS y ARG en la solubilidad de SMZ y de ARG, TEA, β -CD y MD en la solubilidad de FUR. Para ello, un exceso de fármaco fue suspendido en un volumen final de 5 mL de agua, FGS o PBS, conteniendo cantidades crecientes de los ligandos [HIS (3-20 mM), ARG (3-20 mM), TEA (2-15 mM), β -CD (2-10 mM) y MD (2-10 mM)] según corresponda y se siguió el procedimiento antes descrito.

Adicionalmente, a partir de los AS se determinó la estequiometría y las constantes de formación (K_C) de los sistemas en solución utilizando la ecuación 2.6. Además, el incremento de solubilidad aparente fue calculado a partir del cociente entre la solubilidad máxima aparente ($S_{m\acute{a}x}$) y S_0 .

EFEECTO DE LOS SISTEMAS TERNARIOS

Se evaluó el efecto combinado de ligandos básicos (ARG o TEA) y los oligosacáridos (β -CD o MD) sobre la solubilidad de FUR. Para ello, un exceso de fármaco fue suspendido en un volumen final de 5 mL de agua, FGS o PBS con el agregado de cantidades constantes de uno de los ligandos y cantidad creciente del otro. Las concentraciones utilizadas de cada ligando se resumen en la Tabla 2.1. Los tubos se colocaron en el agitador orbital y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente.

A partir de los AS se determinó la estequiometría y las constantes de formación de los sistemas ternarios (K_{CT}) utilizando una adaptación de la ecuación 2.6, asumiendo que la concentración fija de ligando adicionada forma parte del solvente, manteniéndose como una condición constante en todos los puntos ensayados y, además, S_0 es sustituida por la solubilidad de FUR en presencia del ligando a concentración constante: 3 mM de TEA o ARG y 4 mM de β -CD o MD (S_{0L}), resultando en la ecuación 2.8:

$$K_{CT} = \frac{\textit{pendiente}}{S_{0L} (1 - \textit{pendiente})} \quad \text{Ecuación (2.8)}$$

Adicionalmente, el incremento de solubilidad aparente fue calculado a partir del cociente entre la solubilidad máxima aparente ($S_{m\acute{a}x}$) y S_{OL} .

Tabla 2.1. Cantidad de cada ligando agregada al sistema multicomponente (expresada en mM).

	mM			
	TEA	ARG	β -CD	MD
FUR:TEA:β-CD*	2, 3, 6, 9, 12 y 15	-	4	-
FUR:TEA:MD*	2, 3, 6, 9, 12 y 15	-	-	4
FUR:ARG:β-CD*	-	3, 7, 10, 13, 17 y 20	4	-
FUR:ARG:MD*	-	3, 7, 10, 13, 17 y 20	-	4
FUR:TEA*:β-CD	3	-	2, 3, 4, 6, 8 y 10	-
FUR:TEA*:MD	3	-	-	2, 3, 4, 6, 8 y 10
FUR:ARG*:β-CD	-	3	2, 3, 4, 6, 8 y 10	-
FUR:ARG*:MD	-	3	-	2, 3, 4, 6, 8 y 10

* Ligando a concentración fija

Cabe destacar que no se evaluó el efecto de los oligosacáridos en la solubilidad de SMZ, debido a las altas dosis del IFA utilizadas en el tratamiento farmacológico (de 100 a 800 mg), lo que imposibilitaría la formulación de un medicamento con β -CD o MD para ser administrado por vía oral.

CLASIFICACION DE LOS SISTEMAS DE ACUERDO AL SCB

Con el fin de clasificar a los sistemas desarrollados en solución en términos de alta/baja solubilidad, los volúmenes necesarios para solubilizar la máxima dosis terapéutica del IFA (800 mg SMZ y 80 mg FUR) fueron calculados a partir de la máxima solubilidad de los sistemas en agua, FGS (pH 1,2) y PBS (pH 6,8).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANÁLISIS DE SOLUBILIDAD DE SULFAMETOXAZOL

EFFECTO DEL MEDIO

Se evaluó la solubilidad intrínseca de SMZ en agua, FGS y PBS (Figura 2.2). Los resultados evidencian que ésta es menor en agua [0,478 (\pm 0,006) mg/mL] que en FGS [2,04 (\pm 0,07) mg/mL] y PBS [2,05 (\pm 0,02) mg/mL].

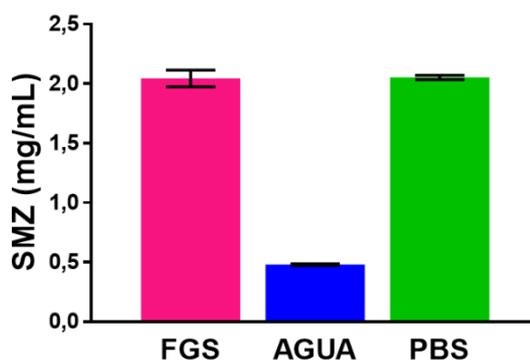


Figura 2.2. Solubilidad intrínseca de SMZ en diferentes medios a 37,0 °C.

Este comportamiento se puede justificar por el estado de ionización del fármaco (Figura 2.3) en las diferentes soluciones. En PBS aproximadamente el 7% de SMZ se encuentra en forma neutra, mientras que el 93% se encuentra ionizado como SMZ^- , debido a que el valor de pK_a del grupo ácido es de 5,7. Por otro lado, el pK_a del grupo básico es 1,97 por lo que a pH 1,2, aproximadamente el 14,5% se encuentra neutro y el 85,5% ionizado como SMZ^+ . En cambio, al pH de la solución del IFA en agua (4,7) el 91% se encuentra como SMZ neutro, produciendo su baja solubilidad.

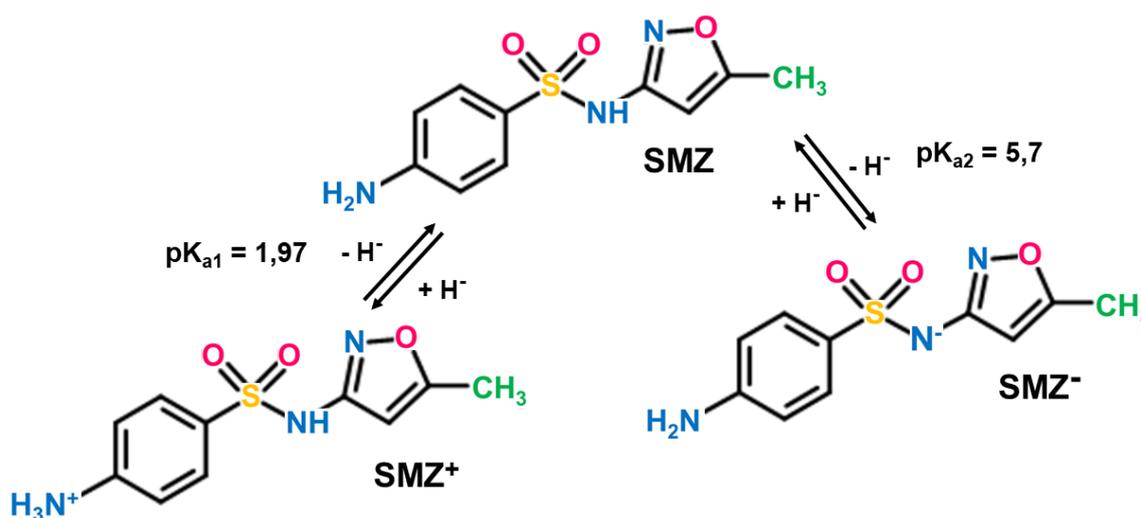


Figura 2.3. Equilibrio de ionización de SMZ.

EFEECTO DE LOS AMINOÁCIDOS

Con el objetivo de seleccionar el mejor ligando, se estudió el efecto de concentraciones fijas (10 mM) de varios AA sobre la solubilidad acuosa de SMZ a 37,0 ($\pm 0,1$) °C. Se seleccionaron AA con diferentes características ácido-base, entre los que se incluyeron AA ácidos como ASP y GLU, básicos como HIS y ARG y neutros como LEU, ILE, VAL, SER, PRO

y GLI. Los resultados obtenidos, en cuanto a valores de solubilidad y de pH, se muestran en la Figura 2.4.

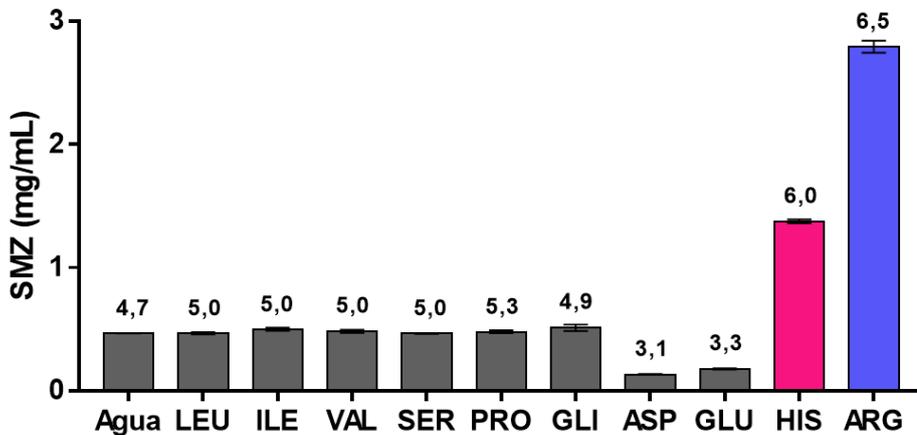


Figura 2.4. Valor de pH de las soluciones (indicado arriba de cada barra) y efecto de los AA en la solubilidad acuosa de SMZ (expresada en mg/mL).

Las soluciones de los AA neutros (LEU, ILE, VAL, SER, PRO y GLI) evidencian valores de pH levemente superiores respecto al valor pH de la solución de SMZ en agua, aunque mantienen constante la solubilidad del fármaco respecto a su solubilidad en agua. Mientras que ASP y GLU (AA ácidos) reducen la solubilidad de SMZ respecto a su solubilidad en agua. Sin embargo, este comportamiento no se encuentra asociado simplemente al estado de ionización del IFA ya que aproximadamente el 91% de SMZ se encuentra en forma neutra tanto en soluciones de pH cercano a 4,7 (pH de una solución de SMZ en agua) como en soluciones de pH cercano a 3 (pH evidenciado por las soluciones de AA ácidos) sugiriendo que el fármaco con ASP y GLU puede estar formando un sistema que precipita y presenta una solubilidad menor a la del IFA puro.

A su vez, los AA básicos aumentan la solubilidad de SMZ a 1,38 ($\pm 0,02$) mg/mL para HIS y a 2,79 ($\pm 0,05$) mg/mL para ARG, mejorando la solubilidad del IFA en agua 3 y 6 veces, respectivamente. Esto podría estar asociado a un efecto del pH de las soluciones (pH de 6,0 para la solución de HIS y 6,5 para la de ARG) como así también a una interacción entre SMZ y los AA básicos; por lo que, a partir de estos resultados, se seleccionaron HIS y ARG como ligandos prometedores para continuar el estudio en combinación con SMZ.

EFEECTO DE LOS SISTEMAS BINARIOS

Se evaluó la solubilidad de SMZ en soluciones de concentraciones crecientes de HIS o ARG (ambos ligandos en un rango de concentraciones de 3 a 20 mM) en los diferentes medios (agua, FGS y PBS). A partir de estos resultados, se construyeron los diagramas de solubilidad de fases graficando la concentración de SMZ soluble en función de las concentraciones de ligando (Figura 2.5) y se calculó la K_C y el incremento de solubilidad de los sistemas solubles (Tabla 2.2).

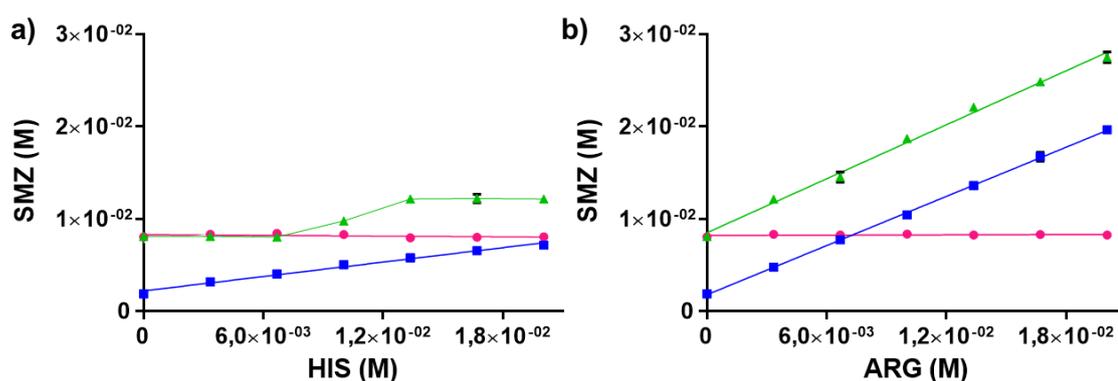


Figura 2.5. Diagrama de solubilidad de fases a 37,0 °C de SMZ en FGS (●), agua (■) y PBS (▲) conteniendo cantidades crecientes de HIS (a) y ARG (b).

Los resultados obtenidos muestran que la solubilidad de SMZ en FGS se mantiene constante frente a concentraciones crecientes de HIS o ARG (Figura 2.5). Este comportamiento se debe a que a pH 1,2 tanto el fármaco (Figura 2.3) como los AA (Figura 2.6) se encuentran ionizados en sus formas SMZ^+ , HIS^{++} y ARG^{++} probablemente imposibilitando la interacción entre ellos.

En agua se observaron isoterms de tipo A_L con aumento lineal en la solubilidad de SMZ a medida que incrementa la concentración de ambos ligandos. Como se puede apreciar en la Figura 2.7, para el sistema con HIS el aumento de la solubilidad es de $0,809 (\pm 0,008)$ mg/mL (en una solución 3 mM y pH 5,6) a $1,82 (\pm 0,01)$ mg/mL (en una solución 20 mM y pH 6,2), mientras que para el sistema con ARG es de $1,11 (\pm 0,03)$ mg/mL (en una solución 3 mM y pH 6,2) a $4,98 (\pm 0,06)$ mg/mL (en una solución 20 mM y pH 6,8). El aumento en la solubilidad del IFA puede atribuirse a que al incrementar el pH del medio (Figura 2.7) aumenta la proporción de SMZ ionizado (SMZ^-) que puede interaccionar con los AA (HIS^+ y ARG^+).

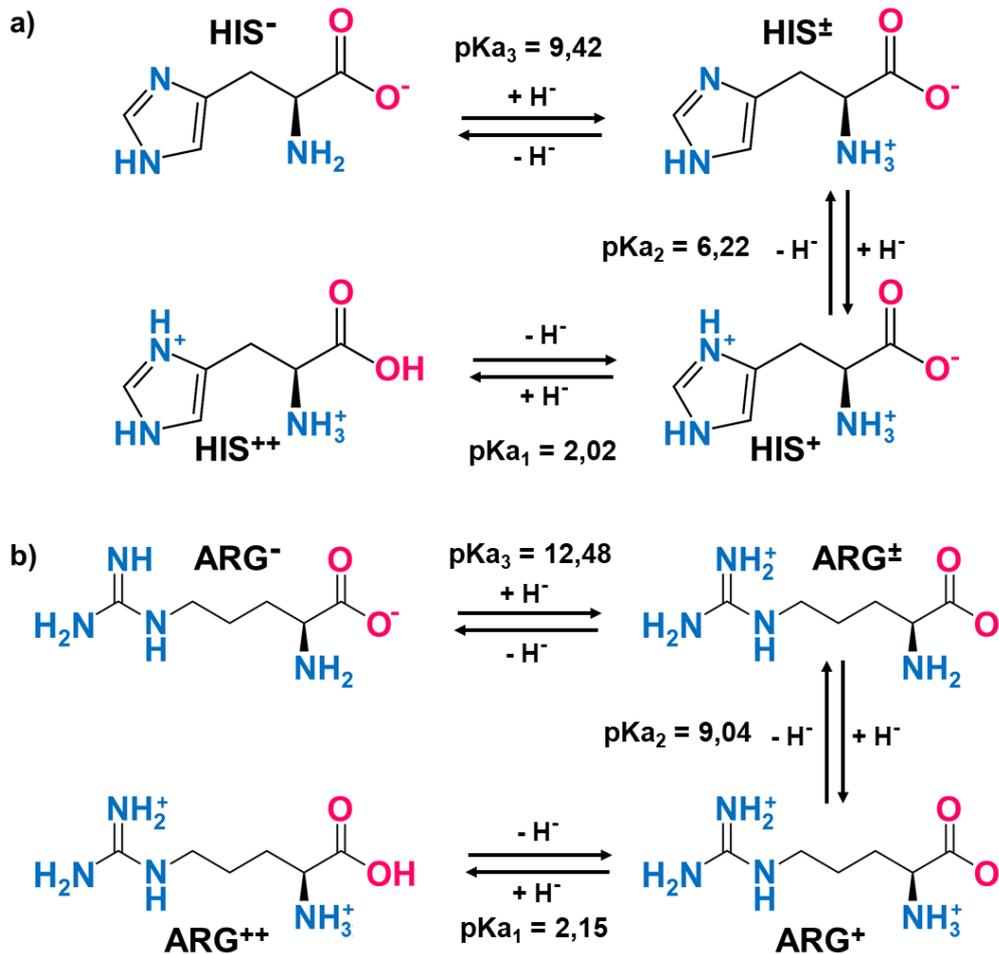


Figura 2.6. Equilibrios de ionización de HIS (a) y ARG (b).

Sin embargo, en PBS el agregado de HIS y ARG genera efectos diferenciados sobre la solubilidad de SMZ (Figura 2.5). En el perfil de solubilidad con concentraciones crecientes de HIS (Figura 2.7), se mantiene la solubilidad intrínseca del IFA (aproximadamente 2 mg/mL) hasta la solución de concentración 7 mM del AA, seguidamente la solubilidad de SMZ aumenta linealmente hasta alcanzar una solubilidad de 3,1 (\pm 0,1) mg/mL en la solución de concentración 13 mM de HIS, para luego mantenerse constante en 3,1 mg/mL hasta la solución de concentración de HIS 20 mM. Por otro lado, en presencia de ARG el incremento de la solubilidad es lineal observándose una isoterma del tipo A_L (Figura 2.5) y un aumento de 3,09 (\pm 0,06) mg/mL (en una solución 3 mM) a 7,0 (\pm 0,2) mg/mL (en una solución 20 mM) (Figura 2.7). En este caso, el efecto producido sobre la solubilidad de SMZ por ARG y PBS es aditivo en todos los puntos del análisis. Por ejemplo, en la solución conteniendo una concentración 20 mM de ARG, el aumento observado en la solubilidad del IFA es igual al incremento dado por el AA en agua [4,98 (\pm 0,06) mg/mL en la solución 20 mM] sumado a la solubilidad intrínseca de SMZ en PBS [2,05 (\pm 0,02) mg/mL].

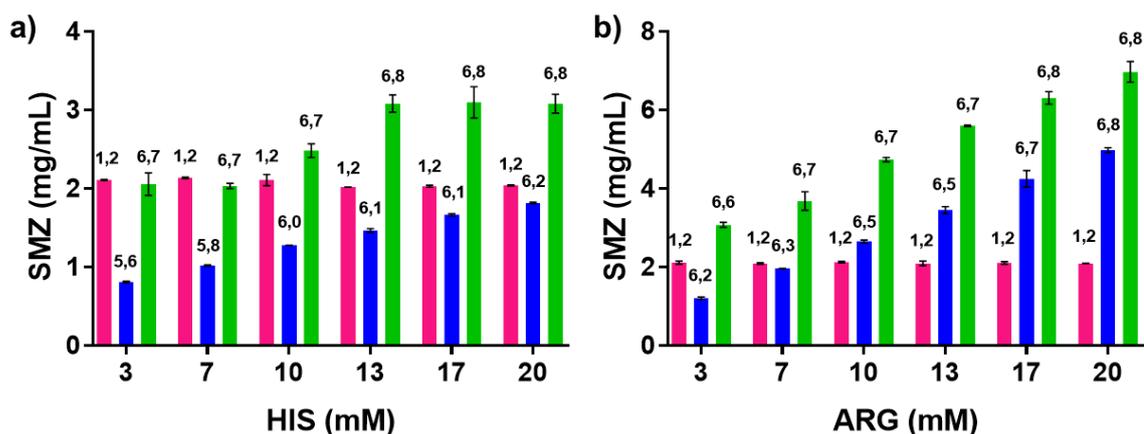


Figura 2.7. Valor de pH de las soluciones (indicado arriba de cada barra) e incremento en la solubilidad de SMZ (expresada en mg/mL) en FGS (fucsia), agua (azul) y PBS (verde) en función de cantidades crecientes de HIS (a) y ARG (b).

El AS sugiere la formación de sistemas solubles de estequiometría 1:1 entre SMZ e HIS en agua y entre SMZ y ARG en agua y PBS ya que en esos diagramas de solubilidad la porción lineal inicial posee una pendiente menor a 1.

Se calculó el valor de K_C de los sistemas a partir de la porción lineal del diagrama utilizando la ecuación 2.6 (Tabla 2.2). El valor de K_C para el sistema SMZ:HIS en agua es de 160 M^{-1} ; esta constante sugiere una interacción débil que puede estar asociada a la ionización de SMZ a los valores de pH de las soluciones de HIS (entre 5,6 y 6,2) ya que, aproximadamente el 50% de SMZ (pK_a 5,7) se encuentra como especie neutra dificultando la interacción con HIS que se encuentra parcialmente ionizada en su forma HIS^+ .

Tabla 2.2. Valores de solubilidad intrínseca (S_0), solubilidad máxima ($S_{m\acute{a}x}$), constantes de formación (K_C) e incrementos de solubilidad ($S_{m\acute{a}x}/S_0$) para los sistemas binarios SMZ:AA obtenidos a partir de los análisis de solubilidad de fases.

		Agua	FGS	PBS	
SMZ:HIS	SMZ	S_0 (mg/mL)	$0,478 \pm 0,006$	$2,04 \pm 0,07$	$2,05 \pm 0,02$
		$S_{m\acute{a}x}$ (mg/mL)	$1,82 \pm 0,01$	$2,11 \pm 0,01$	$3,1 \pm 0,1$
		K_C (M^{-1})	160 ± 5	-	-
		$S_{m\acute{a}x}/S_0$	3,8	1	1,5
SMZ:ARG		$S_{m\acute{a}x}$ (mg/mL)	$4,98 \pm 0,06$	$2,19 \pm 0,03$	$7,0 \pm 0,2$
		K_C (M^{-1})	$(444 \pm 2) 10^1$	-	$(533 \pm 2) 10^1$
		$S_{m\acute{a}x}/S_0$	10,4	1	3,4

Por otro lado, para SMZ:ARG, el valor de K_C es de 4440 M^{-1} en agua y de 5330 M^{-1} en PBS. Estos valores de K_C sugieren una interacción fuerte entre los componentes ya que el porcentaje del fármaco ionizado como SMZ^- va incrementando a medida que aumentan los valores de pH de las soluciones de ARG (entre 6,2 y 6,9) y el 99,9% del AA se encuentra ionizado como ARG^+ .

Como resumen se puede decir que los sistemas obtenidos no ejercen efecto sobre la solubilidad de SMZ en FGS debido a que no se genera interacción entre los componentes (el 85,5% del IFA se encuentra ionizado como SMZ^+ y los AA completamente ionizados como HIS^{++} y ARG^{++}). En PBS (donde los componentes se encuentran ionizados como SMZ^- , HIS^+ y ARG^+) sólo se observa incremento en la solubilidad de SMZ a altas concentraciones de HIS, mientras que para el caso de ARG, el incremento en la solubilidad es lineal a medida que aumenta la concentración de ligando. En agua (donde los componentes se encuentran ionizados como SMZ^- , HIS^+ y ARG^+) se observa un incremento lineal en la solubilidad de SMZ a medida que aumenta la concentración de ambos ligandos sugiriendo una interacción SMZ:AA del tipo iónica.

CLASIFICACION DE LOS SISTEMAS DE SMZ DE ACUERDO AL SCB

El SCB establece que un IFA es considerado de **alta solubilidad** cuando su mayor dosis terapéutica es soluble en un volumen de medio acuoso igual o menor a 250 mL en un rango de pH entre 1 y 7,5.¹⁵ En consecuencia, se calculó el volumen necesario para solubilizar 800 mg de SMZ (libre y en los sistemas) a partir de los valores de solubilidad determinados en agua, FGS y PBS mediante el análisis de solubilidad realizado con el objetivo de clasificar a los sistemas como de alta/baja solubilidad.

Tabla 2.3. Solubilidad y volumen necesario para solubilizar 800 mg de SMZ libre y en los sistemas.

SISTEMA	S (mg/mL)			Volumen necesario (mL)		
	Agua	FGS	PBS	Agua	FGS	PBS
SMZ	0,478	2,04	2,05	1674	392	390
SMZ:HIS	1,82	2,11	3,1	439	379	258
SMZ:ARG	4,98	2,19	7,0	161	365	114

Como se puede observar en la Tabla 2.3, el volumen necesario para solubilizar la mayor dosis terapéutica de SMZ es mayor a 250 mL en agua, FGS y PBS, por lo que se confirma que SMZ es un IFA de **baja solubilidad** en los tres medios.

Asimismo, se observa que al combinar el IFA con HIS el volumen disminuye significativamente en agua (de 1674 a 439 mL) y PBS (de 390 a 258 mL) y levemente en FGS (de 391 a 379 mL), pero sigue siendo mayor a 250 mL por lo que el sistema SMZ:HIS puede clasificarse como un sistema de **baja solubilidad** en los tres medios.

Al combinar SMZ con ARG el volumen necesario para solubilizar al IFA disminuye levemente en FGS y el sistema SMZ:ARG puede clasificarse como **altamente soluble** tanto en agua como en PBS.

ANÁLISIS DE SOLUBILIDAD DE FUROSEMIDA

EFFECTO DEL MEDIO

Se evaluó la solubilidad intrínseca de FUR (Figura 2.8) en agua, FGS y PBS. Los resultados muestran que la solubilidad en FGS [0,0158 (\pm 0,0005) mg/mL] es menor a la solubilidad en agua [0,047 (\pm 0,003) mg/mL] y ésta, a su vez, es menor que en PBS [2,122 (\pm 0,003) mg/mL].

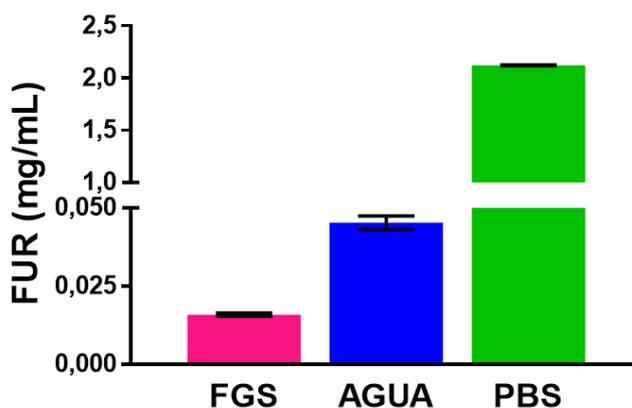


Figura 2.8. Solubilidad intrínseca de FUR en diferentes medios a 37,0 °C.

Este comportamiento se puede justificar por el estado de ionización del IFA en las diferentes soluciones (Figura 2.9). El valor de pK_a del grupo ácido es de 3,8 por lo que en PBS el 99,9% del fármaco se encuentra ionizado como FUR^- explicando así su alta solubilidad. A pH 1,2 aproximadamente el 99,9% del IFA se encuentra neutro, lo cual está en concordancia con la baja solubilidad de FUR en FGS. En la solución acuosa de pH 4,2, el 28,5% se encuentra como FUR neutra y el 71,5% como especie ionizada.

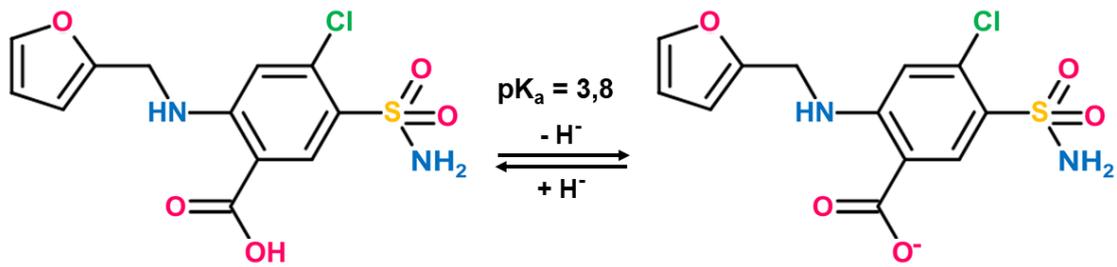


Figura 2.9. Equilibrio de ionización de FUR.

EFFECTO DE LOS AMINOÁCIDOS

Con el propósito de seleccionar un ligando adecuado, se investigó el efecto de concentraciones fijas (10 mM) de varios AA sobre la solubilidad en medio acuoso de FUR a $37,0 (\pm 0,1) ^\circ\text{C}$. Los AA seleccionados y el criterio de elección fueron descriptos para los estudios de SMZ.

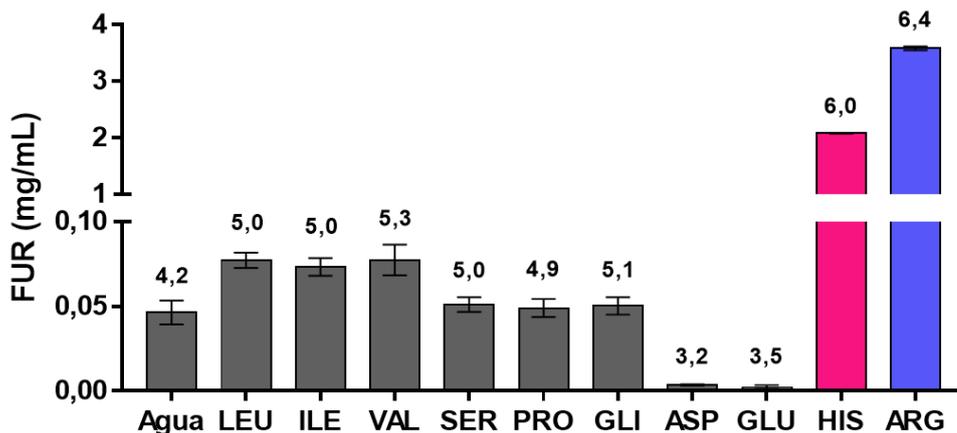


Figura 2.10. Valor de pH de las soluciones (indicado arriba de cada barra) y efecto de los AA en la solubilidad acuosa de FUR (expresada en mg/mL).

Como se puede apreciar en la Figura 2.10, los resultados evidencian que los AA neutros LEU, ILE y VAL duplican aproximadamente la solubilidad del fármaco en agua. A su vez, SER, PRO y GLI (también AA neutros) la mantienen mientras que ASP y GLU (ambos AA ácidos) la reducen.

Teniendo en cuenta los valores de pH de las diferentes soluciones se puede concluir que la solubilidad de FUR disminuye con los AA ácidos ya que en las soluciones de pH 3,2 y 3,5 aumenta el porcentaje del fármaco neutro. Por otro lado, en todas las soluciones de AA neutros los valores de pH se mantienen alrededor de 5, sin embargo, tres de los AA neutros estudiados mantienen la solubilidad en medio acuoso del IFA mientras que los otros tres AA

la duplican. A partir de estos resultados se podría estimar que FUR no interacciona con SER, PRO y GLI y que forma sistemas levemente solubles con LEU, ILE y VAL.

Se observa también que los AA básicos aumentan notablemente la solubilidad de FUR en agua donde HIS la incrementa 44 veces y ARG la mejora 77 veces. El comportamiento en presencia de HIS [2,08 (\pm 0,01) mg/mL] podría atribuirse simplemente a un efecto del pH de la solución, ya que la solubilidad alcanzada es similar a la evidenciada por el IFA libre en PBS [2,122 (\pm 0,003) mg/mL]. Por otro lado, con ARG la solubilidad es considerablemente mayor [3,61 (\pm 0,03) mg/mL] que la solubilidad intrínseca del IFA en PBS [2,122 (\pm 0,003) mg/mL] lo que permite sugerir que existe interacción entre FUR y el AA. A partir de estos resultados, se selecciona ARG como el mejor candidato para continuar con los estudios de solubilidad.

EFEECTO DE LOS SISTEMAS BINARIOS

LIGANDOS BÁSICOS: ARG y TEA

Teniendo en cuenta que FUR es un IFA que presenta características ácidas, se seleccionaron dos ligandos básicos (ARG y TEA) para ser exhaustivamente evaluados como posibles potenciadores de la solubilidad del fármaco. La elección de esta alcanolamina se debe a que este ligando se encuentra completamente ionizado como TEA⁺ en soluciones de pH menor o igual a 5,8 (Figura 2.11) y además por sus antecedentes como posible potenciador de la permeación.⁸³

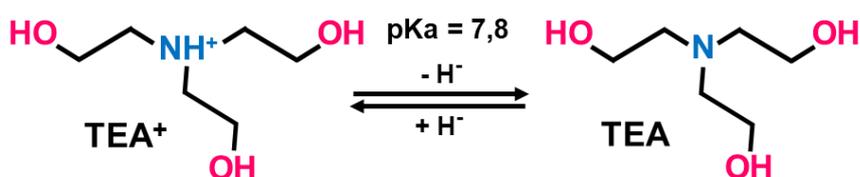


Figura 2.11. Equilibrio de ionización de TEA.

Se evaluó la solubilidad de FUR en soluciones de concentraciones crecientes de TEA (entre 2 y 15 mM) y ARG (entre 3 y 20 mM) en los diferentes medios (agua, FGS y PBS) y se construyeron los diagramas de solubilidad de fases (Figura 2.12). Adicionalmente, se calculó la K_c y el incremento de solubilidad de los sistemas solubles (Tabla 2.4).

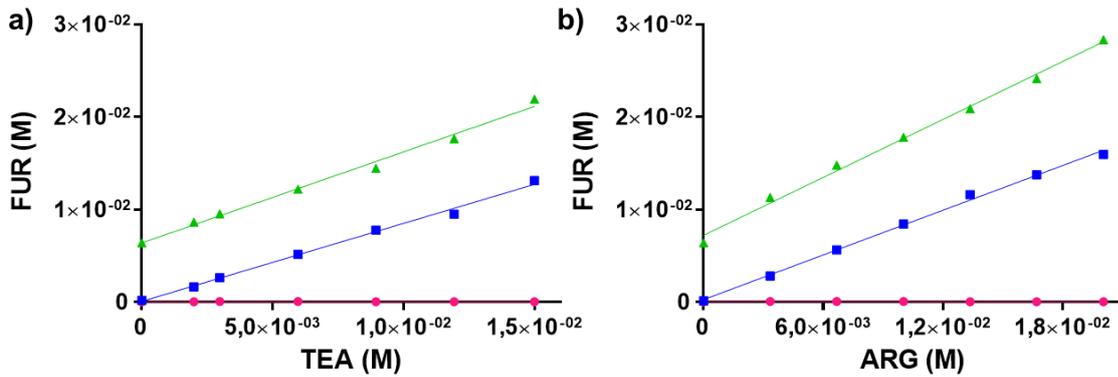


Figura 2.12. Diagrama de solubilidad de fases a 37,0 °C de FUR en FGS (●), agua (■) y PBS (▲) conteniendo cantidades crecientes de TEA (a) y ARG (b).

En FGS los resultados evidencian que la solubilidad de FUR se mantiene constante frente a concentraciones crecientes de TEA o ARG ya que el fármaco no interacciona con los ligandos básicos por que se encuentra en su forma neutra. En agua y en PBS se observa un incremento lineal en la solubilidad de FUR a medida que aumenta la concentración de cada ligando, mostrando isoterma del tipo A_L .

En la Figura 2.13 se puede apreciar que TEA aumenta la solubilidad de FUR en agua de $0,54 (\pm 0,01)$ mg/mL (en una solución 2 mM y pH 5,5) a $4,3 (\pm 0,1)$ mg/mL (en una solución 15 mM y pH 6,3), mientras que para el sistema con ARG la solubilidad de FUR se incrementa de $0,93 (\pm 0,03)$ mg/mL (en una solución 3 mM y pH 5,6) a $5,28 (\pm 0,03)$ mg/mL (en una solución 20 mM y pH 6,3). Este comportamiento puede atribuirse a que el incremento del pH de las soluciones aumenta el porcentaje de FUR^- disponible para interaccionar con TEA^+ y ARG^+ .

La solubilidad máxima alcanzada por los sistemas binarios en PBS es mayor que la lograda en agua, con TEA incrementa de $2,86 (\pm 0,02)$ mg/mL a $7,26 (\pm 0,05)$ mg/mL (en soluciones 3 y 15 mM, respectivamente) y con ARG aumenta de $3,73 (\pm 0,06)$ mg/mL a $9,38 (\pm 0,04)$ mg/mL (en soluciones 3 y 20 mM, respectivamente). A partir de estos resultados, se puede sugerir que la combinación de un ligando básico con PBS produce un efecto sinérgico sobre la solubilidad de FUR en todos los puntos de análisis. Por ejemplo, el aumento evidenciado en la solubilidad del IFA es mayor al incremento dado por TEA [$4,3 (\pm 0,1)$ mg/mL en una solución 15 mM] o ARG [$5,28 (\pm 0,03)$ mg/mL en una solución 20 mM] en agua sumado a la solubilidad intrínseca de FUR en PBS [$2,122 (\pm 0,003)$ mg/mL].

Debido a que la porción lineal de los diagramas de solubilidad posee pendiente menor o igual a 1, se puede indicar la formación de sistemas solubles de estequiometría 1:1 entre FUR y TEA, así como entre FUR y ARG, tanto en agua como en PBS.

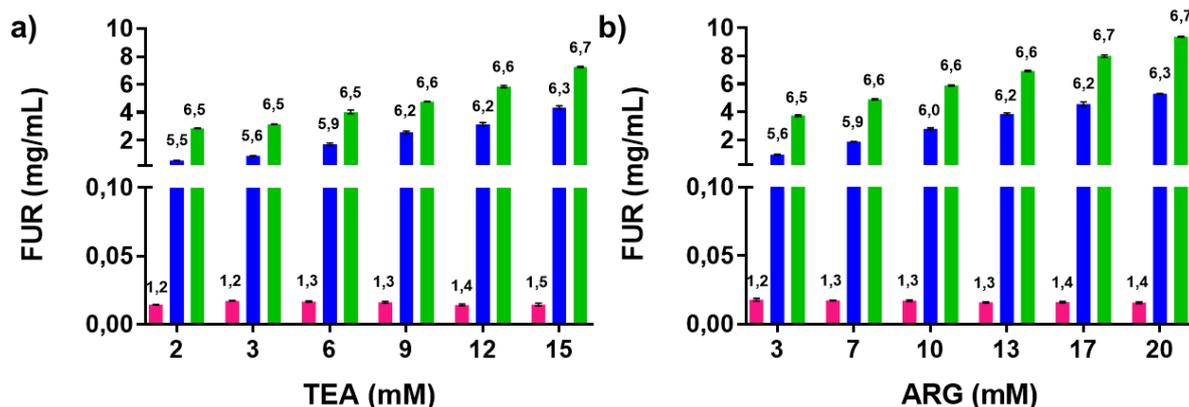


Figura 2.13. Valor de pH de las soluciones (indicado arriba de cada barra) e incremento en la solubilidad de FUR (expresada en mg/mL) en FGS (fucsia), agua (azul) y PBS (verde) en función de cantidades crecientes de TEA (a) y ARG (b).

A partir de la pendiente de los diagramas de tipo A_L se calculó el valor de K_C de los sistemas utilizando la ecuación 2.6 (Tabla 2.4). El valor de K_C del sistema FUR:TEA es de 77525 M^{-1} en agua y de 11004 M^{-1} en PBS, mientras que para el sistema FUR:ARG es de 13875 M^{-1} en agua y de 3050 M^{-1} en PBS. Estos altos valores K_C sugieren una interacción fuerte en los sistemas formados debido a que tanto TEA como ARG se encuentran ionizados como TEA^+ y ARG^+ , respectivamente y el porcentaje de FUR^- va incrementando a medida que aumentan los valores de pH de las soluciones favoreciendo la interacción iónica entre los componentes.

Tabla 2.4. Valores de solubilidad intrínseca (S_0), solubilidad máxima ($S_{\text{máx}}$), constantes de formación (K_C) e incrementos de solubilidad ($S_{\text{máx}}/S_0$) para los sistemas binarios FUR:TEA y FUR:ARG obtenidos a partir de los análisis de solubilidad de fases.

		Agua	FGS	PBS
FUR	S_0 (mg/mL)	$0,047 \pm 0,003$	$0,0158 \pm 0,0005$	$2,122 \pm 0,003$
FUR:TEA	$S_{\text{máx}}$ (mg/mL)	$4,3 \pm 0,1$	$0,017 \pm 0,001$	$7,26 \pm 0,05$
	K_C (M^{-1})	$(7752 \pm 7) 10^1$	-	$(1100 \pm 9) 10^1$
	$S_{\text{máx}}/S_0$	91	1	3,4
FUR:ARG	$S_{\text{máx}}$ (mg/mL)	$5,28 \pm 0,03$	$0,017 \pm 0,002$	$9,38 \pm 0,04$
	K_C (M^{-1})	$(1387 \pm 4) 10^1$	-	$(305 \pm 1) 10^1$
	$S_{\text{máx}}/S_0$	112	1	4,4

A partir de todos estos datos se evidencia que la interacción entre el IFA y los ligandos básicos es de tipo iónica, ya que no se observa aumento en la solubilidad cuando el fármaco

se encuentra completamente neutro (FUR 99% neutra en FGS a pH 1,2), mientras que la solubilidad incrementa a medida que aumenta el porcentaje de FUR⁻.

OLIGOSACÁRIDOS: β -CD y MD

Se evaluó la solubilidad de FUR ante la presencia de β -CD y MD (ambos ligandos en un rango de concentraciones de 2 a 10 mM) en los diferentes medios (agua, FGS y PBS) y se construyeron los diagramas de solubilidad de fases.

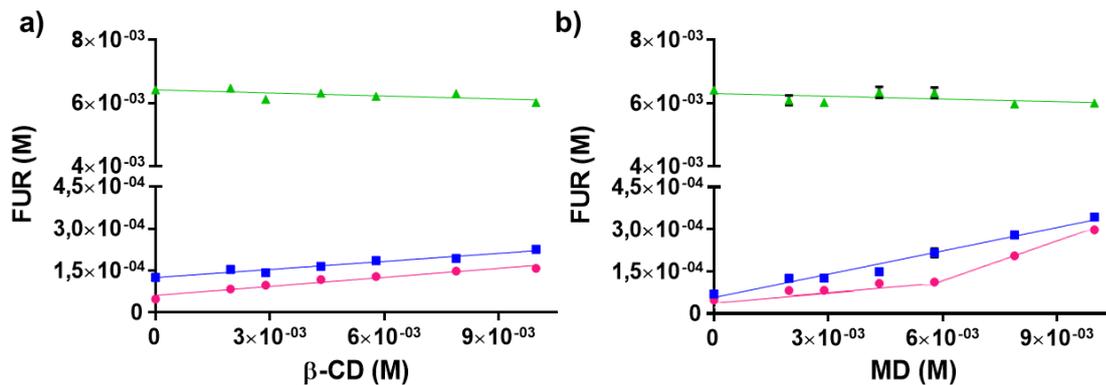


Figura 2.14. Diagrama de solubilidad de fases a 37,0 °C de FUR en FGS (●), agua (■) y PBS (▲) conteniendo cantidades crecientes de β -CD (a) y MD (b).

El análisis de los perfiles de los sistemas binarios entre FUR y los oligosacáridos muestra que la solubilidad del IFA en FGS, donde se encuentra completamente neutro, aumenta a medida que se incrementa la concentración de los ligandos sugiriendo que se producen interacciones entre FUR y ambos oligosacáridos. Para el caso de β -CD se observa un perfil del tipo A_L ya que el incremento de la solubilidad es lineal, mientras que para el caso de MD puede apreciarse un perfil del tipo A_P , donde el aumento es lineal hasta 6×10^{-3} M y luego se observa una desviación positiva a altas concentraciones de ligando (Figura 2.14).

En agua se observa un incremento lineal en la solubilidad de FUR a medida que aumenta la concentración de ambos ligandos mostrando isoterms de tipo A_L . En PBS la solubilidad de FUR se mantiene constante frente a concentraciones crecientes de los oligosacáridos observándose perfiles del tipo B_i . Estos resultados confirman los evidenciados en FGS, indicando que las interacciones entre FUR y los oligosacáridos se generan cuando el IFA se encuentra neutro (ya que tanto en agua como en FGS existe fármaco neutro en solución, mientras que el IFA se encuentra completamente ionizado en PBS).

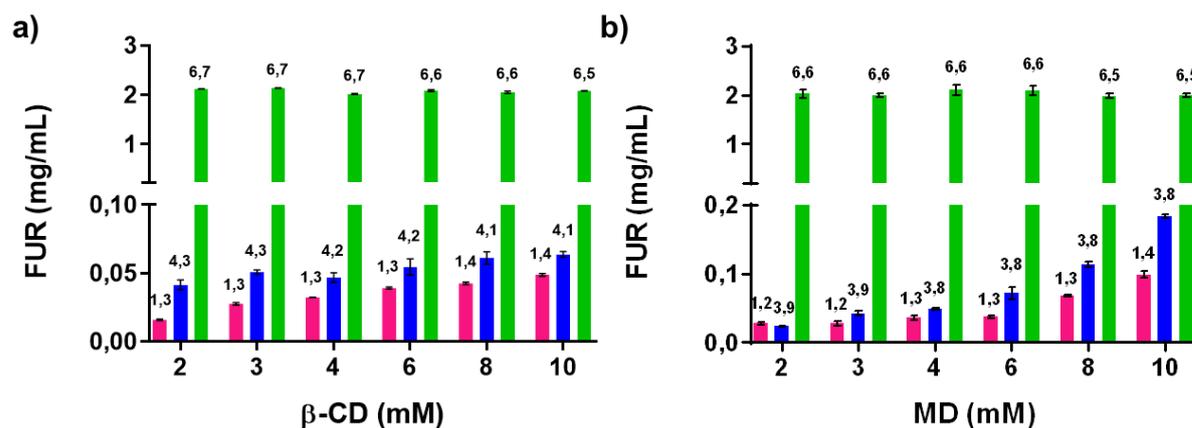


Figura 2.15. Valor de pH de las soluciones (indicado arriba de cada barra) e incremento en la solubilidad de FUR (expresada en mg/mL) en FGS (fucsia), agua (azul) y PBS (verde) en función de cantidades crecientes de β -CD (a) y MD (b).

En FGS (Figura 2.15), β -CD aumenta la solubilidad de FUR de 0,028 (\pm 0,001) mg/mL a 0,052 (\pm 0,001) mg/mL (en soluciones 2 y 10 mM, respectivamente), mientras que MD la incrementa de 0,027 (\pm 0,001) mg/mL a 0,098 (\pm 0,005) mg/mL (en soluciones 2 y 10 mM, respectivamente). También se observa que en PBS al aumentar la concentración de oligosacáridos la solubilidad de FUR se mantiene en alrededor de 2,1 mg/mL. En agua, el incremento en la solubilidad con el agregado de β -CD va de 0,052 (\pm 0,004) mg/mL a 0,075 (\pm 0,002) mg/mL (en soluciones 2 y 10 mM, respectivamente), así como de 0,023 (\pm 0,001) mg/mL a 0,184 (\pm 0,003) mg/mL con MD (en soluciones 2 y 10 mM, respectivamente). Teniendo en cuenta estos resultados y los valores de pH de las diferentes soluciones (Figura 2.15) se puede confirmar que la solubilidad de FUR en PBS está dada simplemente por el pH del medio, mientras que en agua y en FGS se originan sistemas solubles entre FUR y ambos oligosacáridos.

A partir de la porción lineal de los perfiles de solubilidad se calculó el valor de K_C (Tabla 2.5) de los sistemas utilizando la ecuación 2.6 y se confirmó la formación de sistemas solubles de estequiometría 1:1 para ambos oligosacáridos en agua y en FGS.

Para el sistema FUR: β -CD el valor de K_C es de 67 M^{-1} en agua y de 133 M^{-1} en FGS, mientras que para el sistema FUR:MD es de 225 M^{-1} en agua y de 375 M^{-1} en FGS. Los valores de K_C sugieren que la interacción entre los componentes es más débil en agua que en FGS, lo que probablemente esté asociado al estado parcialmente ionizado de FUR en agua, confirmando que la interacción entre FUR y los oligosacáridos se genera principalmente cuando el IFA se encuentra en forma neutra.

Tabla 2.5. Valores de solubilidad intrínseca (S_0), solubilidad máxima ($S_{m\acute{a}x}$), constantes de formación (K_c) e incrementos de solubilidad ($S_{m\acute{a}x}/S_0$) para los sistemas binarios FUR: β -CD y FUR:MD obtenidos a partir de los análisis de solubilidad de fases.

		Agua	FGS	PBS
FUR	S_0 (mg/mL)	0,047 \pm 0,003	0,0158 \pm 0,0005	2,122 \pm 0,003
FUR: β -CD	$S_{m\acute{a}x}$ (mg/mL)	0,075 \pm 0,002	0,052 \pm 0,001	2,17 \pm 0,02
	K_c (M^{-1})	67 \pm 2	133 \pm 8	-
	$S_{m\acute{a}x}/S_0$	1,6	3,3	1
FUR:MD	$S_{m\acute{a}x}$ (mg/mL)	0,184 \pm 0,003	0,098 \pm 0,005	2,19 \pm 0,03
	K_c (M^{-1})	(22 \pm 1) 10^1	(37 \pm 2) 10^1	-
	$S_{m\acute{a}x}/S_0$	3,9	6,2	1

Como resumen de los sistemas binarios se puede concluir que los ligandos básicos (TEA y ARG) no ejercen un efecto sobre la solubilidad de FUR en FGS (donde el 99,9% de FUR se encuentra en forma neutra), mientras que los oligosacáridos favorecen la solubilidad del fármaco debido a que interactúan con éste cuando se encuentra neutro. Por el contrario, en PBS (donde el 99,9% del IFA se encuentra como FUR⁻) se observa el efecto inverso, es decir, la solubilidad de FUR se incrementa con el agregado de los ligandos básicos, pero no se modifica en presencia de los oligosacáridos debido a que la interacción de FUR con TEA y ARG es de tipo iónica.

Tanto los ligandos básicos como los oligosacáridos ejercen un efecto positivo sobre la solubilidad de FUR en agua debido a la ionización parcial del fármaco. Si bien el efecto ante el agregado de concentraciones crecientes de ligando es lineal en todos los casos, el resultado observado es significativamente menor con los oligosacáridos. El incremento evidenciado, con respecto a la solubilidad intrínseca de FUR en agua, en soluciones 10 mM de ligando es de 1,6 veces con β -CD, de 3,9 veces con MD, de 48 veces con TEA y de 77 veces con ARG.

EFFECTO DE LOS SISTEMAS TERNARIOS

CON CONCENTRACIÓN FIJA DE OLIGOSACÁRIDOS

Se evaluó la solubilidad de FUR en sistemas multicomponentes, o sistemas ternarios, para lo cual se analizaron soluciones conteniendo concentraciones fijas de los oligosacáridos en estudio (4 mM) y concentraciones crecientes de los ligandos básicos (TEA de 2 a 15 mM y ARG de 3 a 20 mM) en los diferentes medios (agua, FGS y PBS) y se construyeron los diagramas de solubilidad de fases. Para una mejor interpretación de los resultados, se compararon los datos obtenidos para estos sistemas ternarios con los resultados de los sistemas binarios FUR:BASES y con los de las soluciones 4 mM de los oligosacáridos.

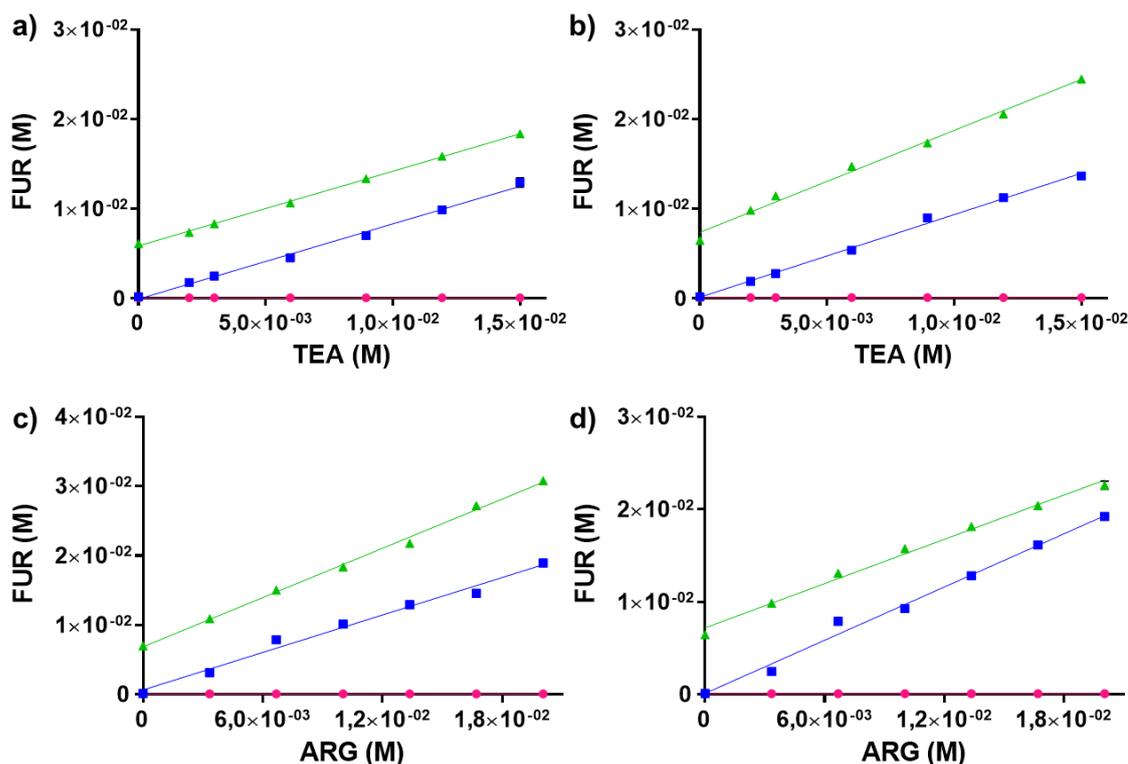


Figura 2.16. Diagrama de solubilidad de fases a 37,0 °C de FUR en FGS (●), agua (■) y PBS (▲) conteniendo TEA(2-15 mM):β-CD(4 mM) (a), TEA(2-15 mM):MD(4 mM) (b), ARG(3-20 mM):β-CD(4 mM) (c) y ARG(3-20 mM):MD(4 mM) (d).

En FGS se evidencia que la solubilidad de FUR se mantiene constante en los sistemas ternarios^v al aumentar la concentración de ligando, observándose perfiles del tipo B₁ (Figura 2.16). Este efecto es equivalente al determinado para los sistemas binarios FUR:TEA y FUR:ARG (Figura 2.13) donde la solubilidad alcanzada en FGS es similar a la solubilidad intrínseca de FUR (0,016 mg/mL). Sin embargo, en estos sistemas ternarios (Figura 2.17) la solubilidad se mantiene constante alrededor de 0,03 mg/mL en los sistemas con β-CD y de 0,04 mg/mL en los sistemas con MD; dichas solubilidades son semejantes a las evidenciadas en los sistemas binarios con β-CD y MD a concentración 4 mM (Figura 2.15) lo que sugiere que el incremento en la solubilidad del IFA es atribuible al efecto del oligosacárido involucrado en el sistema ternario.

Este comportamiento puede atribuirse a que FUR se encuentra completamente en estado neutro en FGS por lo que sólo interacciona con los oligosacáridos y dado que los sistemas ternarios contienen concentración fija de β-CD y MD, la solubilidad del fármaco se mantiene constante.

^v Sistemas ternarios con concentraciones crecientes de TEA o ARG y concentraciones fijas de oligosacáridos

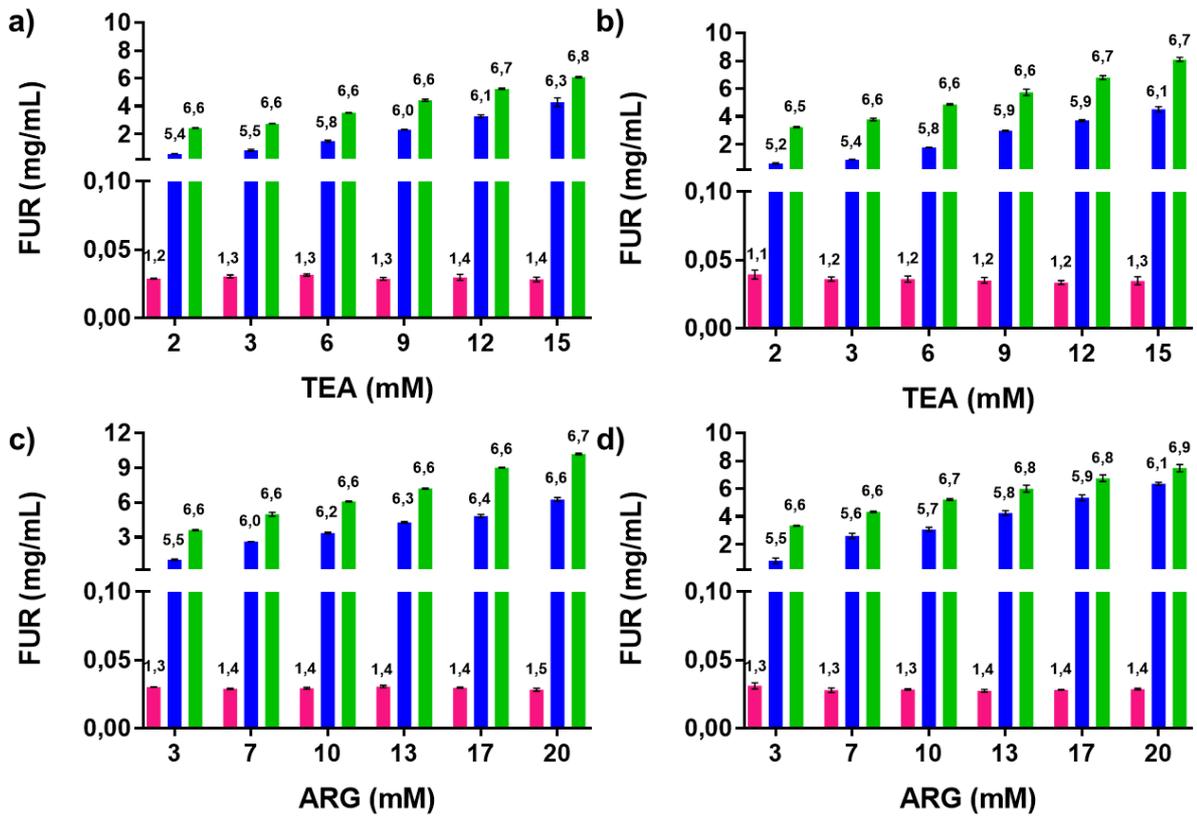


Figura 2.17. Valor de pH de las soluciones (indicado arriba de cada barra) e incremento en la solubilidad de FUR (expresada en mg/mL) en FGS (fucsia), agua (azul) y PBS (verde) en función de TEA(2-15 mM):β-CD(4 mM) (a), TEA(2-15 mM):MD(4 mM) (b), ARG(3-20 mM):β-CD(4 mM) (c) y ARG(3-20 mM):MD(4 mM) (d).

Al igual que en los sistemas binarios FUR:TEA y FUR:ARG, estos sistemas ternarios generan un incremento lineal en la solubilidad de FUR en agua y en PBS mostrando isotermas del tipo A_L (Figura 2.16).

En agua, para los sistemas ternarios conteniendo TEA la solubilidad máxima alcanzada por FUR está dada principalmente por el efecto del ligando básico ya que en el sistema binario FUR:TEA la solubilidad máxima es de 4,3 mg/mL, mientras que en los sistemas ternarios es de 4,3 mg/mL con β-CD y de 4,5 mg/mL con MD. Por otro lado, para los sistemas ternarios conteniendo ARG se observa un efecto sinérgico entre el AA y los oligosacáridos ya que la concentración máxima de FUR aumenta de 5,3 mg/mL (en el sistema binario FUR:ARG) a 6,3 mg/mL en ambos sistemas ternarios. Estos resultados son consistentes con los expuestos anteriormente ya que a los valores de pH de las soluciones de los sistemas ternarios en agua el fármaco se encuentra principalmente en su forma ionizada (FUR^-), siendo capaz de interactuar con TEA^+ y ARG^+ . Adicionalmente, para los sistemas multicomponentes conteniendo ARG se podría suponer que el sistema FUR:ARG formado en solución es capaz de interactuar con los oligosacáridos incrementando aún más la solubilidad del IFA en agua.

En PBS, para el sistema ternario conteniendo TEA y β -CD se observa un efecto antagónico con una disminución de la máxima solubilidad alcanzada por FUR de 7,26 mg/mL (en el sistema binario FUR:TEA) a 6,08 (\pm 0,03) mg/mL en la solución de concentración 15 mM de TEA y 4 mM de β -CD. Mientras que, cuando se combinan TEA y MD se observa un efecto levemente sinérgico aumentando la máxima solubilidad alcanzada por FUR (en el sistema FUR:TEA) a 8,1 (\pm 0,1) mg/mL en la solución de concentración 15 mM de TEA y 4 mM de MD. Este comportamiento permite sugerir que β -CD incluye parcialmente a TEA en su cavidad impidiendo que interactúe con FUR, mientras que MD incluye al sistema FUR:TEA aumentando así la solubilidad del fármaco. Por otro lado, el sistema ternario conteniendo ARG y β -CD produce un efecto sinérgico aumentando la máxima solubilidad alcanzada por el IFA de 9,38 mg/mL (en el sistema binario FUR:ARG) a 10,19 (\pm 0,07) mg/mL en la solución de concentración 20 mM de ARG y 4 mM de β -CD. Mientras que para el sistema que combina ARG y MD, se observa un efecto antagónico donde la máxima solubilidad alcanzada por FUR (en el sistema FUR:ARG) disminuye a 7,5 (\pm 0,3) mg/mL mL en la solución de concentración 20 mM de ARG y 4 mM de MD. El comportamiento observado sugiere que β -CD incluye al sistema FUR:ARG en su cavidad aumentando la solubilidad del fármaco en PBS, mientras que MD incluye a ARG libre en la cavidad de su hélice impidiendo que interactúe con FUR en solución.

Tabla 2.6. Valores de solubilidad intrínseca (S_{0L}), solubilidad máxima ($S_{m\acute{a}x}$), constantes de formación (K_{CT}) e incrementos de solubilidad ($S_{m\acute{a}x}/S_{0L}$) para los sistemas ternarios con concentraciones fijas de los oligosacáridos obtenidos a partir de los análisis de solubilidad de fases.

		Agua	FGS	PBS
FUR:β-CD*	S_{0L} (mg/mL)	0,051 \pm 0,002	0,030 \pm 0,003	2,022 \pm 0,004
FUR:TEA:β-CD*	$S_{m\acute{a}x}$ (mg/mL)	4,3 \pm 0,2	0,031 \pm 0,001	6,08 \pm 0,03
	K_{CT} (M^{-1})	(868 \pm 1) 10^2	-	770 \pm 9
	$S_{m\acute{a}x}/S_{0L}$	84	1	3
FUR:ARG:β-CD*	$S_{m\acute{a}x}$ (mg/mL)	6,3 \pm 0,3	0,031 \pm 0,002	10,19 \pm 0,07
	K_{CT} (M^{-1})	(1122 \pm 6) 10^1	-	919 \pm 8
	$S_{m\acute{a}x}/S_{0L}$	123	1	5
FUR:MD*	S_{0L} (mg/mL)	0,049 \pm 0,003	0,036 \pm 0,003	2,099 \pm 0,003
FUR:TEA:MD*	$S_{m\acute{a}x}$ (mg/mL)	4,5 \pm 0,2	0,038 \pm 0,003	8,1 \pm 0,1
	K_{CT} (M^{-1})	(1167 \pm 2) 10^2	-	(118 \pm 1) 10^1
	$S_{m\acute{a}x}/S_{0L}$	92	1	3,8
FUR:ARG:MD*	$S_{m\acute{a}x}$ (mg/mL)	6,3 \pm 0,1	0,039 \pm 0,002	7,5 \pm 0,3
	K_{CT} (M^{-1})	(2400 \pm 3) 10^2	-	527 \pm 6
	$S_{m\acute{a}x}/S_{0L}$	133	1	3,6

* Ligando a concentración fija

Debido a que la porción lineal de los diagramas de solubilidad posee pendiente menor a 1, se puede indicar que la estequiometría de los sistemas binarios FUR:TEA y FUR:ARG se mantiene en 1:1, tanto en agua como en PBS, cuando se agregan concentraciones fijas de los oligosacáridos, originándose sistemas ternarios de estequiometría 1:1:1. Además, el valor de K_{CT} en agua (Tabla 2.6) es superior, o igual, al de los sistemas binarios (Tabla 2.4), indicando que los oligosacáridos favorecerían la formación de los sistemas FUR:TEA y FUR:ARG. Por el contrario, los valores de K_{CT} en PBS son inferiores a los de los sistemas binarios sugiriendo que en este medio los oligosacáridos desfavorecen la formación de los sistemas binarios.

CON CONCENTRACIÓN FIJA DE LIGANDOS BÁSICOS

Se evaluó la solubilidad de FUR en soluciones de concentraciones crecientes de los oligosacáridos (ambos de 2 a 10 mM) y concentraciones fijas de las bases (3 mM) en los diferentes medios (agua, FGS y PBS) y se construyeron los diagramas de solubilidad de fases. Los resultados de estos sistemas multicomponentes se compararon con los resultados de los sistemas binarios FUR:OLIGOSACÁRIDO y con los resultados de solubilidad de las soluciones 3 mM de los ligandos básicos.

En la Figura 2.18 se puede apreciar que en FGS la solubilidad de FUR aumenta a medida que aumenta la concentración de ligando en todos los sistemas multicomponentes; este mismo comportamiento se observó en los sistemas binarios en los que aumenta la concentración de oligosacárido. Para ambos sistemas ternarios con β -CD se observan perfiles del tipo A_L , donde la solubilidad está dada simplemente por la concentración de la CD y no se aprecia efecto de los ligandos básicos, lo que puede atribuirse a que en FGS los ligandos básicos no interaccionan con el IFA neutro.

Para los sistemas con MD se observa un perfil del tipo A_P con TEA y un perfil del tipo A_L con ARG en FGS. En ambos sistemas ternarios la solubilidad de FUR está influenciada por el efecto de MD hasta una concentración 6 mM de oligosacárido, mientras que en las soluciones de ligando básico 3 mM y de MD 8 mM o 10 mM el efecto sobre la solubilidad de FUR originado por ambos componentes es antagónico. A éstas concentraciones de MD el agregado de los ligandos básicos disminuye la solubilidad de FUR con respecto a su solubilidad en las soluciones de MD 8 mM y 10 mM en el sistema binario FUR:MD; este comportamiento podría deberse a que los ligandos básicos libres compiten con FUR por la cavidad de la hélice de MD.

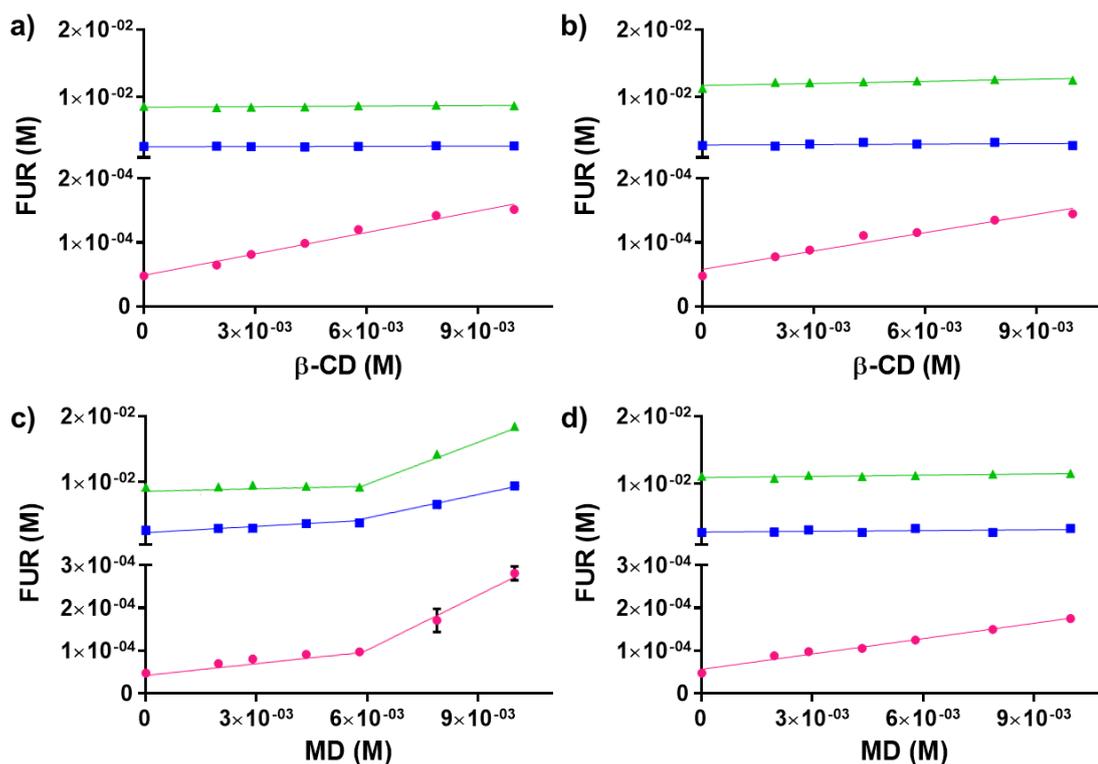


Figura 2.18. Diagrama de solubilidad de fases a 37,0 °C de FUR en FGS (●), agua (■) y PBS (▲) conteniendo TEA(3 mM): β -CD(2-10 mM) (a), ARG(3 mM): β -CD(2-10 mM) (b), TEA(3 mM):MD(2-10 mM) (c) y ARG(3 mM):MD(2-10 mM) (d).

En agua, para ambos sistemas ternarios con β -CD y para el sistema ternario constituido por MD y ARG se pueden observar perfiles del tipo B_I, sin modificación de la solubilidad de FUR a medida que aumenta la concentración de ligando (Figura 2.18). En estos sistemas multicomponentes, la solubilidad observada está dada por la concentración de los ligandos básicos (3 mM) y se mantiene alrededor de 0,93 mg/mL para los sistemas ternarios con ARG y cercana a 0,87 mg/mL para el sistema con TEA y β -CD (Figura 2.19). El sistema ternario conteniendo TEA (3 mM) y MD presenta un perfil de tipo A_P donde la solubilidad del IFA se mantiene alrededor de 0,87 mg/mL hasta una concentración 6 mM de MD y a concentraciones mayores de ésta se observa un efecto sinérgico entre los componentes con incremento de la solubilidad de FUR. Este efecto podría atribuirse a una posible inclusión del sistema soluble FUR:TEA en la cavidad de la hélice de MD.

En PBS, los perfiles de los sistemas multicomponentes TEA: β -CD y ARG:MD muestran que la solubilidad de FUR se mantiene cercana a 3,15 mg/mL y a 3,7 mg/mL que es la solubilidad que presentan los sistemas binarios FUR:TEA y FUR:ARG, respectivamente. Esto indica que la solubilidad observada para estos sistemas ternarios se debe netamente al efecto de los ligandos básicos. El sistema ternario con β -CD y ARG muestra un efecto sinérgico entre los componentes, ya que se observa un aumento leve en la solubilidad de FUR de 3,7 mg/mL

a 4,1 mg/mL. Esto sugiere la inclusión del sistema soluble FUR:ARG en la cavidad de la β -CD lo que genera un efecto positivo sobre la solubilidad del IFA. El sistema ternario con TEA y MD presenta un perfil de tipo A_P (Figura 2.18c) y la solubilidad se mantiene alrededor de 3,15 mg/mL hasta la concentración 6 mM de MD y luego presenta un marcado incremento. Esto podría deberse a la inclusión del sistema soluble FUR:TEA en la cavidad de la hélice de la MD.

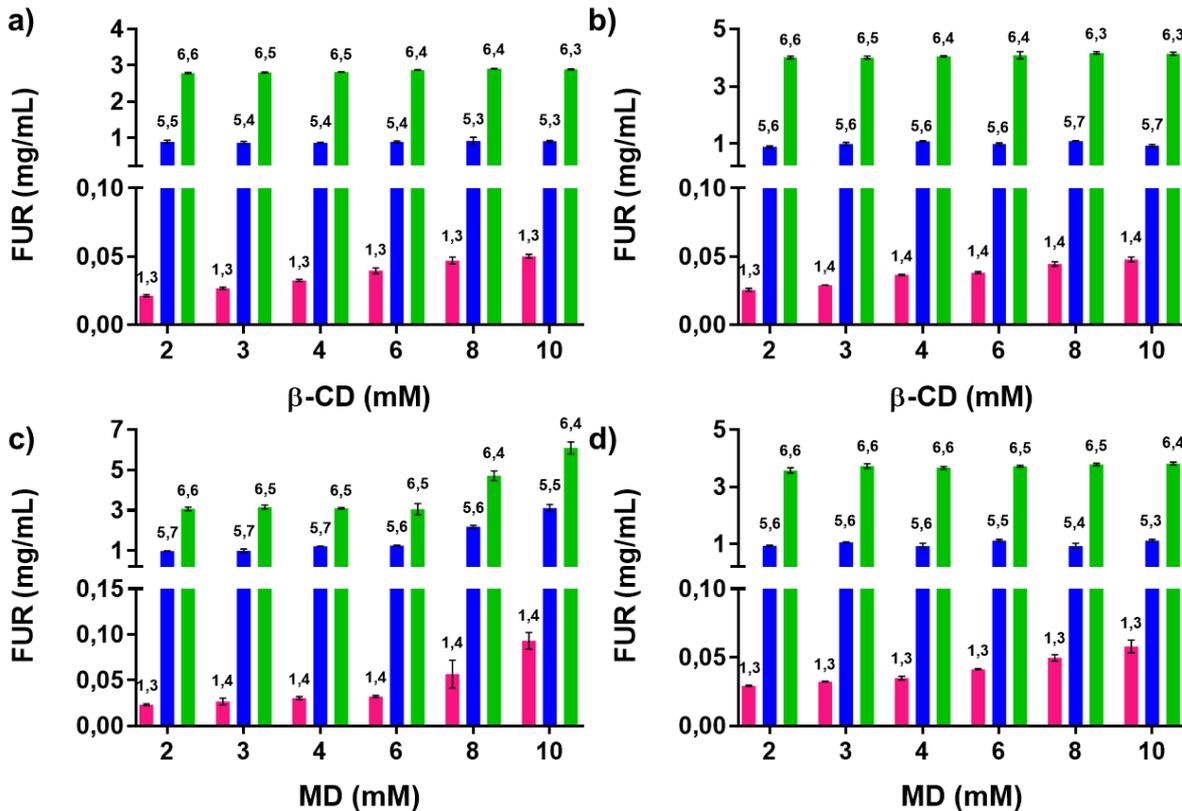


Figura 2.19. Valor de pH de las soluciones (indicado arriba de cada barra) e incremento en la solubilidad de FUR (expresada en mg/mL) en FGS (fucsia), agua (azul) y PBS (verde) en función de TEA(3 mM): β -CD(2-10 mM) (a), ARG(3 mM): β -CD(2-10 mM) (b), TEA(3 mM):MD(2-10 mM) (c) y ARG(3 mM):MD(2-10 mM) (d).

A partir de la pendiente de los diagramas de solubilidad se determina que la estequiometría de los sistemas FUR: β -CD y FUR:MD es 1:1 en FGS cuando se agregan concentraciones fijas de los ligandos básicos, originándose sistemas ternarios de estequiometría 1:1:1.

En la tabla 2.7 se puede apreciar que los valores de K_{CT} para los sistemas ternarios en FGS son similares al valor de K_C del sistema binario con β -CD pero inferiores al del sistema con MD (Tabla 2.5). Esto sustenta los resultados previos y confirma que los ligandos básicos desfavorecen la formación de un sistema soluble entre FUR y MD en FGS ya que compiten

con el fármaco por la cavidad de la hélice de MD. En agua, la interacción de los oligosacáridos con FUR es menor en los sistemas ternarios debido a que el incremento de solubilidad está dado, principalmente, por los ligandos básicos. El valor alto de K_{CT} del sistema FUR:TEA:MD en PBS sugiere una interacción fuerte entre los componentes a altas concentraciones de MD, reforzando los resultados descriptos anteriormente.

Tabla 2.7. Valores de solubilidad intrínseca (S_{0L}), solubilidad máxima ($S_{máx}$), constantes de formación (K_{CT}) e incrementos de solubilidad ($S_{máx}/S_{0L}$) para los sistemas ternarios con concentraciones fijas de los oligosacáridos obtenidos a partir de los análisis de solubilidad de fases.

		Agua	FGS	PBS
FUR:TEA*	S_{0L} (mg/mL)	0,874 ± 0,004	0,017 ± 0,002	3,15 ± 0,09
FUR:TEA*:β-CD	$S_{máx}$ (mg/mL)	0,91 ± 0,02	0,050 ± 0,003	2,98 ± 0,02
	K_{CT} (M ⁻¹)	-	163 ± 6	-
	$S_{máx}/S_{0L}$	1	2,9	0,9
FUR:TEA*:MD	$S_{máx}$ (mg/mL)	2,14 ± 0,03	0,094 ± 0,004	6,0 ± 0,2
	K_{CT} (M ⁻¹)	135 ± 11	77 ± 2	14819 ± 89
	$S_{máx}/S_{0L}$	2,4	5,5	1,9
FURARG*	S_{0L} (mg/mL)	0,93 ± 0,01	0,017 ± 0,003	3,7 ± 0,1
FUR:ARG*:β-CD	$S_{máx}$ (mg/mL)	0,93 ± 0,02	0,049 ± 0,003	4,1 ± 0,2
	K_{CT} (M ⁻¹)	-	137 ± 8	-
	$S_{máx}/S_{0L}$	1	2,9	1,1
FUR:ARG*:MD	$S_{máx}$ (mg/mL)	1,1 ± 0,1	0,058 ± 0,003	3,8 ± 0,1
	K_{CT} (M ⁻¹)	-	194 ± 14	-
	$S_{máx}/S_{0L}$	1,2	3,4	1

* Ligando a concentración fija

El comportamiento de la solubilidad del IFA en los sistemas ternarios es muy similar al comportamiento de los sistemas binarios correspondientes (es decir al del componente que aumenta la concentración). En FGS (donde el 99,9% FUR se encuentra en forma neutra) los oligosacáridos favorecen la solubilidad de FUR mientras que las bases no ejercen un efecto marcado sobre ésta. Por el contrario, tanto en agua como en PBS (donde el fármaco se encuentra ionizado como FUR⁻) el comportamiento de la solubilidad es principalmente debido al efecto de los ligandos básicos.

La ventaja que confiere la formación de sistemas multicomponentes FUR:BASE:OLIGOSACÁRIDO sobre los sistemas binarios FUR:BASE radica en la capacidad de los oligosacáridos para incrementar la solubilidad del fármaco en FGS. Este atributo es de

gran importancia ya que FUR es absorbida principalmente en estómago e intestino delgado superior por lo que cuando es administrada por vía oral se requiere alta solubilidad en fluido gástrico o intestinal para poder llegar al sitio de acción y ejercer el efecto terapéutico deseado^{vi}.

CLASIFICACION DE LOS SISTEMAS DE FUR DE ACUERDO AL SCB

Con el objetivo de clasificar a los sistemas como de alta/baja solubilidad se calculó el volumen necesario para solubilizar la máxima dosis terapéutica de FUR (80 mg) a partir de los valores de solubilidad en agua, FGS y PBS obtenidos de los análisis realizados.

Tabla 2.8. Solubilidad y volumen necesario para solubilizar 80 mg de FUR libre y en los sistemas.

SISTEMA	S (mg/mL)			Volumen necesario (mL)		
	Agua	FGS	PBS	Agua	FGS	PBS
FUR	0,047	0,0158	2,122	1702	5063	37,7
FUR:TEA	4,3	0,017	7,26	18,6	4706	11
FUR:ARG	5,28	0,017	9,38	15,2	4706	8,5
FUR:β-CD	0,075	0,052	2,17	1067	1538	36,9
FUR:MD	0,184	0,098	2,19	435	816	36,5
FUR:TEA:β-CD*	4,3	0,031	6,08	18,6	2580	13,2
FUR:TEA:MD*	4,5	0,038	8,1	17,8	2105	9,9
FUR:ARG:β-CD*	6,3	0,031	10,19	12,7	2580	7,9
FUR:ARG:MD*	6,3	0,039	7,5	12,7	2051	10,7
FUR:TEA*:β-CD	0,91	0,050	2,98	87,9	1600	26,8
FUR:TEA*:MD	2,14	0,094	6,0	37,4	851	13,3
FUR:ARG*:β-CD	0,93	0,049	4,1	86	1633	19,5
FUR:ARG*:MD	1,1	0,058	3,8	72,7	1379	21

* Ligando a concentración fija

FUR es considerado un IFA de **solubilidad baja** dado que el volumen necesario para solubilizar su mayor dosis terapéutica es 5063 mL en FGS y 1702 mL en agua. El volumen necesario para solubilizar 80 mg de FUR en PBS es de 37,7 mL debido a que el IFA se encuentra completamente ionizado en este medio.

En FGS, el volumen necesario para solubilizar al fármaco contenido en todos los sistemas, tanto binarios como ternarios, es menor al volumen requerido para solubilizar a FUR libre,

^{vi} Una buena solubilidad en FGS confiere al IFA la capacidad de ser fácilmente disuelto en estómago posibilitando la posterior absorción de éste hacia la sangre desde donde llega al sitio de acción.

aunque mayor a 250 mL. Para solubilizar 80 mg de FUR en agua en todos los sistemas ternarios y en los sistemas binarios FUR:TEA y FUR:ARG, el volumen requerido es menor a 250 mL, por lo tanto estos sistemas se consideran **altamente solubles** en agua.

CONCLUSIONES PARCIALES

A partir de los resultados presentados en este capítulo se puede concluir que es posible obtener sistemas binarios y ternarios en solución entre los fármacos estudiados (SMZ y FUR) y diferentes ligandos. Los mejores resultados de solubilización se obtienen cuando los IFAs se encuentran como especies ionizadas.

SULFAMETOXAZOL

Luego de evaluar el efecto de 10 AA en la solubilidad de SMZ se obtuvieron sistemas binarios SMZ:AA de estequiometría 1:1 con HIS y ARG. Ambos sistemas binarios mantienen constante la solubilidad del fármaco en FGS debido a que no se produce interacción entre los componentes ya que el IFA se encuentra parcialmente ionizado como SMZ⁺ y los AA completamente ionizados como HIS⁺⁺ y ARG⁺⁺. Por el contrario, la solubilidad de SMZ incrementa en agua (cuando los componentes se encuentran ionizados como SMZ⁻, HIS⁺ y ARG⁺) y en PBS (cuando se encuentran ionizados como SMZ⁻, HIS⁺ y ARG⁺) confirmando que la interacción entre SMZ y los AA en solución es de tipo iónica. Se determinó que el efecto obtenido con ARG es superior ya que al combinar SMZ con ARG el sistema se transforma en **altamente soluble** en agua y PBS.

FUROSEMIDA

Se obtuvieron sistemas binarios de estequiometría 1:1 entre FUR y los diferentes ligandos: β -CD, MD, TEA y ARG. Los sistemas FUR:OLIGOSACÁRIDO sólo modifican levemente la solubilidad del IFA en agua pero la incrementan en FGS. Los sistemas FUR:TEA y FUR:ARG aumentan notablemente la solubilidad del fármaco tanto en agua como en PBS. Este comportamiento evidencia interacción de tipo iónica entre FUR y TEA o ARG, y la interacción no covalente con los oligosacáridos favorecida con la especie neutra de FUR.

El estudio del efecto de la formación de sistemas multicomponentes en la solubilidad de FUR demuestra que los sistemas FUR:BASE:OLIGOSACÁRIDO adicionan, respecto de los sistemas binarios FUR:TEA y FUR:ARG, la capacidad de solubilizar al fármaco en FGS y por

lo tanto podrían facilitar la disolución del IFA en el estómago favoreciendo así su llegada al sitio de acción. Los estudios de disolución empleando FGS se describirán en el capítulo 4.

CAPÍTULO 3: ESTUDIOS EN ESTADO SÓLIDO

ESTUDIOS EN ESTADO SÓLIDO

CONSIDERACIONES GENERALES

La mayoría de los medicamentos que son administrados por vía oral lo hacen en formas farmacéuticas sólidas debido a que, generalmente, el principio activo es más estable en estado sólido que en solución acuosa. Además, las formas sólidas presentan una mejor precisión en la dosis, mayor aceptación por parte de los pacientes y un tiempo de vida media más largo con respecto a las formas líquidas o semisólidas.² Estas propiedades dan como resultado una mayor seguridad y fiabilidad en el tratamiento farmacológico. Sin embargo, optimizar la biodisponibilidad oral de los IFAs sólidos es un gran desafío para el sector farmacéutico debido a los problemas de solubilidad, disolución, permeabilidad y estabilidad.

Frente a esta problemática, se han descrito numerosas estrategias para mejorar las propiedades desfavorables de los IFAs, como por ejemplo la formación de complejos, sales, cocrystalos, coamorfos, entre otras.^{56,105} No obstante, la mezcla de un IFA con un ligando en solución, en suspensión o en estado sólido no garantiza la formación de un nuevo sistema farmacéutico. Muchos compuestos son capaces de formar sistemas en solución, pero no lo hacen en estado sólido y el producto sólido aislado puede ser sólo una mezcla de los diferentes compuestos sin interactuar. Este comportamiento se debe a que en solución existe un equilibrio dinámico entre las moléculas, mientras que los sistemas sólidos son estáticos.¹⁰²

Como se describió en el capítulo 1, los IFAs sólidos y los sistemas derivados de éstos pueden encontrarse en estado amorfo o cristalino presentando generalmente mejores perfiles de disolución los sólidos amorfos y mayor estabilidad los sólidos cristalinos. Sumado a esto se conoce que una gran cantidad de IFAs existe en más de un polimorfo, cada uno de los cuales posee diferentes propiedades fisicoquímicas y mecánicas como solubilidad, disolución, punto de fusión, entre otras. En muchos casos, los distintos polimorfos de un IFA pueden mostrar gran diferencia en la eficacia terapéutica pudiendo ser completamente ineficientes para el tratamiento de una enfermedad o tóxicos para el paciente.⁵³

A partir de estos antecedentes y de los resultados obtenidos en solución, capítulo 2, resulta fundamental diseñar, preparar y evaluar en estado sólido los sistemas obtenidos previamente en solución. Para ello se combinaron SMZ o FUR con los ligandos que resultaron promisorios utilizando diversas técnicas de preparación. Las muestras sólidas obtenidas fueron evaluadas con el fin de determinar si existen interacciones entre los componentes que evidencien la formación de sistemas supramoleculares en estado sólido, identificar el tipo de

interacciones, determinar las características fisicoquímicas que éstos presentan y evaluar la estabilidad del polimorfo de interés en los sistemas desarrollados.

PREPARACIÓN DE SISTEMAS EN ESTADO SÓLIDO

Las muestras en estado sólido pueden obtenerse empleando diversas técnicas de preparación como molienda asistida por solvente, coprecipitación, coevaporación, liofilización, atomización, evaporación lenta, entre otras.^{7,106} Generalmente, dependiendo del método de obtención, los sistemas presentan características fisicoquímicas diferentes. A continuación, se detallan los métodos que fueron utilizados en el desarrollo de la presente tesis doctoral.

MOLIENDA ASISTIDA POR SOLVENTE

La molienda asistida por solvente (MAS) es un método que utiliza solvente, generalmente agua o mezclas hidroalcohólicas en cantidad suficiente para humedecer la mezcla obtenida entre el IFA y el/los ligando/s.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Entre las ventajas que presenta se encuentra el fácil escalado a nivel industrial y el alto rendimiento o porcentaje de recuperación que suele obtenerse (entre 92 y 98%).

LIOFILIZACIÓN

La liofilización (LF) es un proceso que permite separar un solvente, generalmente agua, de una solución sin pasar por el estado líquido. El proceso implica la congelación de la solución y posterior sublimación del solvente a presión reducida. Frecuentemente se obtienen polvos secos y amorfos. Las principales desventajas incluyen el largo tiempo de manipulación y procesamiento, y que los compuestos volátiles pueden ser eliminados durante el proceso de liofilización, sin embargo, los sistemas obtenidos presentan un alto rendimiento y un bajo estrés térmico.¹¹⁰

EVAPORACIÓN LENTA

La evaporación lenta (EL) consiste en preparar una solución en un solvente determinado, generalmente solventes orgánicos volátiles, y posteriormente permitir que el solvente pase gradualmente a estado gaseoso a temperatura ambiente. La principal desventaja de la técnica es el largo tiempo del proceso de evaporación y la poca cantidad de muestra obtenida. Una desventaja adicional para el área farmacéutica es la posibilidad de encontrar restos de solvente orgánico en la muestra sólida obtenida.¹⁰⁷

MEZCLA FÍSICA

La mezcla física (MF) es simplemente la combinación del IFA con el/los ligandos sin adición de solvente. El sólido obtenido mediante esta técnica permite determinar, por comparación de propiedades, si en los sólidos obtenidos por los métodos descritos anteriormente existe interacción entre los componentes, ya que se considera que el simple mezclado de los componentes en seco no produce interacción alguna.^{107,109}

CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS EN ESTADO SÓLIDO

Para caracterizar las diferentes formas sólidas de un IFA o para determinar si se producen interacciones entre los componentes de un sistema supramolecular sólido, el tipo de asociación que se encuentra presente y las características cristalinas, se emplean diferentes técnicas de caracterización. A continuación, se explicitan las técnicas que fueron utilizadas para caracterizar a los componentes puros y los sólidos obtenidos en la presente tesis doctoral.

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

La espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) es un método útil para la caracterización física de sólidos ya que esta técnica permite deducir información estructural basándose en los modos de vibración de las moléculas. Permite identificar si se producen modificaciones en las bandas correspondientes a los grupos funcionales de las moléculas involucradas en la interacción de un sistema supramolecular. Sin embargo, cuando las interacciones presentes en la formación de un sistema son débiles, pueden no haber cambios de las bandas que participan en la interacción o ser poco significativas.¹¹¹

Algunas de las ventajas de este método incluyen la facilidad con la que se preparan las muestras y el acotado tiempo de adquisición de los espectros.¹¹²

ESPECTROSCOPIA RAMAN

La espectroscopia Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona información estructural de casi cualquier sólido permitiendo su identificación. Es de gran importancia farmacéutica dado que los IFAs son generalmente más polarizables y dan bandas más fuertes que los excipientes. Esta técnica ha sido utilizada ampliamente en muchos estudios de polimorfos, cocristales, sales y solvatos que implican su identificación, caracterización estructural y transformaciones de fase.⁵³

Se hace incidir un haz de luz monocromático sobre un material y, como respuesta, una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independientes de la frecuencia de la luz incidente.¹¹³

Como ventajas, se puede mencionar que la muestra a analizar no requiere ningún tipo de preparación. El análisis se considera no destructivo, pero la irradiación prolongada con láser UV o Vis puede provocar la fotodescomposición en algunas muestras. Además, es uno de los métodos analíticos más potentes de los existentes en la actualidad.⁵³

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO

La resonancia magnética nuclear de estado sólido (RMNss) es la rama de la espectroscopia que sensa la interacción de los espines nucleares con un campo magnético estático. Las transiciones son inducidas por un campo de radiofrecuencia que oscila a la frecuencia de Larmor del núcleo estudiado. La absorción de radiación por la muestra resulta de la interacción de dicha radiación con el momento magnético de un núcleo en la muestra y ocurre a diferentes frecuencias para núcleos en entornos químicamente diferentes dentro de una molécula.¹¹⁴ Aunque cualquier núcleo que puede ser estudiado en solución también puede ser estudiado en estado sólido, la mayor parte de los trabajos se han centrado en estudios de ¹³C debido a que los espectros de ¹H son difíciles de medir en estado sólido y los datos se obtienen con una resolución baja. En muchos casos, los espectros obtenidos en estado sólido son similares a los registrados en solución, pero suelen contener una gama más amplia de información. La capacidad de esta técnica para determinar la formación de un nuevo sistema requiere que los núcleos individuales existan en entornos magnéticos no equivalentes cuando los componentes se encuentran en forma libre y complejada.^{53,111}

La principal desventaja que presenta es el alto costo del equipamiento necesario para implementarla y la gran cantidad de muestra requerida. Mientras que entre las ventajas del método se incluyen que es una técnica no destructiva, no invasiva, multinuclear y que permite evaluar el entorno local molecular del sólido. La sensibilidad de esta técnica para distinguir claramente núcleos en diferentes entornos moleculares la convierte en una excelente opción para la identificación de nuevos sistemas en el área de la química farmacéutica.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La microscopia electrónica de barrido (SEM, de sus siglas en inglés "*Scanning Electron Microscopy*") es útil para el estudio de la morfología y el tamaño de las partículas ya que permite obtener imágenes de alta resolución de la superficie de las muestras. Un rayo de

electrones de alta energía escanea la superficie de una muestra generalmente recubierta con una película delgada de oro o platino para mejorar el contraste y la relación señal/ruido. A medida que el haz explora la superficie de la muestra, las interacciones entre la muestra y el haz de electrones dan como resultado diferentes tipos de señales de electrones las cuales se recogen, procesan y se traducen como píxeles para formar una imagen de la topografía de la superficie de la muestra.¹¹⁵

La principal ventaja es que los análisis pueden realizarse a grandes niveles de magnificación permitiendo observar detalles en la superficie de los materiales. Es muy utilizada en el área farmacéutica para controlar la calidad de los IFAs y de los medicamentos.¹¹¹

ANÁLISIS TÉRMICO

El análisis térmico comprende un grupo de técnicas en las que se mide una propiedad física de una sustancia o sistema en función de la temperatura o del tiempo mientras se la somete a un programa de temperatura controlado (calentar o enfriar a una determinada velocidad, o mantener la temperatura constante, o una combinación de ambas). Se pueden examinar procesos de naturaleza endotérmica (fusión, ebullición, sublimación, vaporización, desolvatación, transiciones de fase sólido-sólido, degradación química, etc.) o exotérmica (cristalización, descomposición oxidativa, etc.).¹¹¹

El uso simultáneo de múltiples técnicas aumenta el poder del análisis y la instrumentación moderna ha permitido un amplio crecimiento de la aplicación.¹¹⁶ Los métodos más utilizados en el área farmacéutica son la calorimetría diferencial de barrido y la termogravimetría. En el estudio del efecto de la temperatura sobre sólidos es ventajoso el empleo de técnicas combinadas.¹¹¹

CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

La finalidad de la calorimetría diferencial de barrido (DSC, de sus siglas en inglés "*Differential Scanning Calorimetry*") es registrar la diferencia en el cambio de entalpía que tiene lugar entre la muestra y un material inerte de referencia en función de la temperatura o del tiempo, cuando ambos están sometidos a un programa controlado de temperatura. La DSC permite el estudio de aquellos procesos en los que se produce una variación entálpica, como puede ser la determinación de calores específicos, puntos de ebullición y cristalización, pureza de compuestos cristalinos, entre otros. En un perfil de DSC, los procesos que ocurren se manifiestan por una desviación de una línea de base, las señales positivas y negativas indican eventos exotérmicos y endotérmicos, respectivamente. Además, el área bajo la curva

es directamente proporcional al calor absorbido (proceso endotérmico) o emitido (proceso exotérmico) por la muestra durante el evento térmico y su integración proporciona el calor de reacción. Las interacciones involucradas en la formación de los sistemas sólidos pueden deducirse mediante los cambios en los eventos térmicos de la muestra al compararlos con los eventos de los compuestos puros.

Las ventajas de la técnica incluyen que sólo se requiere una cantidad microscópica de muestra la cual no necesita ninguna preparación, el equipo es simple de operar y los estudios cuantitativos o cualitativos se realizan fácilmente.¹¹⁷

TERMOGRAVIMETRÍA

La termogravimetría (TG) o análisis termogravimétrico detalla la variación de la masa de una muestra cuando se la somete a un cambio de temperatura en una atmósfera controlada. Es un método muy utilizado para estudiar los procesos de desolvatación y descomposición.¹¹¹ La curva de TG indica la temperatura a la cual comienza y finaliza un cambio de masa y la cantidad de masa perdida a una dada temperatura. Dicha medición proporciona información sobre la estabilidad térmica del material y el análisis de la composición (por ejemplo, contenido de humedad de los materiales).¹¹⁷

Esta técnica se puede usar para determinar el contenido de humedad relacionado con la pérdida de peso en estudios de estabilidad isotérmicos o no isotérmicos. Además, es la técnica apropiada para la diferenciación de polimorfos de hidratos, o la identificación de monohidratos entre otros hidratos.¹¹⁷

La TG generalmente se usa en conjunto con la DSC debido a que la información que se obtiene de cada una de ellas sobre el comportamiento térmico de la muestra es complementaria.

DIFRACTOMETRÍA DE RAYOS X DE POLVOS

La Difracción de Rayos X de Polvo (DRXP) es una técnica analítica utilizada principalmente para la identificación de fases de un material cristalino y puede proporcionar información sobre las dimensiones de las celdas unitarias. Se basa en la interacción de la estructura de un sólido con una fuente de rayos X. La interacción de los rayos incidentes con la muestra produce interferencia constructiva, y un rayo difractado, cuando las condiciones satisfacen la Ley de Bragg ($n\lambda = 2d \sin\theta$). Esta ley relaciona la longitud de onda de la radiación electromagnética con el ángulo de difracción y el espaciamiento reticular en una muestra cristalina. Estos rayos X difractados son luego detectados, procesados y contados. Al escanear la muestra a través de un rango de ángulos de 2θ , todas las posibles direcciones de

difracción del enrejado se deben alcanzar debido a la orientación aleatoria del material en polvo. La conversión de los picos de difracción a d -espaciamentos permite la identificación de la muestra porque cada una de ellas tiene un conjunto de espaciamentos d únicos.¹¹⁸

Algunas de las aplicaciones más interesantes de esta técnica en el área farmacéutica son la identificación de las diferentes fases cristalinas presentes en una muestra, detección de polimorfos, cálculo del porcentaje de cristalinidad, cálculo del contenido en material amorfo, entre otros. Las diferencias entre los difractogramas de los compuestos puros y de los sistemas, como puede ser la aparición o desaparición de señales, o el cambio en la intensidad relativa de éstas, sugieren la formación de nuevos sistemas supramoleculares.¹¹¹

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Se utilizaron los siguientes productos de origen comercial: KBr (Merk®, USA). El resto de los materiales utilizados fueron descritos en el capítulo “Estudios en Solución”.

INSTRUMENTAL Y DESARROLLO EXPERIMENTAL

La balanza, el sonicador y el vortex utilizados fueron descritos en el capítulo “Estudios en Solución”.

OBTENCIÓN DE POLIMORFOS

Para la obtención del polimorfo II de FUR (FURII) se disolvió completamente FUR comercial en acetona con agitación constante durante 60 min. A continuación, se realizó evaporación rápida en evaporador rotatorio a 25 °C. El sólido obtenido se secó al vacío, a temperatura ambiente y protegido de la luz, durante 48 h.

PREPARACIÓN DE SISTEMAS EN ESTADO SÓLIDO

En la mayoría de los sólidos obtenidos la relación es 1:1 o 1:1:1 por lo que, cuando se describa el sistema, sólo se indicará cuando dicha relación varíe.

MOLIENDA ASISTIDA POR SOLVENTE

Se prepararon los sistemas binarios de SMZ con HIS y ARG (SH_{MAS} y SA_{MAS} , respectivamente), los sistemas binarios de FUR con β -CD (FC_{MAS}), MD (FM_{MAS}), TEA (FT_{MAS})

y ARG (en relación 1:1 y 1:2 de FUR y ARG, respectivamente: FA_{MAS} y FA^2_{MAS}) y los sistemas ternarios de FUR con TEA y β -CD (FTC_{MAS}), TEA y MD (FTM_{MAS}), ARG y β -CD (FAC_{MAS}) y ARG y MD (FAM_{MAS}).

Se pesaron cantidades apropiadas de los diferentes componentes y se colocaron en un mortero. Se añadió agua como solvente a la mezcla de polvos en una relación de 0,25 μ L por mg de sólido. La suspensión resultante se malaxó durante 60 min y el polvo recolectado se secó durante 48 h al vacío a temperatura ambiente y protegido de la luz.

LIOFILIZADO

Para obtener los sistemas liofilizados de SMZ con HIS o ARG (SH_{LF} y SA_{LF} , respectivamente) se pesaron cantidades adecuadas de los componentes y se disolvieron completamente en agua. Las soluciones fueron filtradas y las muestras resultantes se congelaron a -40 °C durante 24 h antes de comenzar el proceso de liofilización llevado a cabo en un liofilizador Freeze Dry Labconco Corp. (Kansas City, MI, USA).

EVAPORACIÓN LENTA

Se pesaron cantidades apropiadas de FUR y TEA y se disolvieron en acetona ($FT^{A_{EL}}$) o metanol ($FT^{M_{EL}}$). Estas soluciones se transfirieron a cristalizadores, se protegieron de la luz y se dejaron a temperatura ambiente hasta observar la completa evaporación del solvente.

MEZCLA FÍSICA

Las muestras se prepararon simplemente mezclando durante 5 min los componentes correspondientes en un mortero sin agregado de solvente. Debido a que TEA es un líquido viscoso, fue necesario secar las MF obtenidas con este componente durante 48 h al vacío a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Las MF obtenidas fueron: SH_{MF} , SA_{MF} , FC_{MF} , FM_{MF} , FT_{MF} , FA_{MF} , FA^2_{MF} , FTC_{MF} , FTM_{MF} , FAC_{MF} y FAM_{MF} .

CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS EN ESTADO SÓLIDO

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Los espectros FT-IR de SMZ, FUR, FURII, los ligandos y todos los sistemas sólidos se adquirieron en la Facultad de Ciencias Químicas (UNC). Se midieron en un espectrómetro Nicolet® Avatar 360 FT-IR, con una resolución de 2 nm, a partir de pastillas de KBr. Las muestras se prepararon utilizando una prensa hidráulica manual Delfabro® (Argentina). Los cambios en las señales pertenecientes a los grupos funcionales más representativos en cada

molécula fueron analizados para inferir el modo de interacción entre los IFA y los ligandos. Los espectros de las muestras se obtuvieron y procesaron utilizando el programa OMNIC®.

ESPECTROSCOPIA RAMAN

Los espectros de las materias primas y los sistemas binarios y ternarios se obtuvieron en el Departamento de Física de la Universidad Federal de Ceará (Fortaleza, Brasil) utilizando un espectrómetro LabRAM HR (Horiba®) equipado con un detector de CCD refrigerado con N₂ líquido. Un láser de infrarrojo cercano (785 nm) fue utilizado para la excitación. Todos los espectros se procesaron utilizando el programa NGS LabSpec®.

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO

Los espectros de alta resolución de ¹³C en sólidos se adquirieron en la Facultad de Matemática, Astronomía y Física (FaMAF, UNC) a temperatura ambiente utilizando un equipo Bruker Avance II-300, equipado con una sonda MAS de 4mm, utilizando una secuencia CP-MAS (de sus siglas en inglés, “*cross polarization/magic angle spinning*”), con desacoplamiento de protones durante la adquisición, operando a 300.13 MHz para protones. La frecuencia de funcionamiento para carbonos fue de 75,46 MHz. Se utilizó glicina como referencia externa para los espectros de ¹³C y para establecer las condiciones Hartman-Hahn en los experimentos de polarización cruzada. Se registraron diferentes números de barridos en el rango de 1200-2000 para cada compuesto a fin de obtener una adecuada relación señal/ruido. El tiempo de contacto fue de 1,5 ms. Todos los espectros se procesaron utilizando el programa MestReNova®.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las estructuras morfológicas de las materias primas y las muestras sólidas se investigaron y fotografiaron utilizando un microscopio electrónico de barrido Carl Zeiss Sigma del Laboratorio de Microscopía y Análisis por Rayos X (LAMARX). Las muestras se fijaron en un trozo de metal usando cinta adhesiva de aluminio de doble cara. Para mejorar la conductividad se recubrieron bajo vacío con una delgada capa de oro por pulverización catódica empleando un recubridor Quorum 150. La magnificación seleccionada fue suficiente para apreciar en detalle la morfología general de las muestras en estudio.

ANÁLISIS TÉRMICO

Las curvas TG de SMZ, HIS, ARG y los sistemas obtenidos se registraron en la Facultad de Ciencias Químicas (UNC) comenzando a temperatura ambiente hasta 350 °C con una

velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Las muestras de entre 3 y 5 mg se colocaron en canastillas de platino. Los perfiles DSC de SMZ, HIS, ARG y de los sistemas desarrollados se obtuvieron comenzando a temperatura ambiente y finalizando a la temperatura donde se registra el 10% de pérdida de masa en las curvas TG con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min utilizando cápsulas de aluminio herméticas conteniendo entre 0,5 y 1 mg de muestra. Tanto los TG como los DSC se realizaron utilizando un equipo TA Instrument, modelo Discovery; durante los experimentos, los sensores y las cápsulas estuvieron bajo un flujo constante de N₂ (50 ml/min). Todos los perfiles se obtuvieron y procesaron utilizando el programa TRIOS®.

Las curvas TG y DSC de FUR y de todos los sistemas sólidos obtenidos a partir de dicho IFA se adquirieron simultáneamente en el Departamento de Física de la Universidad Federal de Ceará (Fortaleza, Brasil) utilizando un equipo Jupiter STA 449 (Netzsch®, Alemania). Las mediciones se obtuvieron comenzando a temperatura ambiente hasta 450 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y utilizando cápsulas de aluminio herméticas perforadas conteniendo 5 mg de muestra. Durante el experimento, los sensores y las cápsulas estuvieron bajo un flujo constante de N₂ (70 ml/min). Todas las curvas se obtuvieron y procesaron utilizando el programa NETZSCH Proteus Thermal Analysis®.

DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO

Los patrones de difracción de SMZ y de sus sistemas supramoleculares se obtuvieron en la Facultad de Ciencias Químicas (UNC) utilizando un equipo PANalytical X Pert PRO. El voltaje y la corriente eléctrica aplicada fueron 40 kV y 40 mA, respectivamente. El ancho de ranura utilizado para el haz incidente en la muestra fue de 0,6 mm. Las muestras se escanearon en un rango de 2θ entre 4° y 35° en un modo de escaneo por pasos (tamaño de paso de 0,026 y 29 seg) y bajo condiciones ambientales de temperatura.

Por otra parte, los difractogramas de FUR y de todos los sistemas sólidos obtenidos a partir de dicho IFA se registraron en el Departamento de Física de la Universidad Federal de Ceará (Fortaleza, Brasil) utilizando un difractómetro D8 Advanced (Bruker AXS®), utilizando una fuente de radiación Cu K α (0,15419 nm) y un detector LynxEye. El voltaje y la corriente eléctrica aplicada fueron 40 kV y 40 mA, respectivamente. El ancho de ranura utilizado, para el haz incidente en la muestra, fue de 0,6 mm. Las muestras se escanearon en un rango de 2θ entre 5° y 40° en un modo de escaneo por pasos (tamaño de paso de 0,01 y 5 seg) y a temperatura ambiente.

Todos los difractogramas se procesaron utilizando el programa X'Pert HighScore®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SULFAMETOXAZOL

SELECCIÓN DEL MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS SÓLIDOS

Los sistemas se obtuvieron utilizando las técnicas de MAS y LF empleando agua como solvente en ambos casos. Se seleccionaron estos métodos de preparación debido a que permiten su utilización tanto a nivel laboratorio como a escala industrial. Además, con ambos procedimientos el rendimiento obtenido es alto y son técnicas de fácil reproducción. Las muestras obtenidas de SMZ (S) con HIS (H) o ARG (A) fueron: SH_{MAS}, SH_{LF}, SA_{MAS} y SA_{LF}.

El sistema binario entre SMZ y ARG obtenido por MAS (SA_{MAS}) resultó en una masa compacta sin utilidad desde el punto de vista farmacéutico por lo que no se continuó con su estudio.

CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS SÓLIDOS

Con el objetivo de confirmar la existencia de interacciones entre los componentes, los sistemas sólidos obtenidos se compararon con los componentes puros y con las MF (SH_{MF} y SA_{MF}).

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

El espectro FT-IR de SMZ (Figura 3.1) se caracteriza por poseer bandas a 3468 y 3377 cm⁻¹ (pertenecientes al grupo -NH₂), a 3300 y 3240 cm⁻¹ (-NH), a 3144 cm⁻¹ (-CH), a 1618 cm⁻¹ (combinación del grupo -NH₂ y del grupo -CN del anillo isoxazol), a 1503 cm⁻¹ (-CC del anillo benceno), a 1363 cm⁻¹ (anillo isoxazol), a 1307 y 1144 cm⁻¹ (-SO₂), 926 cm⁻¹ (-SN), 883 cm⁻¹ (-CH del anillo isoxazol) y 832 cm⁻¹ (-CH del anillo benceno).

Las modificaciones experimentadas por estas bandas pueden utilizarse para establecer si hay interacciones intermoleculares en las que están involucrados dichos grupos al interactuar con los AA.

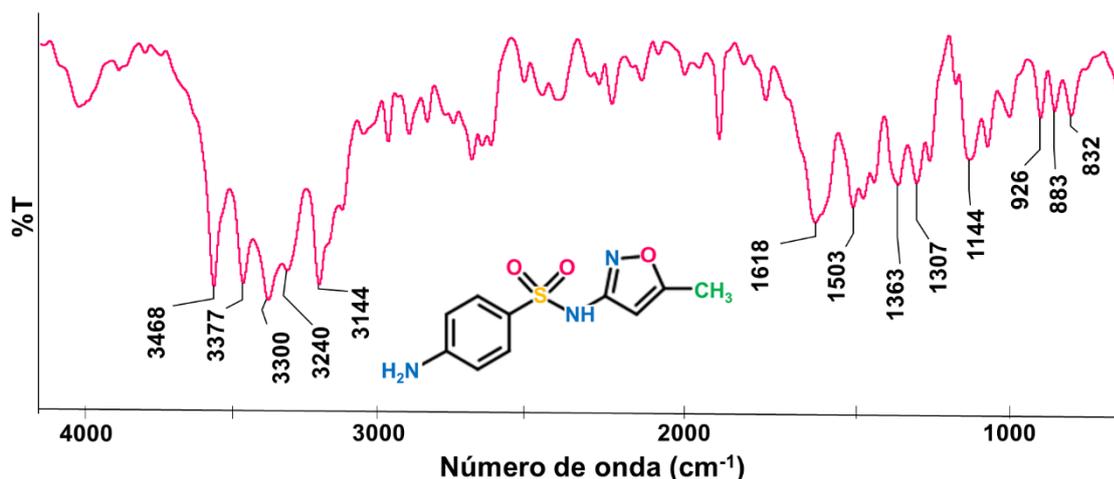


Figura 3.1. Asignación de señales en el espectro FT-IR de SMZ.

El espectro de SH_{MF} (Figura 3.2a) consiste en la superposición de los espectros de los componentes puros, donde aparecen principalmente las bandas de absorción de los grupos de SMZ sin modificaciones, sugiriendo que no se producen interacciones a partir de esta técnica de preparación entre SMZ e HIS. Por el contrario, los espectros obtenidos para los sistemas preparados por MAS y LF muestran diferencias notorias respecto al espectro de SMZ puro.

Al analizar el espectro de SH_{MAS} se observan pequeños corrimientos en una de las bandas correspondientes al grupo $-NH_2$ (de 1618 cm^{-1} a 1614 cm^{-1}), en la banda originada por el enlace $-SN$ de 926 cm^{-1} a 930 cm^{-1} y en bandas del grupo isoxazol de 1363 cm^{-1} a 1371 cm^{-1} y de 883 cm^{-1} a 878 cm^{-1} . Un cambio importante se observa en la banda del grupo $-CH$ que muestra ensanchamiento y corrimiento a frecuencias menores. No obstante, el cambio más contundente se observa en las bandas que corresponden al grupo $-NH$ ya que aparece sólo una banda a 3201 cm^{-1} mientras que en SMZ puro aparecen dos señales (3300 y 3240 cm^{-1}); esta modificación espectral sugiere la pérdida del protón de la amida y la ionización de SMZ formándose el ion SMZ^- .

En el espectro de SH_{LF} se observan pequeños corrimientos en las bandas correspondientes al grupo $-SO_2$ (de 1307 cm^{-1} a 1311 cm^{-1} y de 1144 cm^{-1} a 1148 cm^{-1}) y en bandas asociadas al grupo fenilo de 1503 cm^{-1} a 1499 cm^{-1} y de 832 cm^{-1} a 835 cm^{-1} . Al igual que en el espectro de SH_{MAS} , en el espectro de SH_{LF} se observa ensanchamiento y corrimiento a frecuencias menores en la banda del grupo $-CH$ y cambio en la frecuencia de las bandas asociadas al grupo $-NH_2$ de 3377 cm^{-1} a 3396 cm^{-1} y de 1618 cm^{-1} a 1633 cm^{-1} . En este caso, el cambio más importante también se origina en las bandas correspondientes al grupo $-NH$ debido a la aparición de una única banda a 3207 cm^{-1} sugiriendo la pérdida del protón de la amida y la formación del ion SMZ^- .

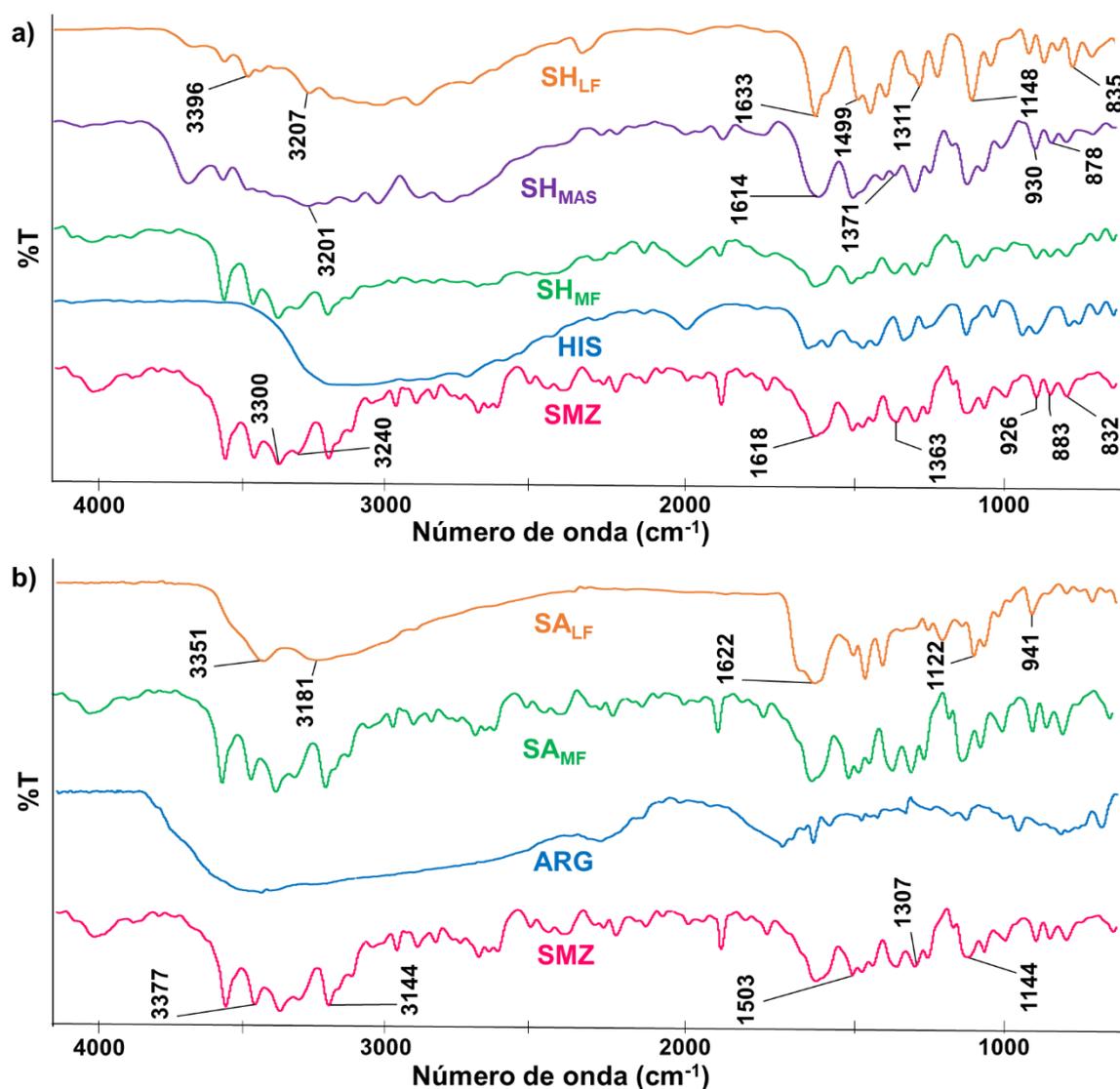


Figura 3.2. Espectros FT-IR de: (a) SMZ, HIS, SH_{MF}, SH_{MAS}, SH_{LF}; (b) SMZ, ARG, SA_{MF}, SA_{LF}.

Al analizar el espectro de SA_{MF} (Figura 3.2b) se observa la superposición de los espectros de los componentes puros donde prevalece principalmente el de SMZ, mientras que el espectro correspondiente a SA_{LF} evidencia diferencias marcadas con respecto a los espectros de las materias primas y de la MF. En primer lugar, en el espectro de SA_{LF} se observa desaparición de la banda del grupo -CH que se encuentra presente a 3144 cm⁻¹ tanto en el IFA libre como en la MF. Además, se aprecia cambio en la frecuencia de algunas señales como en la del grupo -SN de 926 cm⁻¹ a 941 cm⁻¹, en la del grupo -SO₂ de 1144 cm⁻¹ a 1122 cm⁻¹, así como en las señales asociadas al grupo -NH₂ de 3377 cm⁻¹ a 3351 cm⁻¹ y de 1618 cm⁻¹ a 1622 cm⁻¹. Como sucede en los sistemas con HIS, la modificación más importante corresponde a las bandas del grupo -NH, donde se observa una única señal a 3181 cm⁻¹ que puede atribuirse a la formación del ion sulfonamida, como consecuencia de la ionización de SMZ producida por el agregado de ARG. Esta ionización, que ocurre en los sistemas SH_{MAS},

SH_{LF} y SA_{LF}, provoca una reorganización de la nube de electrones de los grupos asociados a la amida originando el corrimiento, la desaparición o aparición de nuevas bandas de absorción.

Tomando como base estas evidencias, es posible confirmar la formación de nuevos sistemas supramoleculares, ya que en las muestras obtenidas por las técnicas de MAS y de LF se aprecian interacciones intermoleculares de tipo electrostáticas entre los componentes. En particular, se sugiere la formación de sales farmacéuticas entre SMZ y ambos AA en estado sólido.

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO

Los espectros de ¹³C CP-MAS obtenidos para SMZ, HIS y ARG se corresponden con su naturaleza cristalina, ya que se caracterizan por poseer resonancias múltiples y agudas para cada tipo de átomo de carbono (Figura 3.3). En el espectro de SMZ se puede distinguir la señal del grupo metilo a 11 ppm (C8); el resto de las señales aparecen entre 95 y 175 ppm. Adicionalmente, al comparar los espectros de los componentes individuales, se puede apreciar superposición de picos entre los C5 y C6 del IFA con el C4' de HIS, así como entre el C3 de SMZ y el C6' de ARG.

Los espectros ¹³C CP-MAS de SH_{MF} y SA_{MF} se corresponden con sólidos cristalinos y, además, evidencian similitud en la intensidad de las señales y en las posiciones de los desplazamientos químicos de los componentes de partida, indicando que no existen interacciones y que los componentes mantienen su estructura cristalina.

Por otra parte, los espectros ¹³C CP-MAS de SH_{MAS} y SH_{LF} también se corresponden con sólidos cristalinos, sin embargo, muestran cambios en las posiciones de los desplazamientos químicos entre 90 y 170 ppm con respecto a los desplazamientos de los componentes de partida. En estos espectros se aprecia el desdoblamiento de las señales ocasionadas por los C3, C4 y C7 del IFA y corrimiento en las señales de los C1 (124,7 ppm), C2 (129,4 y 131,8 ppm), C5 (116,5 ppm) y C6 (115 ppm) a 123,1; 126,7 y 128,3; 119,1 y 116,3 ppm, respectivamente (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Desplazamientos de las señales de los C de SMZ.

	C1 (ppm)	C2 (ppm)	C5 (ppm)	C6 (ppm)
SMZ	124,7	129,4 131,8	116,5	115
SH_{MAS} y SH_{LF}	123,1	126,7 128,3	119,1	116,3

El C1 de SMZ se encuentra unido directamente al grupo -NH_2 y el C5 al grupo -NH (Figura 3.3), por lo que el comportamiento observado en los espectros ^{13}C CP-MAS de SH_{MAS} y SH_{LF} se corresponde con el evidenciado en sus espectros de FT-IR, en los que se observó desplazamiento en las bandas asociadas a los grupos -NH_2 y -NH lo que responde al cambio en el entorno químico de estos grupos.

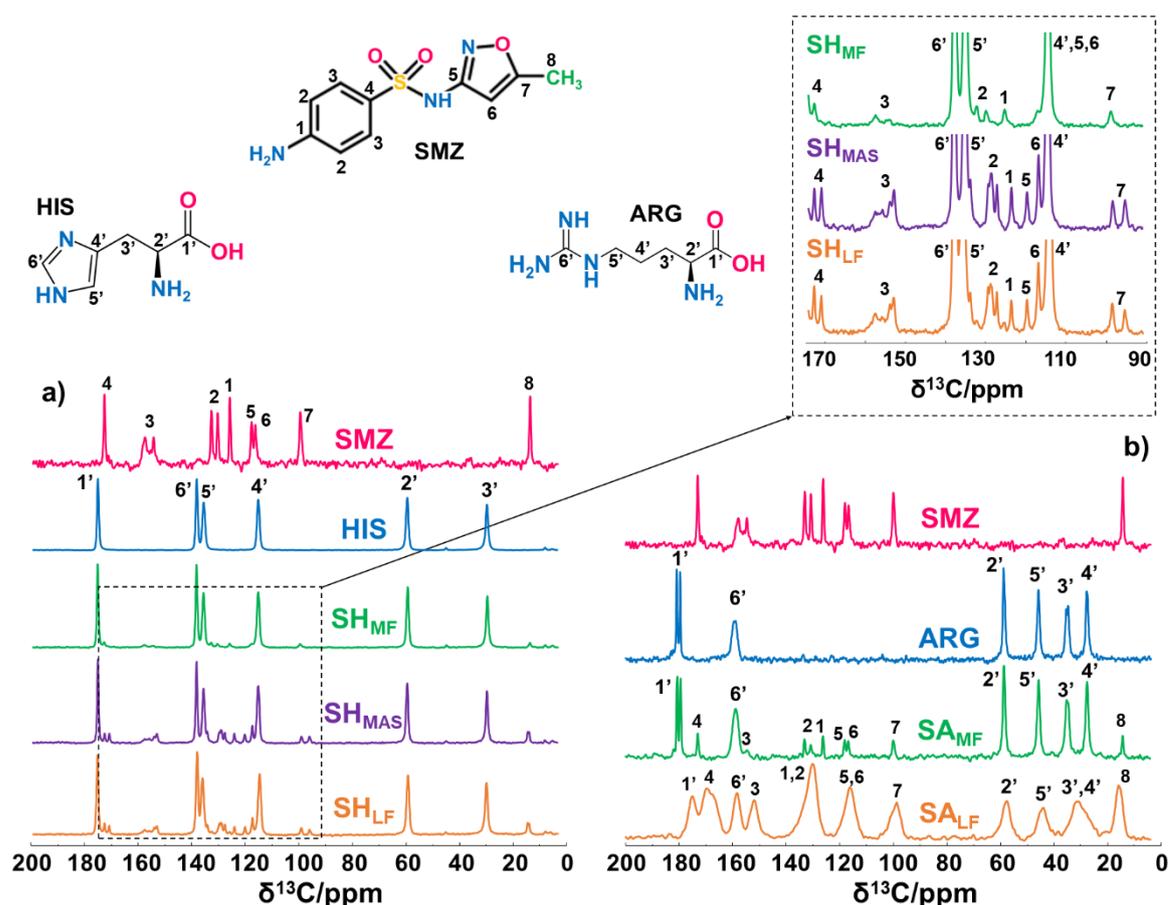


Figura 3.3. Espectros ^{13}C CP-MAS de: (a) SMZ, HIS, SH_{MF} , SH_{MAS} , SH_{LF} ; (b) SMZ, ARG, SA_{MF} , SA_{LF} .

En el espectro de SA_{LF} los picos anchos evidencian una disminución en la cristalinidad del sistema sólido con respecto a la cristalinidad de los componentes de partida. Sin embargo, pueden reconocerse las señales correspondientes a SMZ modificadas por la presencia de ARG. Los cambios más notorios se observan en las señales de los C1, C2, C3, C4, C5 y C6 de SMZ y en los C1', C3' y C4' de ARG (Figura 3.3), lo que coincide con los desplazamientos de las bandas correspondientes en el espectro FT-IR de SA_{LF} .

Las diferencias encontradas en los espectros de SH_{MAS} , SH_{LF} y SA_{LF} , con respecto a los espectros de los componentes puros, confirman la existencia de interacciones entre los componentes en los sistemas desarrollados.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Los estudios de SEM permitieron analizar el aspecto microscópico y evaluar la morfología de las sustancias sólidas en estudio. La microfotografía de SMZ muestra partículas compactas de diferentes tamaños y formas irregulares, presentándose tanto estructuras de superficie lisa como rugosa. Por su parte, HIS exhibe partículas grandes, planas y de superficie lisa, mientras que ARG muestra principalmente estructuras grandes con superficie rugosa (Figura 3.4).

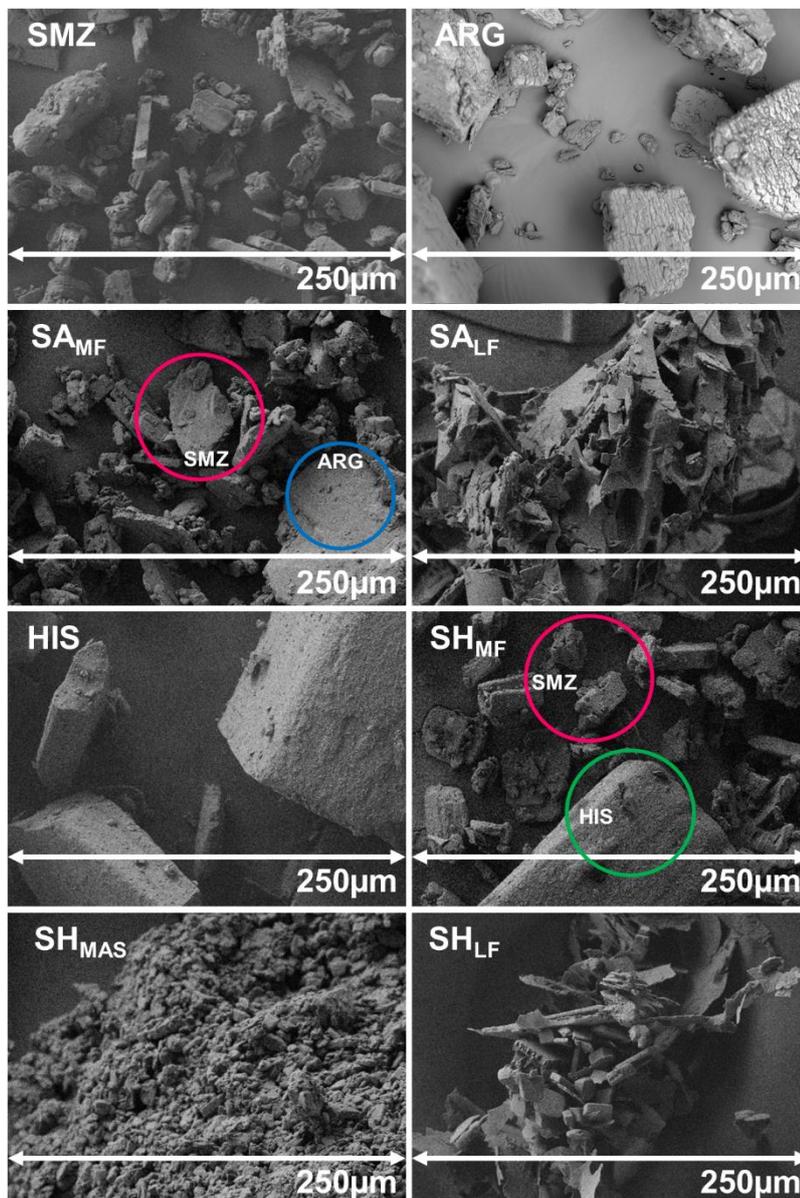


Figura 3.4. Microfotografías SEM de: SMZ, HIS, ARG, las MF y los sistemas desarrollados.

En las imágenes de SH_{MF} y SA_{MF} se evidencian los cristales característicos de SMZ mezclados con partículas de los AA indicando la ausencia de una nueva forma sólida. Las imágenes de SH_{MAS} presentan estructuras aglomeradas de superficie rugosa, mientras que en ambos LF es posible visualizar estructuras laminadas de tamaños y formas irregulares, con superficies lisas (Figura 3.4).

El cambio drástico en la forma de las partículas, obtenidas por los métodos de MAS y LF, en los que desaparece la morfología original de ambos componentes, evidencia la existencia de una nueva forma sólida con interacciones entre sus componentes como se evidenció previamente por espectroscopia FT-IR y RMNss.

ANÁLISIS TÉRMICO

El perfil DSC de SMZ (Figura 3.5) muestra un proceso endotérmico a 170,1 °C atribuido a la fusión del fármaco el cual ocurre sin pérdida de masa en el TG (Figura 3.6). Se ha reportado que este proceso se encuentra acompañado por un proceso exotérmico a 283,8 °C atribuido a eventos de oxidación que ocurren junto a una pérdida de 30% de masa del fármaco entre 200 y 300 °C.¹¹⁹ A pesar de que en el perfil DSC de la Figura 3.5 no se puede apreciar este evento exotérmico, en la curva TG (Figura 3.6) se observa la pérdida de masa del 31% de SMZ en dicho intervalo de temperaturas^{vii} confirmando estos resultados.

El perfil DSC de HIS (Figura 3.5a) presenta un proceso endotérmico a 284,4 °C con una pérdida de 19,6% de masa del AA entre 200 y 300 °C la cual inicia a 258 °C (Figura 3.6a).

La curva de DSC de ARG presenta dos endotermas (Figura 3.5b). La primera aparece a 99 °C y se encuentra asociada a una pérdida de masa en el TG (Figura 3.6b) de 3,9% del AA entre 25 y 105 °C atribuible a la pérdida de agua, lo que indica que ARG está presente como una forma hidratada. La segunda endoterma en la curva de DSC aparece a 220,7 °C y se corresponde con la fusión de ARG acompañada de su descomposición como lo muestra el TG donde se observa una pérdida de masa de 36,4% de ARG, entre 200 y 300 °C, la cual inicia a 213 °C (Figura 3.6b).

En concordancia con lo observado por RMNss, tanto los perfiles de las MF (SH_{MF} y SA_{MF}) como los correspondientes a los sistemas SH_{MAS} y SH_{LF} presentan el evento de fusión del fármaco a 169,7 °C, 168,9 °C, 169,4 °C y 169,3 °C, respectivamente. Mientras que SA_{LF}, al disminuir la cristalinidad del sistema, muestra la desaparición completa de la fusión de SMZ en su perfil DSC (Figura 3.5).

^{vii} Se decide estudiar la pérdida de masa entre 200 y 300 °C en todos los casos con el objetivo comparar la pérdida de masa de los sistemas desarrollados respecto a la de los componentes puros.

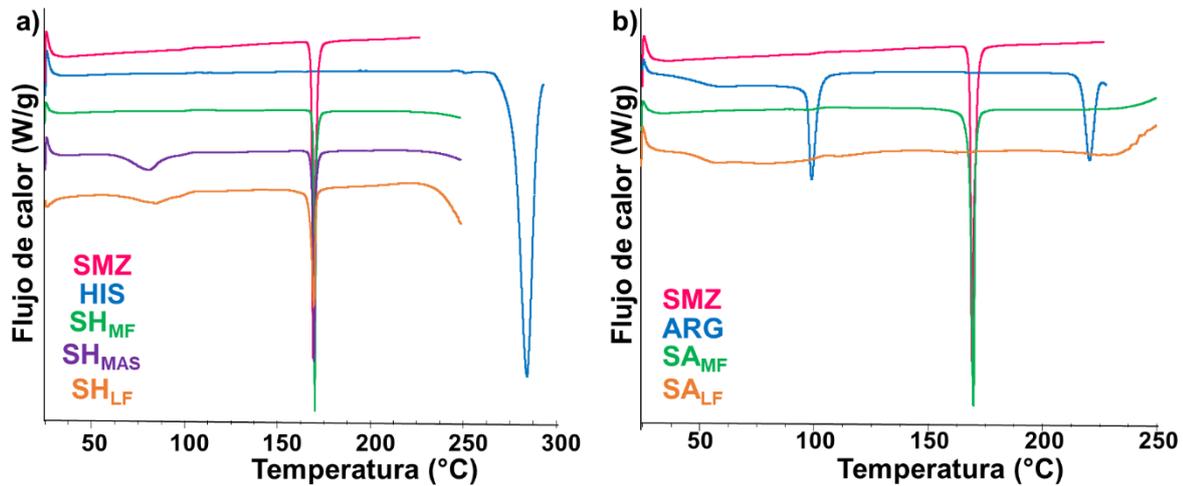


Figura 3.5. Perfil DSC de: (a) SMZ, HIS, SH_{MF}, SH_{MAS}, SH_{LF}; (b) SMZ, ARG, SA_{MF}, SA_{LF}.

Las curvas TG de las MF muestran pérdidas de masa, entre 200 y 300 °C, de 44% para SH_{MF} y de 46,5% para SA_{MF} sin pérdida de agua entre 25 y 105 °C. Mientras que los sistemas evidencian pérdida de masa entre 25 y 105 °C originadas por la pérdida de agua remanente^{viii} de 3% para SH_{MAS}, de 5% para SH_{LF} y de 4% para SA_{LF}. Además, dichos sistemas presentan pérdida de masa entre 200 y 300 °C de 41,3% para SH_{MAS}, de 39,2% para SH_{LF} y de 41% para SA_{LF} atribuida a la descomposición del sistema (Figura 3.6).

A partir de estos resultados, podemos inferir que los sistemas SMZ:AA obtenidos empleando diferentes técnicas de preparación no modifican la estabilidad térmica de SMZ en estado sólido.

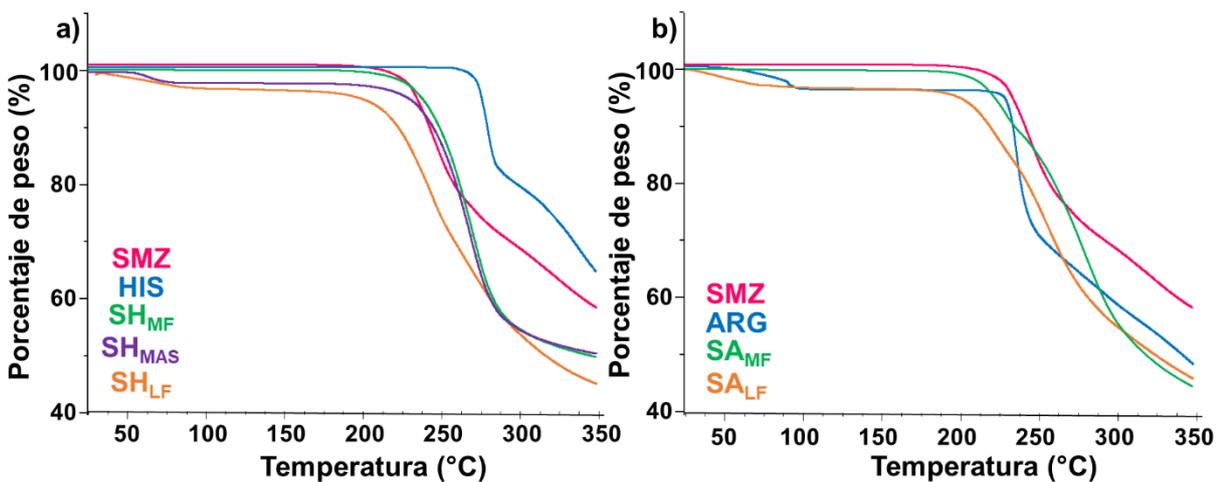


Figura 3.6. Curvas TG de: (a) SMZ, HIS, SH_{MF}, SH_{MAS}, SH_{LF}; (b) SMZ, ARG, SA_{MF}, SA_{LF}.

^{viii} Es importante recordar que tanto los sistemas obtenidos por MAS como por LF utilizaron agua como solvente

DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO

Los patrones de difracción de las sustancias puras, las MF y los sistemas binarios: SH_{MAS} , SH_{LF} y SA_{LF} se analizaron con el objetivo de determinar el grado de cristalinidad de las muestras y se compararon para confirmar la existencia de un nuevo sistema.

Los componentes puros (SMZ, HIS y ARG) muestran difractogramas típicos de sustancias cristalinas con señales de intensidad variable y bien definidas (Figura 3.7).

Cuando analizamos los patrones de SH_{MF} (Figura 3.7a) y SA_{MF} (Figura 3.7b) es posible observar que, en ambos casos, el perfil de difracción registrado es el resultado de la combinación de los patrones de los componentes puros, con una disminución en la intensidad de las señales originada por la dilución de los componentes.

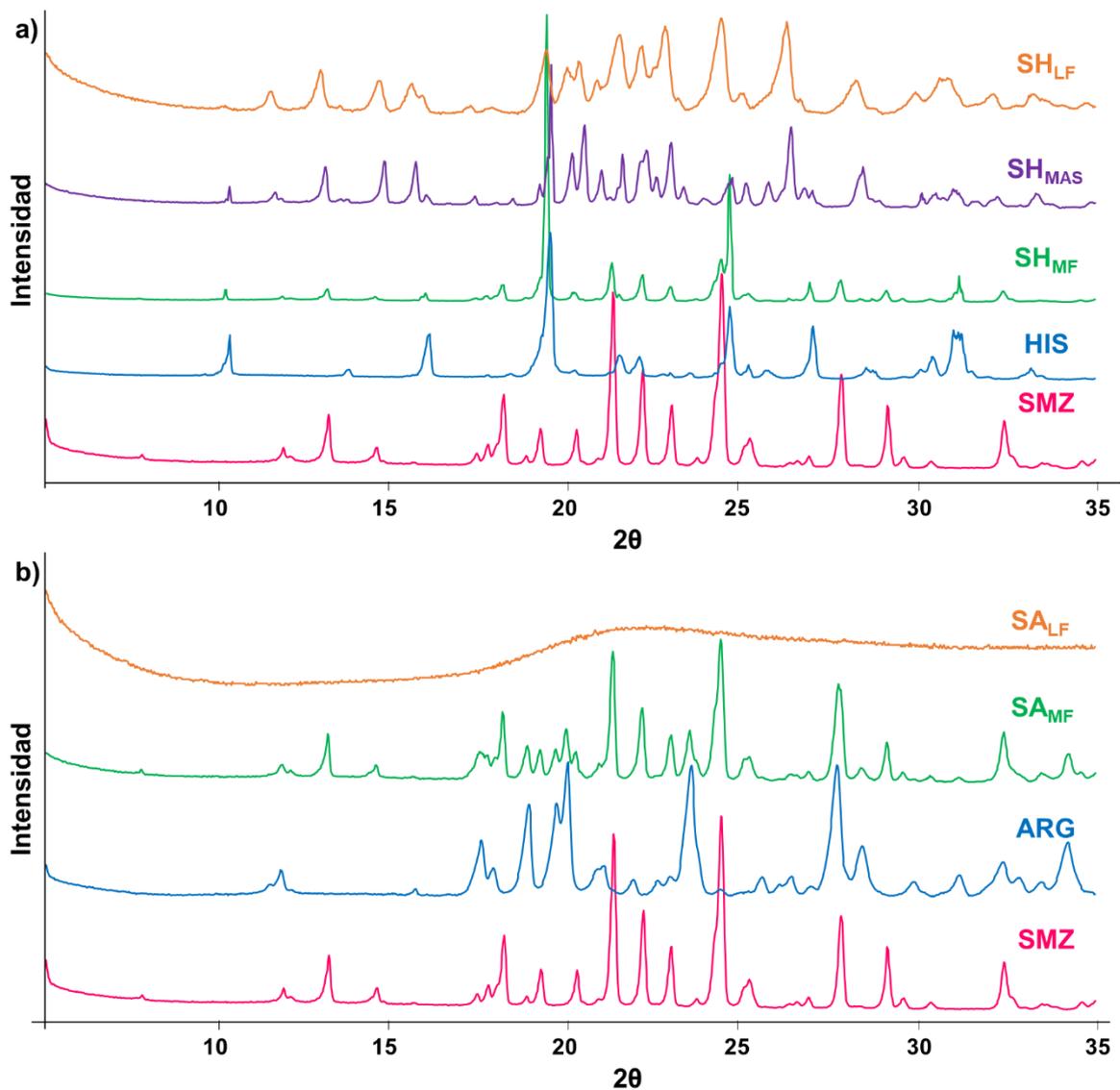


Figura 3.7. Patrones DRXP de: (a) SMZ, HIS, SH_{MF} , SH_{MAS} , SH_{LF} ; (b) SMZ, ARG, SA_{MF} , SA_{LF} .

Por otro lado, para los sistemas SH_{MAS} y SH_{LF} se puede observar corrimiento y desaparición de ciertas señales de difracción (Tabla 3.2). Finalmente, se puede apreciar que el difractograma del sistema SA_{LF} (Figura 3.7b) muestra ausencia total de picos, comportamiento típico de un sólido amorfo.

Tabla 3.2. Desplazamientos, aparición o desaparición de señales en los patrones de difracción de SH_{MAS} y SH_{LF} con respecto a las señales más importantes de SMZ.

SMZ	Señal (2θ)							
		13,76	19,65	20,73	23,93		27,45 ; 28,75	32,26
HIS	11,02					24,65 ; 26,65		
SH _{MF}	11,01	13,74	19,61	20,73	23,90	24,70 ; 26,50	27,42 ; 28,76	32,27
SH _{MAS}	10,77	13,99	19,51 ; 19,88	20,37	-	25,96	28,07	32,01
SH _{LF}	10,63	13,83	19,37 ; 19,73	-	-	25,83	27,87	31,90

Estos resultados indican que los sólidos preparados mediante MAS y LF presentan características diferentes a los componentes que le dieron origen y, a su vez, se corresponden con los resultados observados mediante las otras técnicas de caracterización (FT-IR, RMNss, SEM, DSC y TG) confirmándose la presencia de interacciones y la formación de nuevos sistemas entre SMZ y los AA en estado sólido. Por un lado, entre HIS y el IFA se obtiene una sal cristalina SMZ:HIS tanto por la técnica de MAS como por LF y, por otro lado, cuando se combina SMZ con ARG utilizándose la técnica de LF se obtiene la sal amorfa SMZ:ARG.

FUROSEMIDA

OBTENCIÓN DE FURII Y CARACTERIZACIÓN DE LOS POLIMORFOS

Debido a la importancia que presenta el polimorfismo en el sector farmacéutico, resulta fundamental conocer el número de polimorfos que presentan los IFAs y las características fisicoquímicas de los mismos. Particularmente FUR presenta diversas formas polimórficas y forma solvatos con DMF y dioxano. La forma polimórfica I (forma comercial) es la más estable y las otras formas tienden a cristalizar a ésta con el tiempo.¹²⁰⁻¹²² Teniendo en cuenta estos antecedentes se plantea estudiar los polimorfos I y II del IFA.

La preparación del polimorfo II de FUR (FURII) se efectuó por evaporación rápida en rotavapor a 25 °C, para lo cual previamente se disolvió completamente el polimorfo I de FUR (FUR comercial que de ahora en adelante será llamada simplemente FUR) en acetona con agitación constante durante 60 min. La obtención del IFA en la forma polimórfica II demandó numerosos intentos debido a que la pureza del solvente y las condiciones climáticas afectaban

la conversión de FUR a la forma II. El sólido obtenido se analizó mediante FT-IR, RMNss, DRXP y SEM y se comparó con FUR.

El espectro FT-IR de FUR (Figura 3.8) se caracteriza por poseer bandas a 3397, 3285 y 1567 cm^{-1} atribuidas a las vibraciones de estiramiento del grupo $-\text{NH}$ de la sulfonamida, a 3353 cm^{-1} correspondiente a la vibración del estiramiento del grupo $-\text{NH}$ de la amina secundaria, a 1324 y 1141 cm^{-1} originadas por el estiramiento del grupo $\text{S}=\text{O}$ y a 1673 cm^{-1} ocasionada por estiramiento del grupo $\text{C}=\text{O}$.

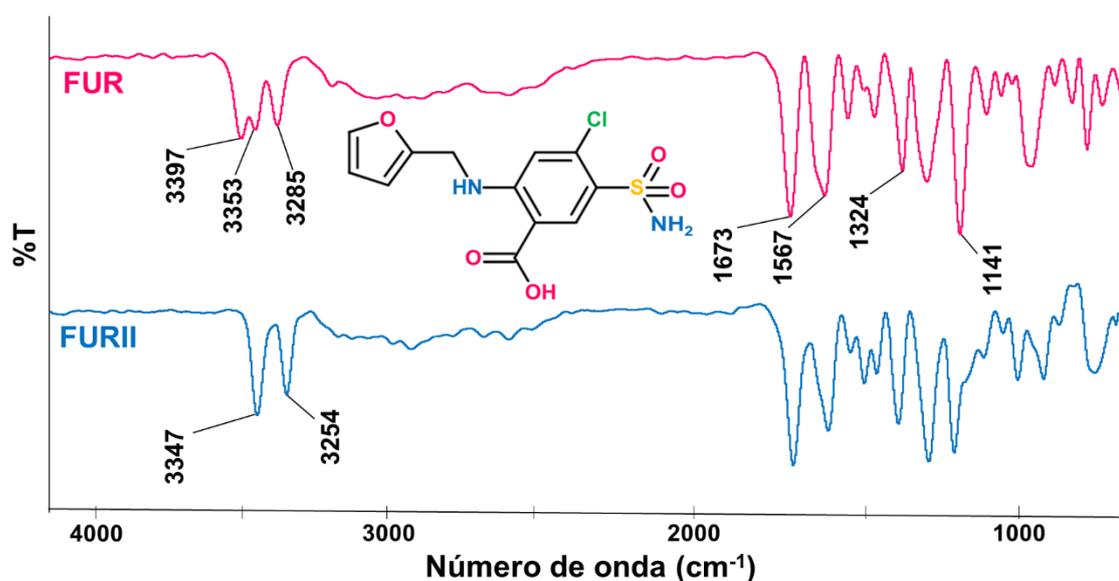


Figura 3.8. Espectros FT-IR de FUR y FURII.

En el espectro de FURII se observa una notoria modificación de las señales en la zona de 3200-3400 cm^{-1} , atribuible al cambio en la vibración de los enlaces de esta estructura cristalina. Una de las bandas del grupo $-\text{NH}$ de la sulfonamida, presente en el espectro de FUR, desaparece en FURII, mientras que la otra banda sufre un corrimiento de 3285 cm^{-1} a 3254 cm^{-1} . Por otro lado, la banda correspondiente al grupo $-\text{NH}$ de la amina secundaria evidencia un ligero corrimiento de 3353 cm^{-1} a 3347 cm^{-1} y las señales originadas por el estiramiento del grupo $\text{S}=\text{O}$ se desplazan de 1324 cm^{-1} a 1339 cm^{-1} y de 1141 cm^{-1} a 1165 cm^{-1} (Figura 3.8). El cambio en las vibraciones asociadas con el grupo sulfonamida en FURII sugiere que hay una alteración en el enlace de hidrógeno dentro del cristal, el que puede ser resultado de un cambio en la conformación molecular y en el empaquetamiento del cristal. Estos resultados permiten confirmar la obtención de FURII.

En el espectro de ^{13}C CP-MAS de FUR (Figura 3.9) se puede distinguir la señal del grupo carboxilo a 171,7 ppm (C12) y la del grupo metileno a 39 ppm (C5). El resto de las señales aparecen entre 100 y 160 ppm. A partir de estas señales, es posible identificar los polimorfos I y II ya que se diferencian varias señales entre ellos, por ejemplo, el desplazamiento a mayor ppm, o campos más bajos, de los C5 y C12 de FURII y las marcadas modificaciones que sufren las señales de los C1 y C8 de FURII con respecto a las señales de estos en el espectro de FUR. Además, se puede apreciar que para los C6, C9 y C10 en FUR hay dos señales de resonancia, mientras que aparece sólo una en el espectro de FURII. Los datos de ^{13}C CP-MAS sugieren un cambio en la conformación molecular de la molécula de FUR en la forma cristalina II, que puede estar asociado a la alteración en el enlace de hidrógeno dentro del cristal evidenciada por FT-IR.

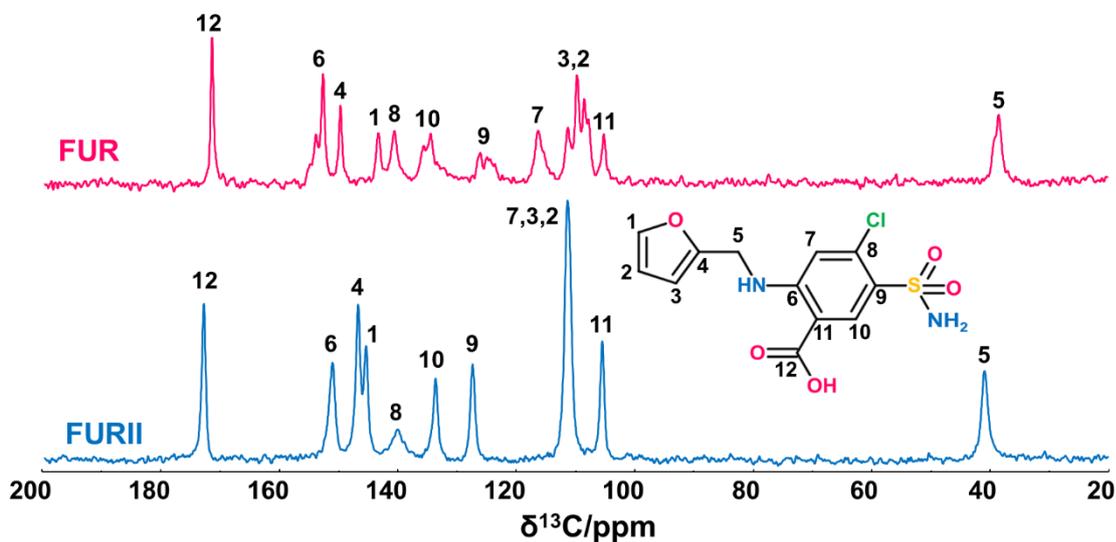


Figura 3.9. Espectros ^{13}C CP-MAS de FUR y FURII.

Por otra parte, los difractogramas obtenidos por DRXP muestran que los patrones de difracción de FUR y FURII (Figura 3.10) presentan señales muy diferentes entre sí las cuales reflejan diferencias en el empaquetamiento y la estructura de los cristales, confirman la presencia del polimorfo II y sustentan los resultados obtenidos por FT-IT y RMNss.

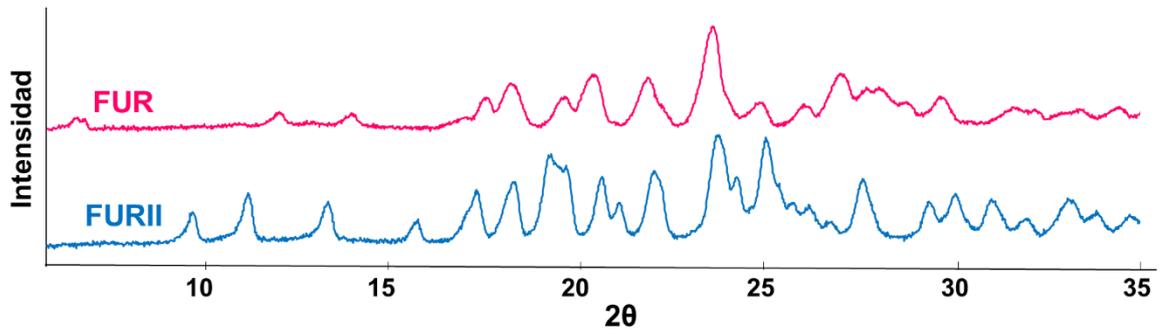


Figura 3.10. Patrones DRXP de FUR y FURII.

Las microfotografías obtenidas por SEM (Figura 3.11) muestran diferencias en cuanto a la morfología y a la distribución de las partículas de FUR y FURII. En el caso de FUR, se observan cristales tubulares hexagonales, mientras que FURII se presenta como cristales más aglomerados en forma de aguja.

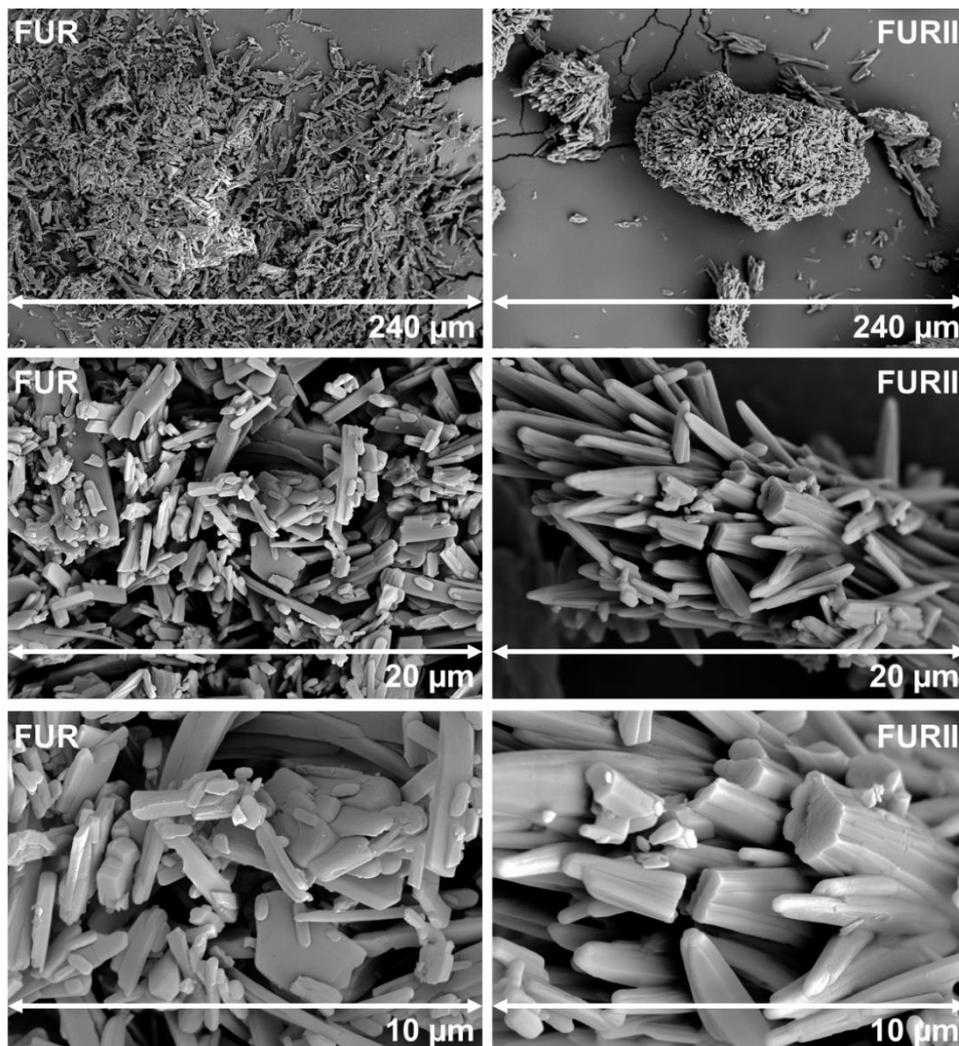


Figura 3.11. Microfotografías SEM de FUR y FURII.

Una vez confirmada la obtención de la forma II de FUR se evaluó su solubilidad en agua. Los resultados evidenciaron que FURII (0,039 mg/mL) no presenta ventajas respecto a FUR (0,047 mg/mL) dado que tiene una solubilidad intrínseca menor. Por otra parte, el rendimiento en la producción de FURII fue bajo e insuficiente para estudios exhaustivos de este polimorfo referentes a solubilidad en combinación de diferentes ligandos y a sus propiedades biofarmacéuticas. Teniendo en cuenta que la utilización de un polimorfo difícil de obtener no presenta ninguna ventaja para el área farmacéutica sobre la forma comercial disponible actualmente, se decidió continuar sólo con la caracterización y el estudio de FUR comercial.

El espectro Raman de FUR se caracteriza por poseer señales a 3271 y 1567 cm^{-1} originadas por las vibraciones de estiramiento del grupo $-\text{NH}$ de la sulfonamida, a 3348 cm^{-1} debidas a la vibración del estiramiento del grupo $-\text{NH}$ de la amina secundaria, así como a 1338 y 1147 cm^{-1} correspondientes al estiramiento del grupo $\text{S}=\text{O}$ (Figura 3.12). Las señales a números de onda superiores a 1800 cm^{-1} son muy débiles, por lo que los espectros de las MF y de los sistemas binarios y ternarios serán analizados hasta 1800 cm^{-1} .

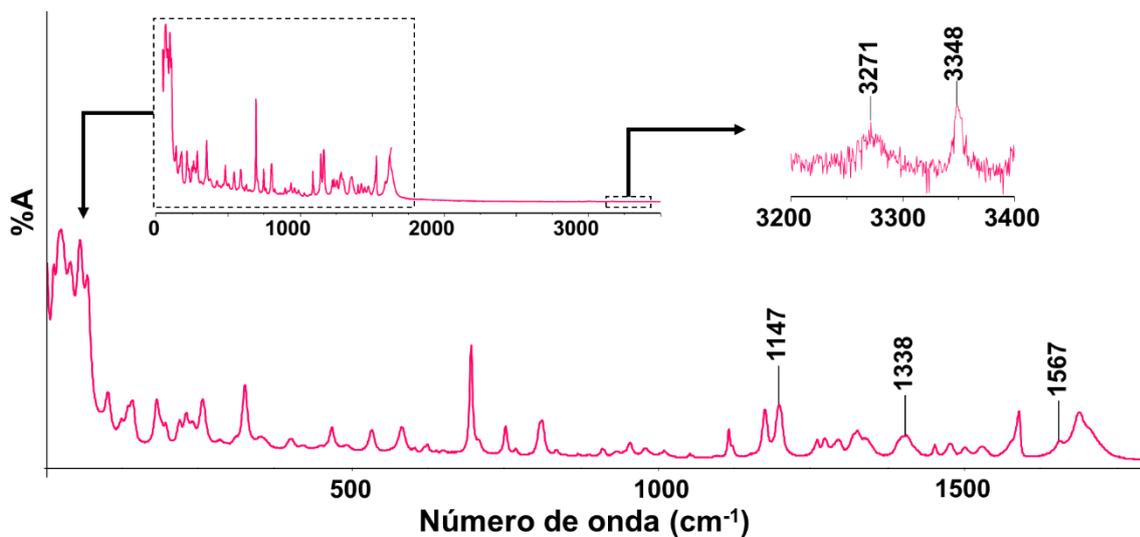


Figura 3.12. Espectro Raman de FUR.

El perfil DSC de FUR exhibe un proceso endotérmico a 136,1 $^{\circ}\text{C}$ sin pérdida de masa en la curva TG (en el rango de 130-140 $^{\circ}\text{C}$), demostrando que este proceso no surge de la desolvatación del fármaco; este comportamiento fue previamente reportado e indica una probable transición de fase polimórfica a una temperatura cercana a 130 $^{\circ}\text{C}$.¹²¹⁻¹²⁴ El perfil DSC del IFA presenta también una endoterma de fusión a 219,9 $^{\circ}\text{C}$ seguida de un proceso exotérmico a 223,6 $^{\circ}\text{C}$ y dos procesos endotérmicos (271 y 281,9 $^{\circ}\text{C}$) asociados a la descomposición del fármaco (Figura 3.13). La curva TG muestra una pequeña pérdida de

masa de 1,5% entre los 222-230 °C y una gran pérdida de masa a partir de los 260 °C que corresponde a la descomposición de FUR.

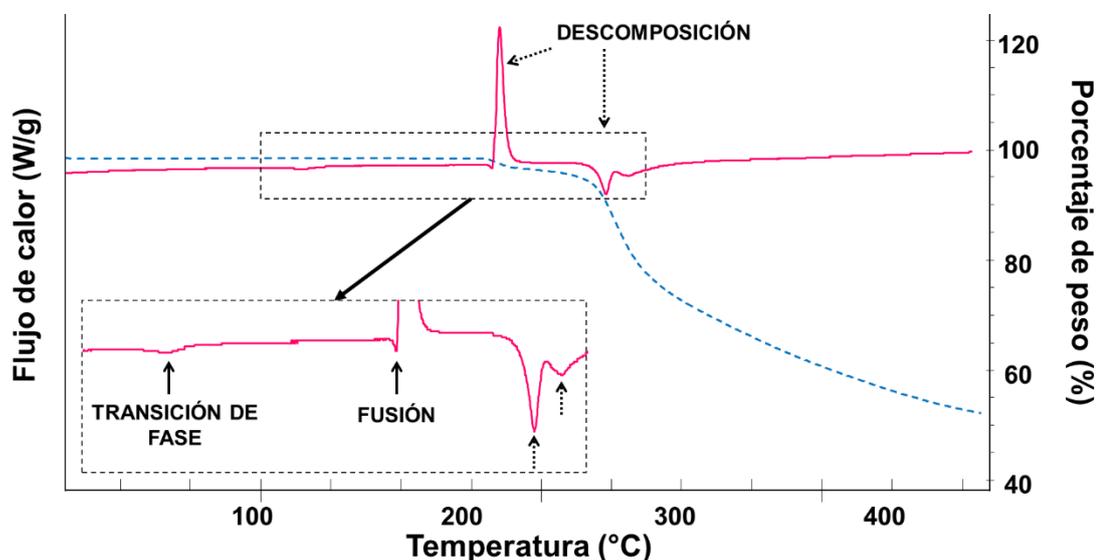


Figura 3.13. Perfil DSC (fucsia) y curva TG (azul) de FUR. Las flechas con líneas punteadas señalan los eventos de descomposición.

SELECCIÓN DEL MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS SÓLIDOS

Las muestras en estado sólido de los sistemas compuestos por FUR (F) y los diferentes ligandos [β -CD (C), MD (M), TEA (T) y ARG (A)] se obtuvieron empleando la técnica de MAS utilizando agua como solvente. Cabe destacar que no se utilizó la técnica de LF debido a que la baja solubilidad del IFA no permite obtener cantidad de muestra suficiente para llevar a cabo todos los estudios de caracterización y evaluación. Las muestras obtenidas fueron: FC_{MAS}, FM_{MAS}, FT_{MAS}, FA_{MAS}, FA²_{MAS}, FTC_{MAS}, FTM_{MAS}, FAC_{MAS} y FAM_{MAS}.

Para el caso del sistema binario entre FUR y TEA, además del sólido obtenido por MAS, se obtuvieron dos sistemas por evaporación lenta (EL). La selección del solvente a utilizar se realizó teniendo en cuenta la solubilidad del IFA y del ligando, con el objetivo de obtener la completa disolución de los componentes en el solvente seleccionado. Se seleccionaron acetona y metanol obteniéndose los sistemas FT^A_{EL} y FT^M_{EL}.

CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS SÓLIDOS

Con el objetivo de confirmar la obtención de nuevos sistemas supramoleculares de FUR con los diferentes ligandos en estado sólido y dilucidar el tipo de interacciones presentes en éstos, se caracterizaron las muestras obtenidas a partir de las diferentes técnicas de

preparación y se compararon con los componentes puros y con las MF: FC_{MF} , FM_{MF} , FT_{MF} , FA_{MF} , FA^2_{MF} , FTC_{MF} , FTM_{MF} , FAC_{MF} y FAM_{MF} .

SISTEMAS BINARIOS CON OLIGOSACÁRIDOS

Teniendo en cuenta que FUR forma complejos de inclusión con β -CD y MD en solución^{ix} y con el objetivo de confirmar la formación de estos sistemas en estado sólido, las muestras obtenidas por MAS y MF se analizaron empleando diversas técnicas de caracterización.

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

El espectro FT-IR de FUR fue completamente descrito anteriormente (Figura 3.8, página 91). Los espectros de β -CD y MD se caracterizan por presentar señales intensas entre 3000 y 3500 cm^{-1} ocasionadas por la absorción de los grupos OH de las macromoléculas (Figura 3.14).

El espectro FT-IR de FC_{MF} corresponde simplemente a la superposición de los espectros de los componentes puros. En cambio, en el espectro FT-IR del sistema FC_{MAS} las bandas de FUR correspondientes al estiramiento S=O (1324 y 1141 cm^{-1}) se desplazan hacia frecuencias más altas (1327 y 1150 cm^{-1}), lo que sugiere que el grupo sulfonamida de FUR interactúa con β -CD mediante la formación de enlaces puente hidrógeno (Figura 3.14a).

Al igual que para la MF con β -CD, el espectro FT-IR de FM_{MF} corresponde simplemente a la superposición de los espectros de los componentes puros. Por otro lado, en el espectro de FM_{MAS} (Figura 3.14b) las bandas del IFA asignadas al estiramiento S=O se desplazan a frecuencias más altas de 1333 y 1156 cm^{-1} . Además, las bandas del fármaco correspondientes a las vibraciones C=O (1673 cm^{-1}) y Cl (583 cm^{-1}) se desplazan a 1670 y 576 cm^{-1} , respectivamente. Estos eventos sugieren que el grupo sulfonamida y el anillo aromático del IFA interactúan con la MD mediante enlaces puente hidrógeno.

^{ix} El sistema soluble entre FUR y los oligosacáridos se forma en agua y FGS cuando parte del IFA se encuentra en forma neutra dado que la interacción entre el IFA y los ligandos no se encuentra mediada por cargas.

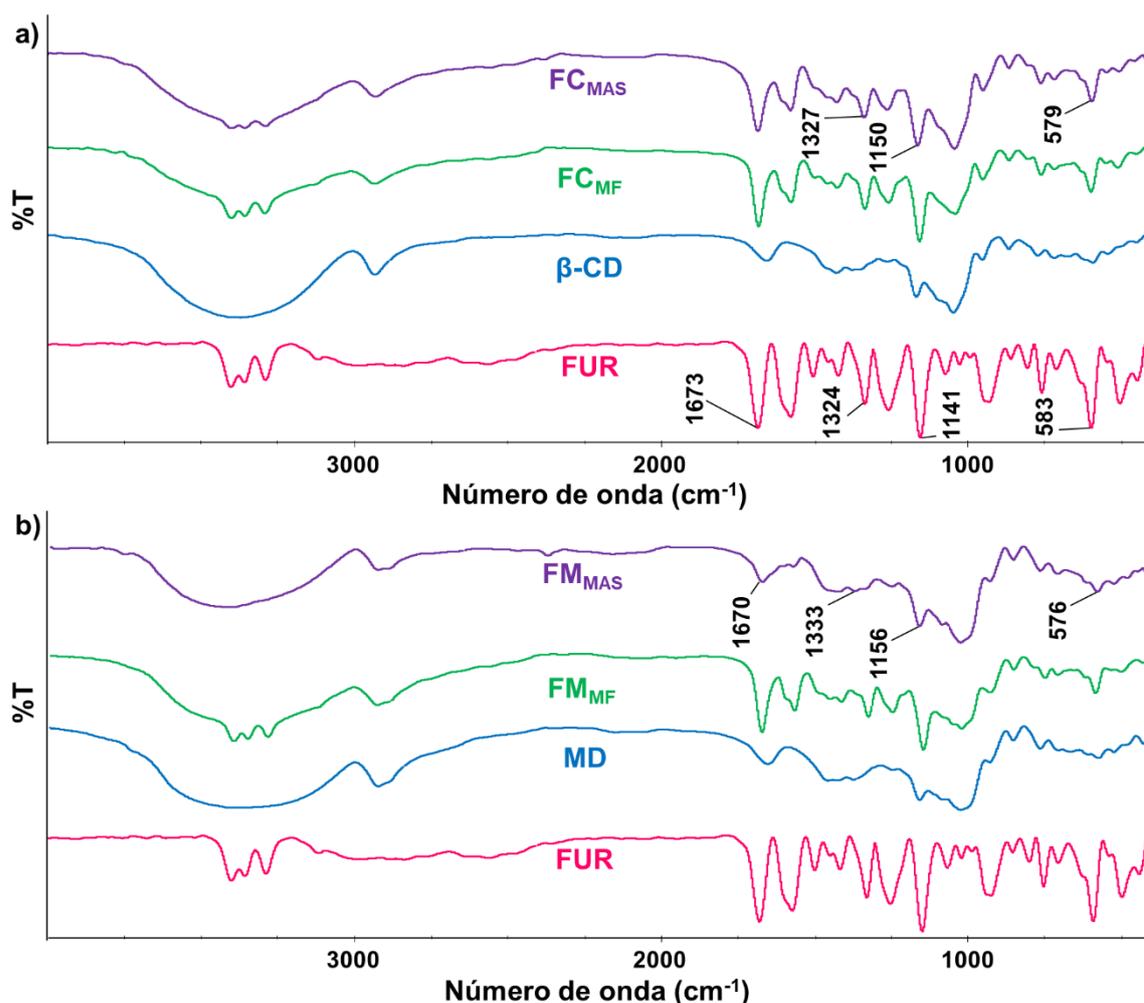


Figura 3.14. Espectros FT-IR de: (a) FUR, β-CD, FC_{MF}, FC_{MAS}; (b) FUR, MD, FM_{MF}, FM_{MAS}.

ESPECTROSCOPIA RAMAN

En el espectro Raman de FC_{MF} (Figura 3.15a) se aprecia la superposición de los espectros de los componentes puros, mientras que en el espectro del sistema FC_{MAS} se evidencia un leve desplazamiento en una de las bandas de FUR correspondientes al estiramiento S=O (1147 cm⁻¹) hacia frecuencias más bajas (1145 cm⁻¹) confirmando la formación de enlaces puente hidrógeno entre el oligosacárido y el IFA previamente descritos a partir del análisis de los espectros FT-IR.

Por otra parte, el espectro FM_{MF} es muy similar al del oligosacárido puro, es decir no se observan señales de FUR. Este comportamiento puede deberse a la diferencia en cantidad de FUR y MD en la mezcla, sumada a la capacidad de dispersar y emitir la luz de cada uno de los componentes. En el espectro Raman de FM_{MAS} (Figura 3.15b) se aprecian ciertas señales del IFA (marcadas con una flecha) levemente desplazadas hacia frecuencias más altas o más bajas que la señal que le dio origen confirmando la presencia de interacciones entre los componentes.

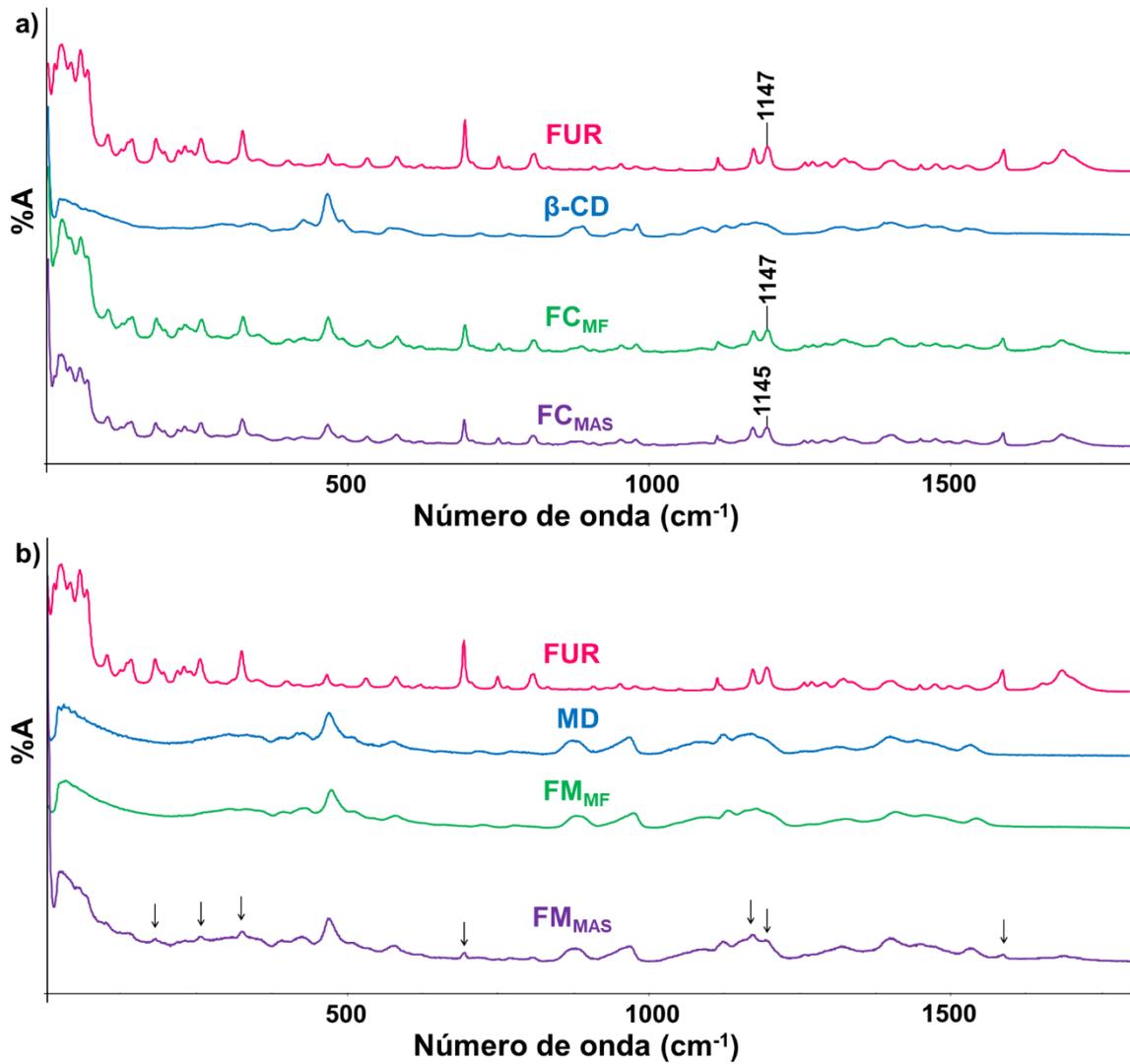


Figura 3.15. Espectros Raman de: (a) FUR, β -CD, FC_{MF} , FC_{MAS} ; (b) FUR, MD, FM_{MF} , FM_{MAS} .

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

En las imágenes de β -CD (Figura 3.16) se aprecian cristales de forma y tamaño irregular, donde se diferencian partículas pequeñas adheridas a la superficie de otras más grandes. Al compararlas con las partículas de FUR se observa una gran diferencia de tamaño.

En las microfotografías de FC_{MF} se distinguen los cristales característicos de FUR mezclados con partículas de β -CD, mientras que se observa un cambio drástico en la morfología de las partículas en FC_{MAS} donde las microfotografías muestran aglomerados compactos e irregulares, formados por la adherencia de partículas de diferentes formas y tamaños en las que desaparece la morfología original de ambos componentes (Figura 3.16).

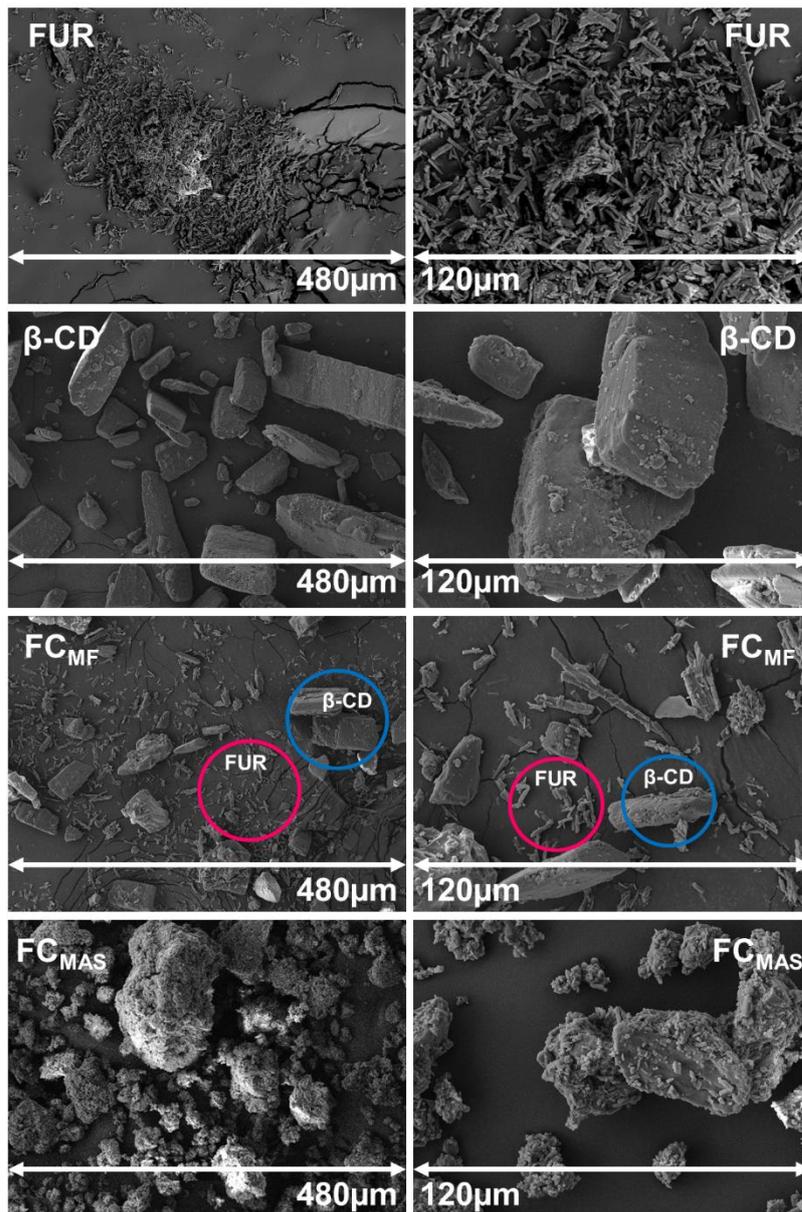


Figura 3. 16. Microfotografías SEM de: FUR, β -CD, FC_{MF} , FC_{MAS} .

Las imágenes de MD (Figura 3.17) exhiben partículas esféricas de diferentes tamaños. Las microfotografías de FM_{MAS} revelan una estructura menos ordenada, con aglomerados compactos e irregulares donde la morfología original de los dos componentes desaparece. En contraste, las imágenes de FM_{MF} muestran similitud con las de los componentes puros en concordancia con los resultados obtenidos por las espectroscopias FT-IR y Raman.

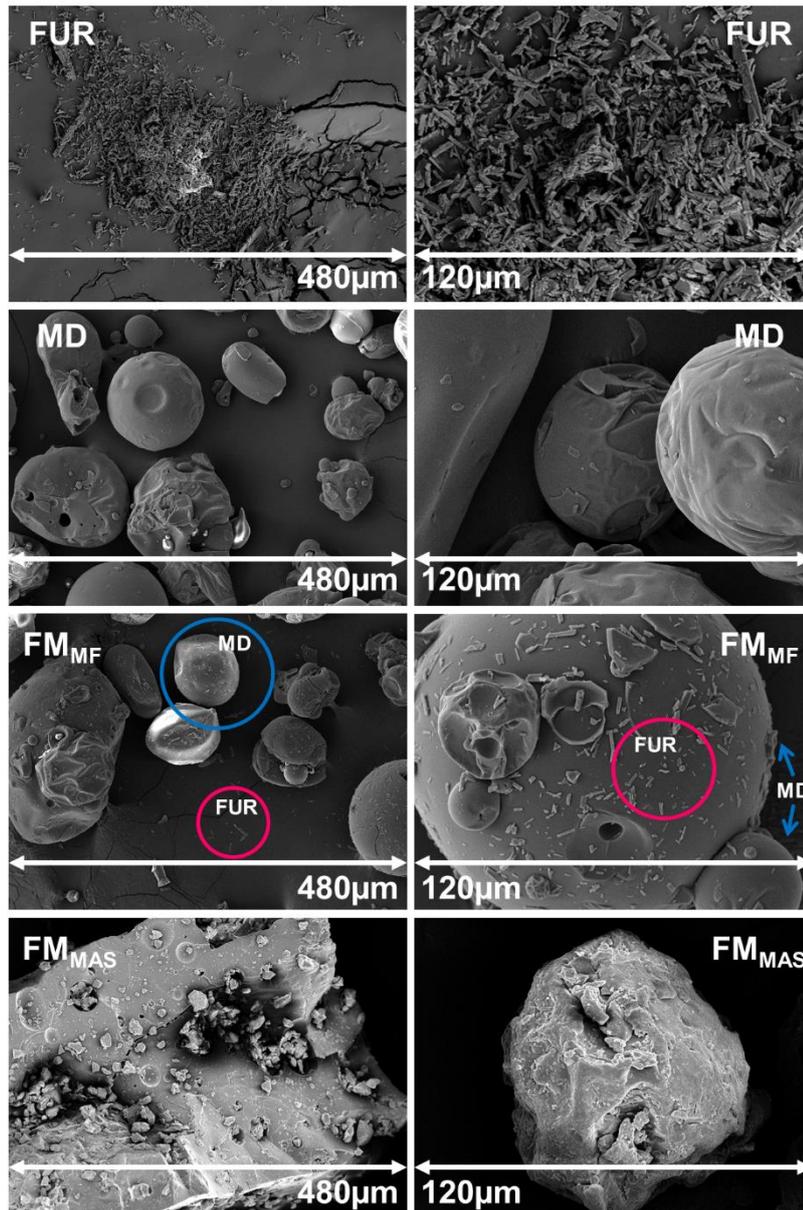


Figura 3.17. Microfotografías SEM de: FUR, MD, FM_{MF}, FM_{MAS}.

A partir del cambio en la morfología original de los componentes, presente en las estructuras de los sistemas FC_{MAS} y FM_{MAS}, se confirma la existencia de una nueva forma cristalina favorecida por las interacciones fármaco-oligosacárido evidenciadas por espectroscopia FT-IR y Raman.

ANÁLISIS TÉRMICO

Los perfiles DSC de β -CD y MD (Figura 3.18) presentan endotermas anchas características entre 50 y 150 °C asociadas al fenómeno de deshidratación por pérdida de las moléculas de agua desde el interior de la cavidad de los oligosacáridos. Las endotermas de

deshidratación poseen un máximo a 100,1 °C en el perfil DSC de β -CD y a 99,3 °C en el de MD. La pérdida de masa evidenciada en el TG (Figura 3.19) en ese rango de temperaturas es de 9% para β -CD y de 4,5% para MD. Por encima de los 300 °C las curvas de TG muestran pérdida de peso que se corresponde con una endo-exoterma en el perfil DSC de β -CD y con una exo-endoterma en el perfil DSC de MD, ambas asignadas al fenómeno de degradación.^{125,126}

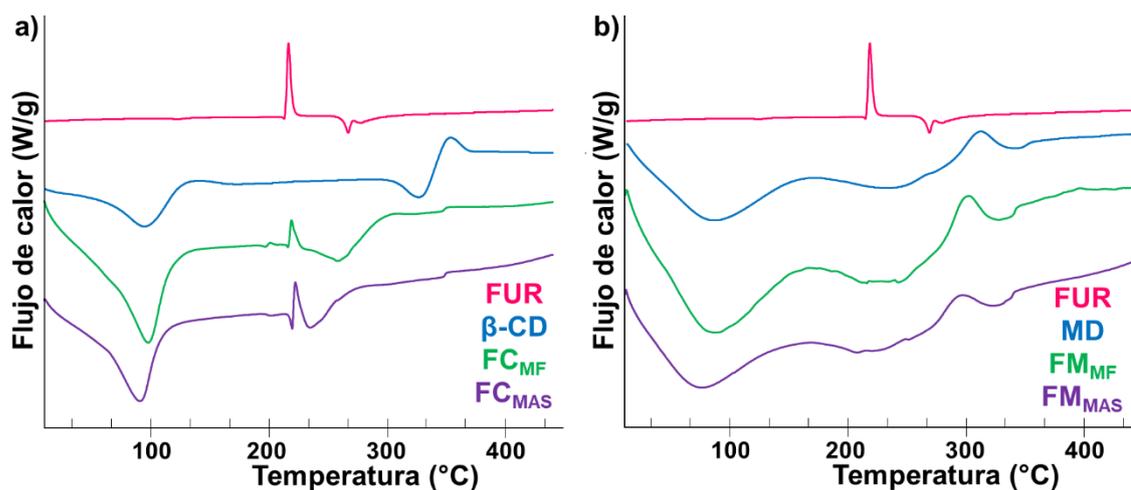


Figura 3.18. Perfil DSC de: (a) FUR, β -CD, FC_{MF} , FC_{MAS} ; (b) FUR, MD, FM_{MF} , FM_{MAS} .

La comparación de las curvas DSC de los sistemas FC_{MAS} y FC_{MF} confirma una interacción entre FUR y β -CD en el sistema preparado por MAS donde se puede apreciar que el evento de fusión de FUR se desplaza de 219,9 °C a 227,2 °C mientras que en FC_{MF} se mantiene en 221 °C (Figura 3.18a). Las curvas TG revelan el proceso de deshidratación entre 50 y 150 °C con pérdidas de masa de 6,8% para FC_{MAS} y de 7,7% para FC_{MF} (Figura 3.19a). Estos resultados evidencian que algunas de las moléculas de agua presentes originalmente en la cavidad de β -CD fueron reemplazadas por moléculas del IFA.

El perfil DSC del sistema FM_{MAS} (Figura 3.18b) muestra la desaparición completa de los eventos térmicos de FUR permitiendo confirmar la existencia de interacción entre los componentes previamente descrita por espectroscopia FT-IR y Raman. Las curvas TG revelan el proceso de deshidratación entre 50 y 150 °C con pérdidas de masa de 4,2% para FM_{MAS} y de 3% para FM_{MF} (Figura 3.19b).

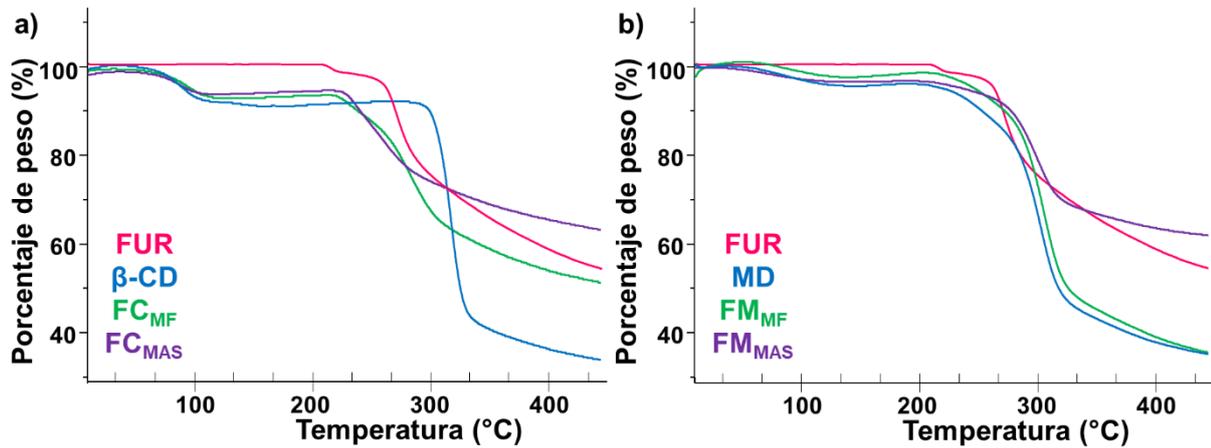


Figura 3.19. Curvas TG de: (a) FUR, β -CD, FC_{MF} , FC_{MAS} ; (b) FUR, MD, FM_{MF} , FM_{MAS} .

DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO

Los componentes puros (FUR y β -CD) muestran difractogramas característicos de sustancias cristalinas con varias señales de intensidad variable y bien definidas, mientras que MD muestra una relación señal/ruido sin picos definidos consistente con su naturaleza amorfa (Figura 3.20).

En los patrones DRXP para los sistemas FC_{MF} y FC_{MAS} , es posible distinguir señales características de FUR y β -CD indicando que la naturaleza cristalina del fármaco se mantiene en ambos casos. Adicionalmente, se puede observar que el difractograma de FC_{MAS} difiere de los difractogramas de FUR y β -CD ya que se aprecia modificación en la intensidad y la forma de varias señales (marcadas con flechas en la Figura 3.20a), lo que evidencia la presencia de una nueva forma cristalina. Por otra parte, el patrón de difracción de FC_{MF} corresponde a la superposición de los patrones de difracción de los componentes puros.

El patrón de difracción correspondiente a FM_{MF} también evidencia la superposición de los picos característicos de FUR y MD, mientras que en FM_{MAS} se aprecia una notable disminución en la cristalinidad del IFA (Figura 3.20b).

Estos resultados se correlacionan con los obtenidos previamente por las otras técnicas de caracterización indicando la ausencia de interacciones en FC_{MF} y FM_{MF} y, por otro lado, confirmando la formación de sistemas supramoleculares sólidos (complejos de inclusión) a partir de la técnica de MAS entre FUR y ambos oligosacáridos (FC_{MAS} y FM_{MAS}).

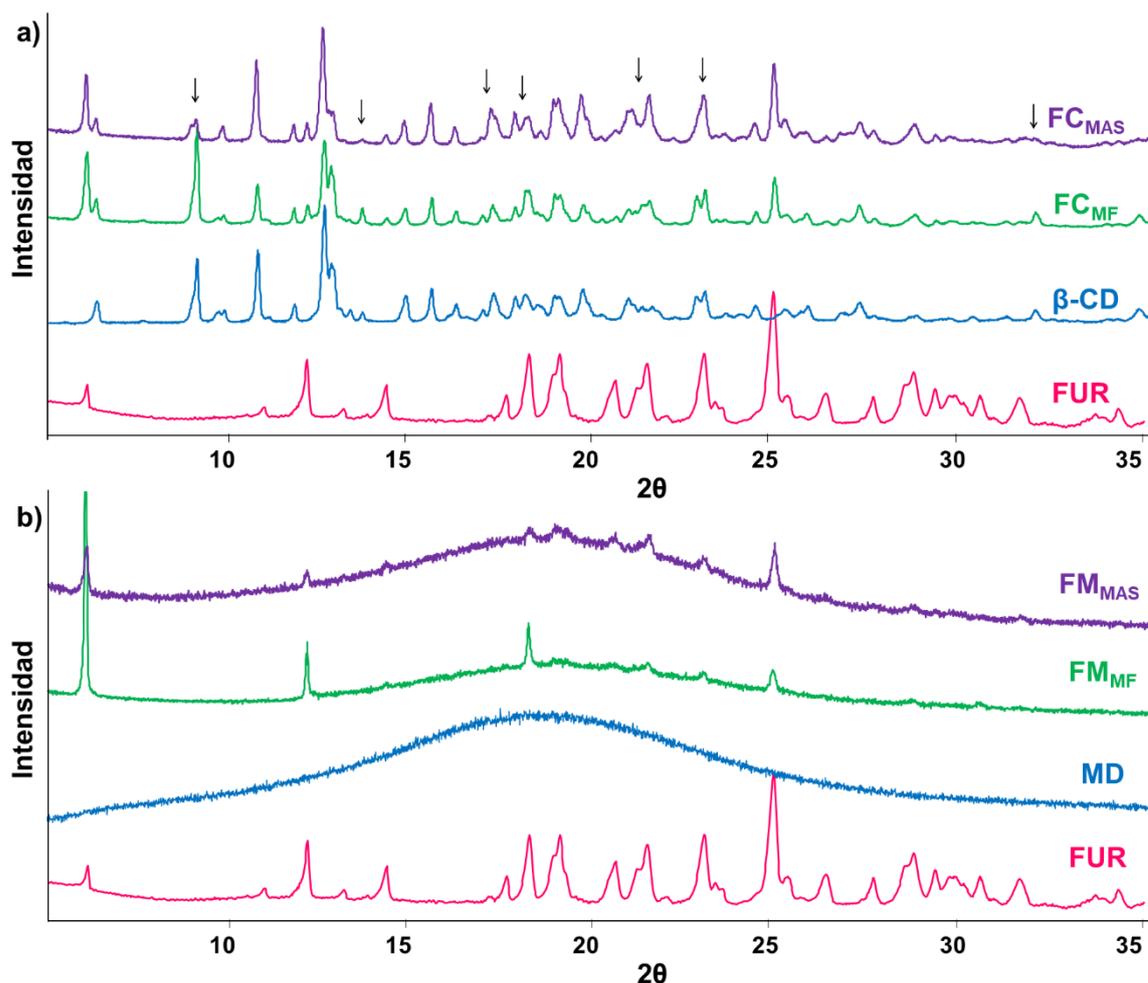


Figura 3.20. Patrones DRXP de: (a) FUR, β -CD, FC_{MF} , FC_{MAS} ; (b) FUR, MD, FM_{MF} , FM_{MAS} .

SISTEMA BINARIO CON TRIETANOLAMINA

Como se describió anteriormente, FUR forma un sistema soluble en solución con TEA^x mediado por interacciones iónicas. Teniendo en cuenta estos antecedentes y con el objetivo de confirmar la formación de este sistema en estado sólido, las muestras binarias obtenidas entre FUR y TEA se analizaron empleando diversas técnicas de caracterización.

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Los espectros FT-IR de FT_{MF} y FT_{MAS} (Figura 3.21) muestran la aparición de una nueva banda correspondiente al grupo COO^- a 1612 cm^{-1} . Adicionalmente, se puede apreciar la desaparición de la banda del IFA correspondiente al estiramiento $-NH$ de la amina secundaria (3353 cm^{-1}) y una de las bandas correspondientes al estiramiento $-NH$ de la sulfonamida se desplaza de 3285 cm^{-1} a 3236 cm^{-1} en FT_{MF} y a 3237 cm^{-1} en FT_{MAS} . Este comportamiento

^x El sistema soluble entre FUR y TEA se forma en agua y PBS cuando parte del IFA se encuentra ionizado como FUR^- .

sugiere que, tanto en el sólido preparado por MF como en el preparado por MAS, los componentes interaccionan de forma iónica formando una sal en estado sólido (al igual que ocurre en solución). El hecho de que en el espectro de FT_{MF} se observen las mismas modificaciones que en el espectro de FT_{MAS} podría deberse a que TEA es un líquido viscoso que puede actuar como solvente en la MF propiciando la interacción entre los componentes.

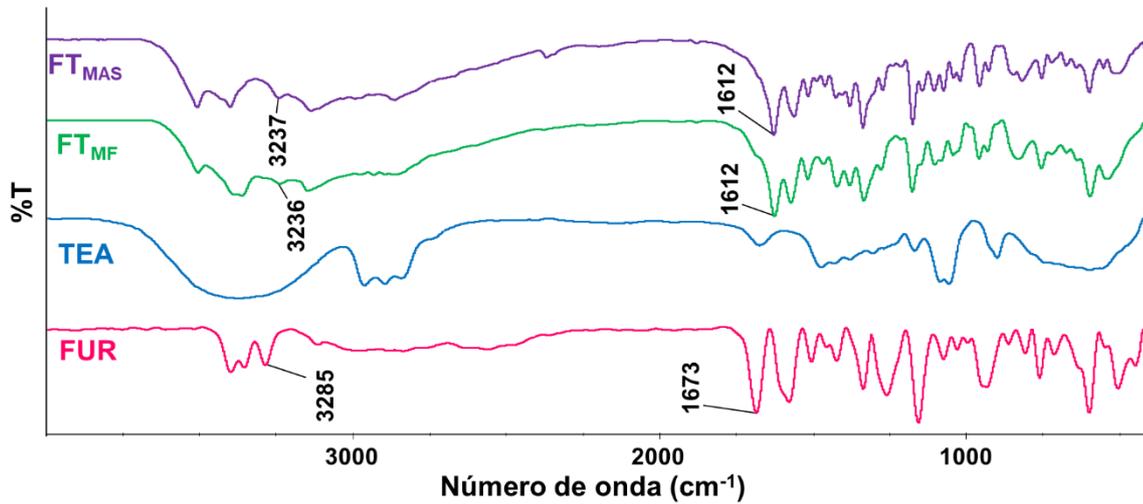


Figura 3.21. Espectros FT-IR de: FUR, TEA, FT_{MF} , FT_{MAS} .

ESPECTROSCOPIA RAMAN

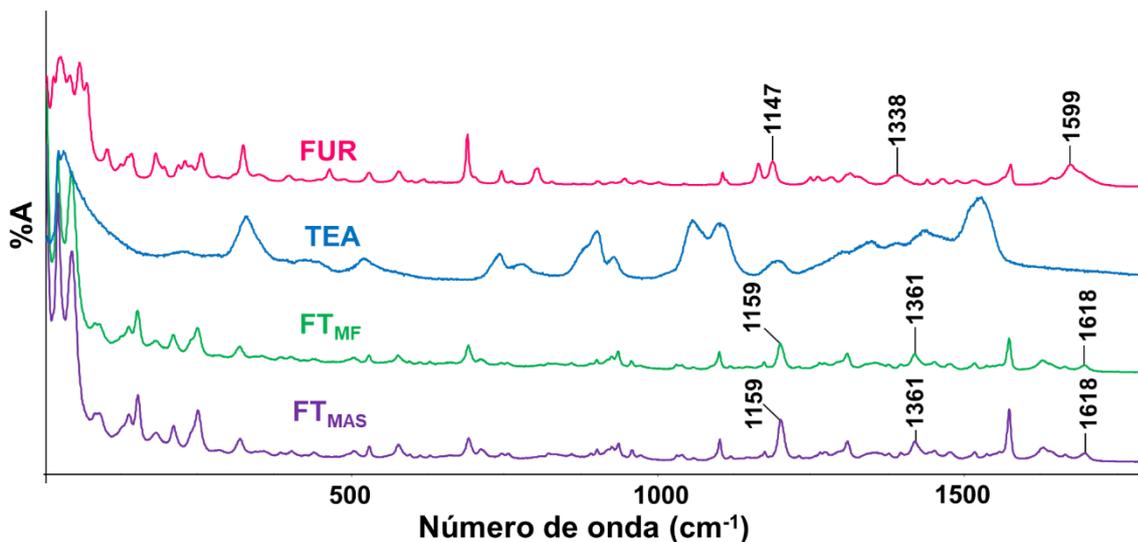


Figura 3.22. Espectros Raman de: FUR, TEA, FT_{MF} , FT_{MAS} .

En concordancia con lo observado mediante FT-IR, los espectros Raman de FT_{MF} y FT_{MAS} no exhiben diferencias entre ellos y, a su vez, se aprecia la aparición de la señal del grupo COO^- a 1618 cm^{-1} . Además, se puede observar que las dos bandas correspondientes al estiramiento del grupo $S=O$ se desplazan a frecuencias mayores, de 1338 cm^{-1} a 1361 cm^{-1} y de 1147 cm^{-1} a 1159 cm^{-1} (Figura 3.22).

Estos resultados sustentan la hipótesis de la existencia de interacciones del tipo iónicas entre FUR y TEA, formando una sal farmacéutica entre los componentes en estado sólido, independientemente de la técnica de preparación.

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO

A partir de un análisis detallado de los espectros ^{13}C CP-MAS de FT_{MF} y FT_{MAS} , se puede observar que éstos no presentan diferencias en la intensidad de las señales ni en las posiciones de desplazamiento químico. Sin embargo, las señales correspondientes a FUR se ven modificadas por la presencia de TEA. En la Figura 3.23 se puede apreciar la aparición de señales entre 50 y 55 ppm correspondientes a los C de la alcanolamina en los espectros de FT_{MF} y FT_{MAS} , y un desplazamiento leve de la señal del C5 de FUR de 38,8 ppm a 39,8 ppm. A su vez, se evidencia un corrimiento en las señales características de los C7, C9, C10, C8, C1, C4, C6 y C12 del IFA entre 100 y 180 ppm. Estos desplazamientos están plasmados en la Tabla 3.3.

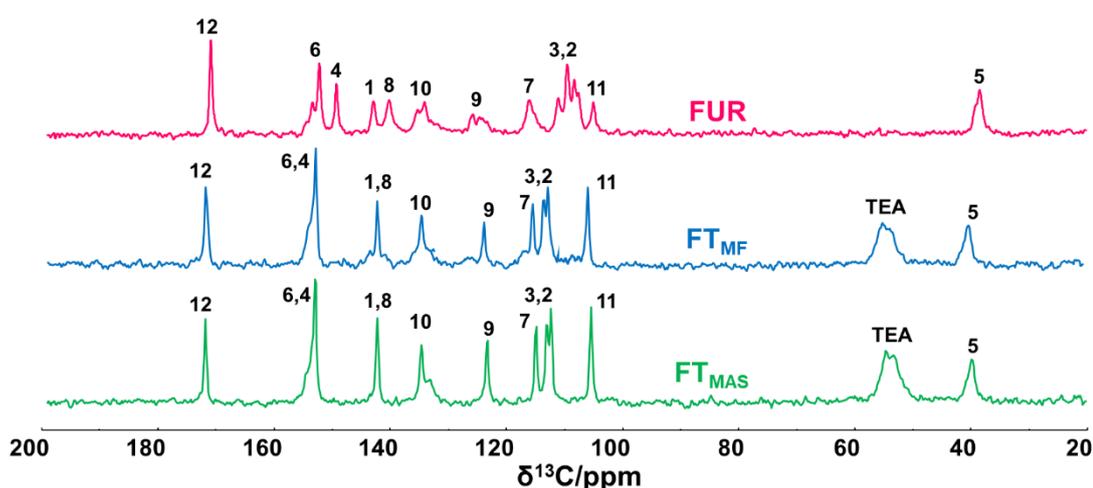


Figura 3.23. Espectros ^{13}C CP-MAS de: FUR, FT_{MF} , FT_{MAS} .

La similitud espectral de FT_{MF} y FT_{MAS} coincide con los resultados observados previamente por las otras técnicas espectroscópicas, confirmando que la interacción entre los componentes es independiente de la técnica de preparación.

Tabla 3.3. Desplazamientos de las señales de los C de FUR.

	C1 (ppm)	C4 (ppm)	C5 (ppm)	C6 (ppm)	C7 (ppm)	C8 (ppm)	C9 (ppm)	C10 (ppm)	C12 (ppm)
FUR	143,5	149,9	38,8	154,1 152,7	116,4	141,1	126,0 124,0	136,0 134,7	171,6
FT_{MF} y FT_{MAS}	142,9*	153,3 [#]	39,8	153,3 [#]	115,3	142,9*	123,7	135	172,9

* Las señales de los C1 y C8 aparecen juntas; # Las señales de los C4 y C6 aparecen juntas.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las imágenes de SEM de FT_{MF} y FT_{MAS} (Figura 3.24) evidencian cambios en el tamaño y en la morfología de las partículas, en comparación con las del fármaco libre. Las microfotografías de FT_{MAS} muestran estructuras compactas con formas irregulares y adherencia de partículas de diferentes tamaños. Esta notoria diferencia en la apariencia de las partículas puede atribuirse a la presencia de interacciones, evidenciada por las técnicas espectroscópicas, en estado sólido entre FUR y TEA. Adicionalmente, las partículas en las microfotografías de FT_{MF} no presentan diferencias morfológicas con las partículas de FT_{MAS} confirmando la formación del mismo tipo de sistema sólido a partir de ambas técnicas de preparación.

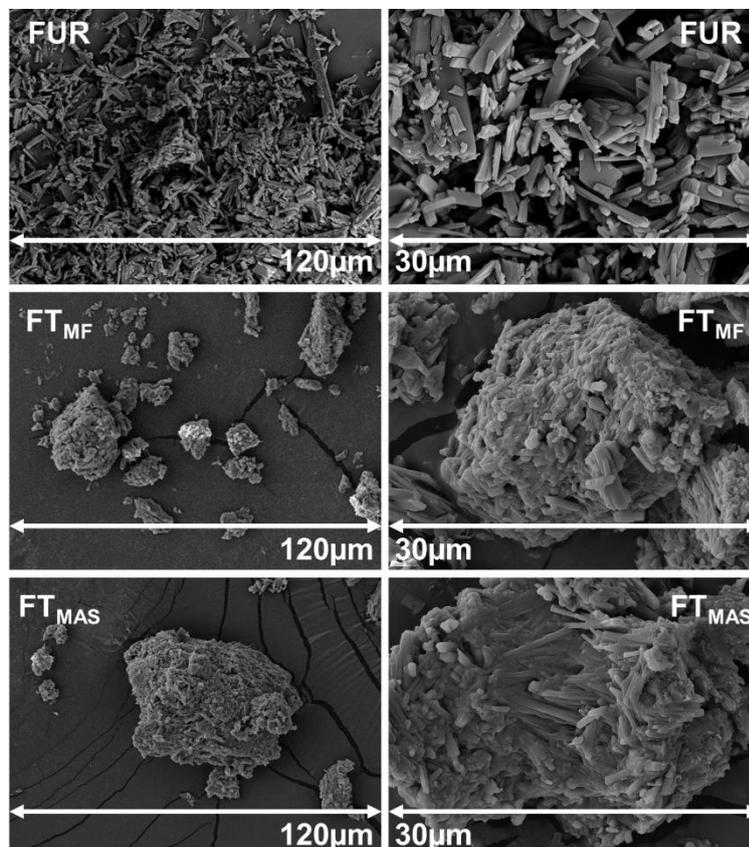


Figura 3.24. Microfotografías SEM de: FUR, FT_{MF}, FT_{MAS}.

ANÁLISIS TÉRMICO

El perfil DSC de TEA (Figura 25a) presenta una endoterma amplia típica de deshidratación entre 50 y 125 °C. Adicionalmente, por encima de 200 °C el perfil DSC exhibe dos endotermas con máximos a 245,1 y 302,3 °C asociadas a la descomposición de la alcanolamina, tal como lo confirma por la pérdida de peso en la curva TG.

Las curvas DCS de FT_{MF} y FT_{MAS} muestran la desaparición completa de los eventos térmicos de FUR y, a su vez, no evidencian diferencias entre ellas confirmando la formación del mismo tipo de sistema entre los componentes en ambas muestras. El proceso de deshidratación registrado por TG revela una pérdida de peso de 2,9% para FT_{MF} y de 2,5% para FT_{MAS}, mientras que se aprecia una pérdida de peso de 1% para TEA pura. A partir de las curvas TG se puede sugerir que la temperatura necesaria para degradar al fármaco libre es similar a la temperatura necesaria para degradar al fármaco en FT_{MF} y FT_{MAS}, lo que sugiere que la estabilidad térmica de FUR en estado sólido no se ve afectada al interaccionar con la alcanolamina.

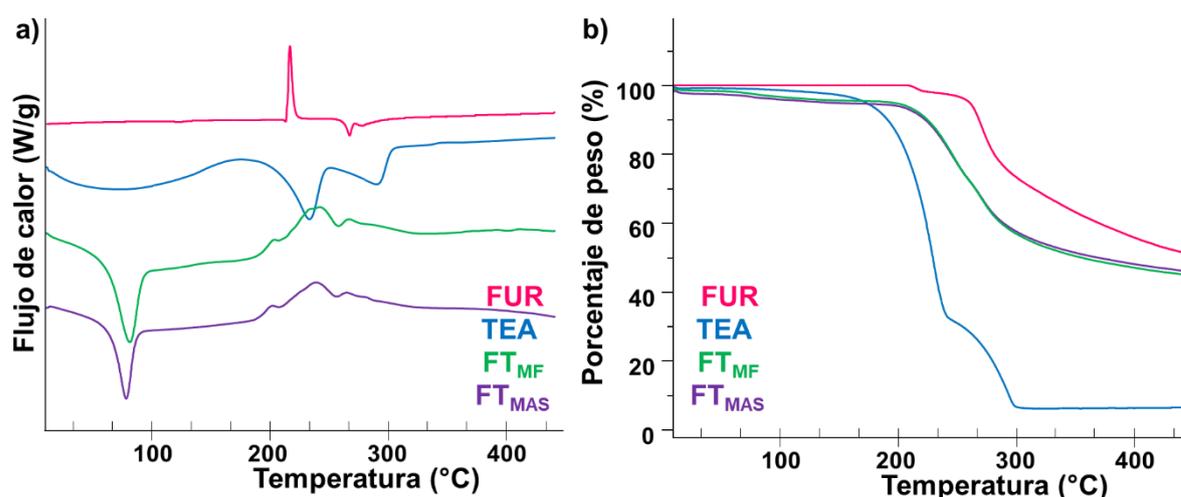


Figura 3.25. Perfil DSC (a) y curvas TG (b) de: FUR, TEA, FT_{MF}, FT_{MAS}.

DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO

Los resultados obtenidos con las distintas técnicas de caracterización utilizadas no evidencian diferencias significativas entre los sólidos FUR:TEA obtenidos por MF y MAS, sugiriendo que se obtiene el mismo sistema por ambas técnicas. Considerando estos resultados, se evaluó el efecto del método de preparación en la obtención del sistema FUR:TEA para lo cual se prepararon muestras por evaporación utilizando como solventes acetona y metanol.

La DRXP es una técnica que permite la identificación de fases cristalinas debido a que cada sólido cristalino posee un difractograma característico. Es por esto que los patrones de DRXP correspondientes a los sistemas binarios FUR:TEA (FT_{MF} , FT_{MAS} , FT_{EL}^A y FT_{EL}^M) se analizaron y compararon con el objetivo de confirmar si corresponden al mismo sistema sólido.

Como se puede apreciar en la Figura 3.26, es posible diferenciar el patrón de difracción de los diferentes sistemas respecto del patrón del IFA puro y en todos los casos los sistemas son sólidos cristalinos.

Los difractogramas de los sistemas FT_{MF} , FT_{MAS} , FT_{EL}^A y FT_{EL}^M no muestran diferencias significativas entre ellos revelando que se trata del mismo sólido cristalino. Estos resultados confirman que se produce el mismo tipo de interacción entre los componentes en las muestras obtenidas por diferentes métodos de preparación, sustentando los resultados obtenidos por espectroscopia FT-IR, Raman y RMNss, SEM y análisis térmico para FT_{MF} y FT_{MAS} .

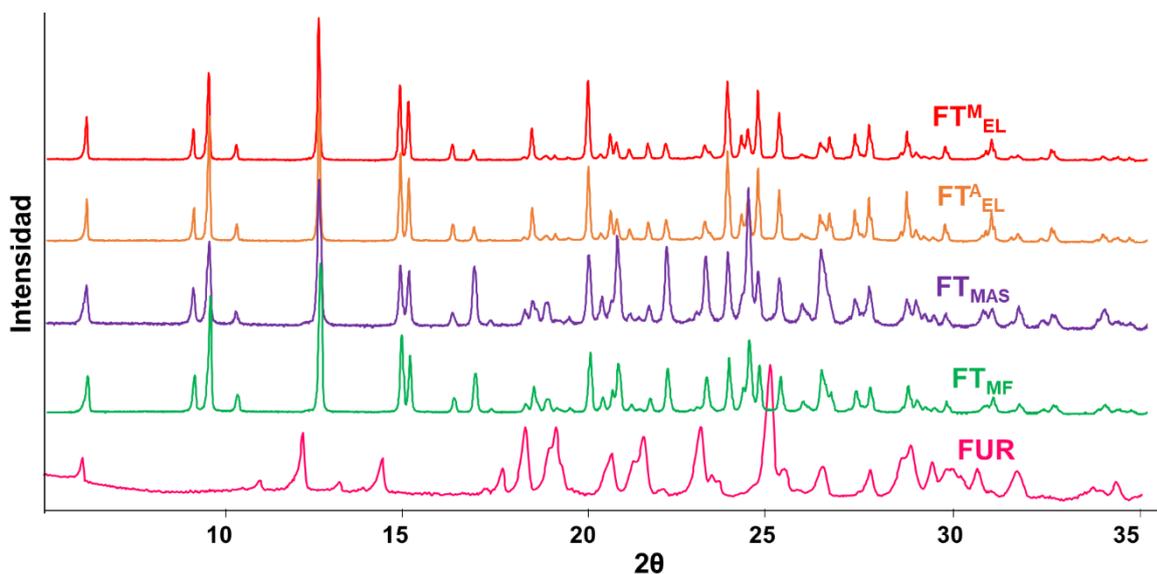


Figura 3.26. Patrones DRXP de: FUR, FT_{MF} , FT_{MAS} , FT_{EL}^A , FT_{EL}^M .

Teniendo en cuenta que independientemente de la técnica de preparación utilizada (MAS, MF, EL) se obtiene una sal farmacéutica cristalina entre FUR y TEA, de ahora en adelante se denominará a este sistema supramolecular FT.

SISTEMAS TERNARIOS CON TRIETANOLAMINA Y OLIGOSACÁRIDOS

Como se describió anteriormente (página 102) FUR forma un complejo de inclusión cristalino con β -CD, un complejo de inclusión amorfo con MD y una sal farmacéutica cristalina con TEA cuando se emplean las técnicas de preparación descriptas. Teniendo en cuenta

estos antecedentes y con el objetivo de confirmar la formación de sistemas supramoleculares ternarios entre estos componentes, las muestras obtenidas entre FUR, TEA y β -CD y entre FUR, TEA y MD se analizaron empleando diferentes técnicas de caracterización.

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Los espectros FT-IR de FTC_{MF} y FTC_{MAS} (Figura 3.27a) evidencian la desaparición de la banda correspondiente al estiramiento del grupo $-NH$ de la amina secundaria de FUR y la aparición de la banda correspondiente al COO^- (1617 cm^{-1}), coincidiendo con el comportamiento observado para el sistema binario FT (Figura 3.21, página 104). Además, puede distinguirse el desplazamiento de las bandas correspondientes a $S=O$ de 1324 cm^{-1} a 1328 cm^{-1} y de 1141 cm^{-1} a 1159 cm^{-1} , al igual que se observó en el espectro de FC_{MAS} (Figura 3.14, página 97). Estos cambios espectrales sugieren que, al combinar los 3 componentes, FUR interacciona tanto con TEA (con interacciones iónicas) como con β -CD (mediante enlaces puente hidrógeno). Como en el sistema FUR:TEA, en las muestras ternarias FUR:TEA: β -CD se producen interacciones en los sólidos obtenidos por MF y MAS, debido a que el ligando TEA actúa como solvente en la MF favoreciendo la interacción entre los componentes.

De forma similar, el comportamiento espectral de FTM_{MF} es igual al de FTM_{MAS} debido al efecto que presenta TEA de actuar como solvente (Figura 3.27b). En ambos casos es posible observar que la banda que en FUR aparece a 1567 cm^{-1} (correspondiente a las vibraciones de estiramiento del grupo $-NH$ de la sulfonamida) se ve apantallada por el espectro de MD, disminuida en intensidad y desplazada a frecuencias inferiores de 1553 cm^{-1} . Dicha modificación espectral sugiere que, en el nuevo sistema sólido, el grupo sulfonamida del IFA participa en la interacción con los otros componentes. Sin embargo, salvo en esa banda, los espectros obtenidos para FTM_{MF} y FTM_{MAS} son similares al espectro de MD, lo que puede deberse a la cantidad de MD presente en la muestra. Si bien la relación es equimolar (1:1:1) entre los componentes, la diferencia en sus PM (PM_{FUR} : $330,74\text{ g/mol}$, PM_{TEA} : $149,18\text{ g/mol}$ y PM_{MD} : 10370 g/mol) hace que la cantidad en masa de MD sea considerablemente superior a la de FUR y TEA.

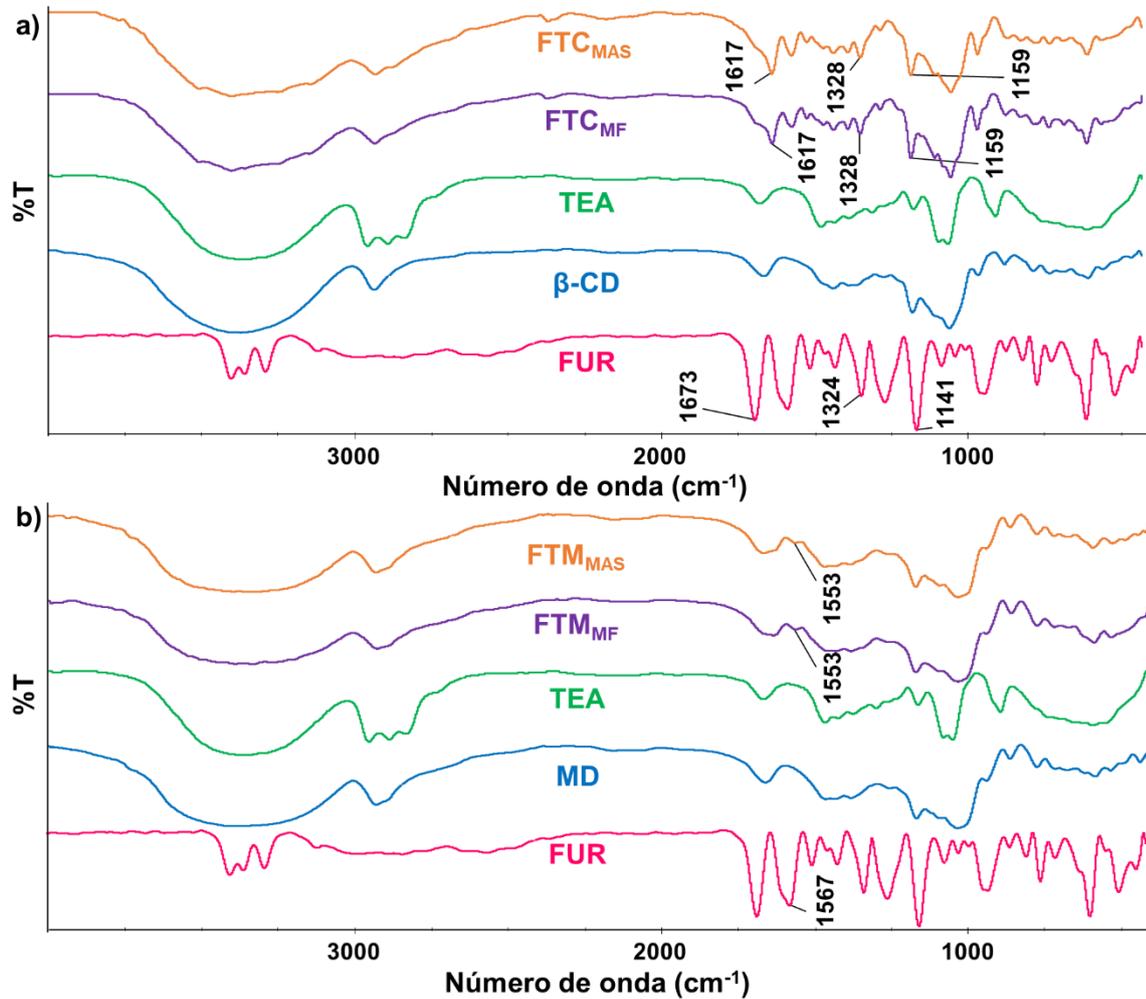


Figura 3.27. Espectros FT-IR de: (a) FUR, β-CD, TEA, FTC_{MF}, FTC_{MAS}; (b) FUR, MD, TEA, FTM_{MF}, FTM_{MAS}.

ESPECTROSCOPIA RAMAN

En el espectro Raman de FTC_{MF} se puede observar una señal de TEA (1) y otra de FUR (2) que no se encuentran presentes en el espectro de FTC_{MAS}, así como en FTC_{MAS} se aprecia una señal de β-CD (3) que no está presente en la MF (estas señales se pueden ver marcadas en la Figura 3.28a con flechas). No obstante, estas bandas representan señales sin alterar de los componentes puros y no participan en las interacciones que se están originando entre los componentes. Adicionalmente, en los espectros Raman de FTC_{MF} y FTC_{MAS} se puede apreciar la aparición de la señal correspondiente al grupo COO⁻ a 1619 cm⁻¹, coincidiendo con el comportamiento observado para el sistema binario FT (Figura 3.22, página 104), así como el desplazamiento de una de las bandas correspondientes al grupo S=O de 1147 cm⁻¹ a 1159 cm⁻¹, sustentando los resultados obtenidos mediante FT-IR que sugieren que FUR interacciona tanto con TEA como con β-CD en los sistemas multicomponentes FTC_{MF} y FTC_{MAS}.

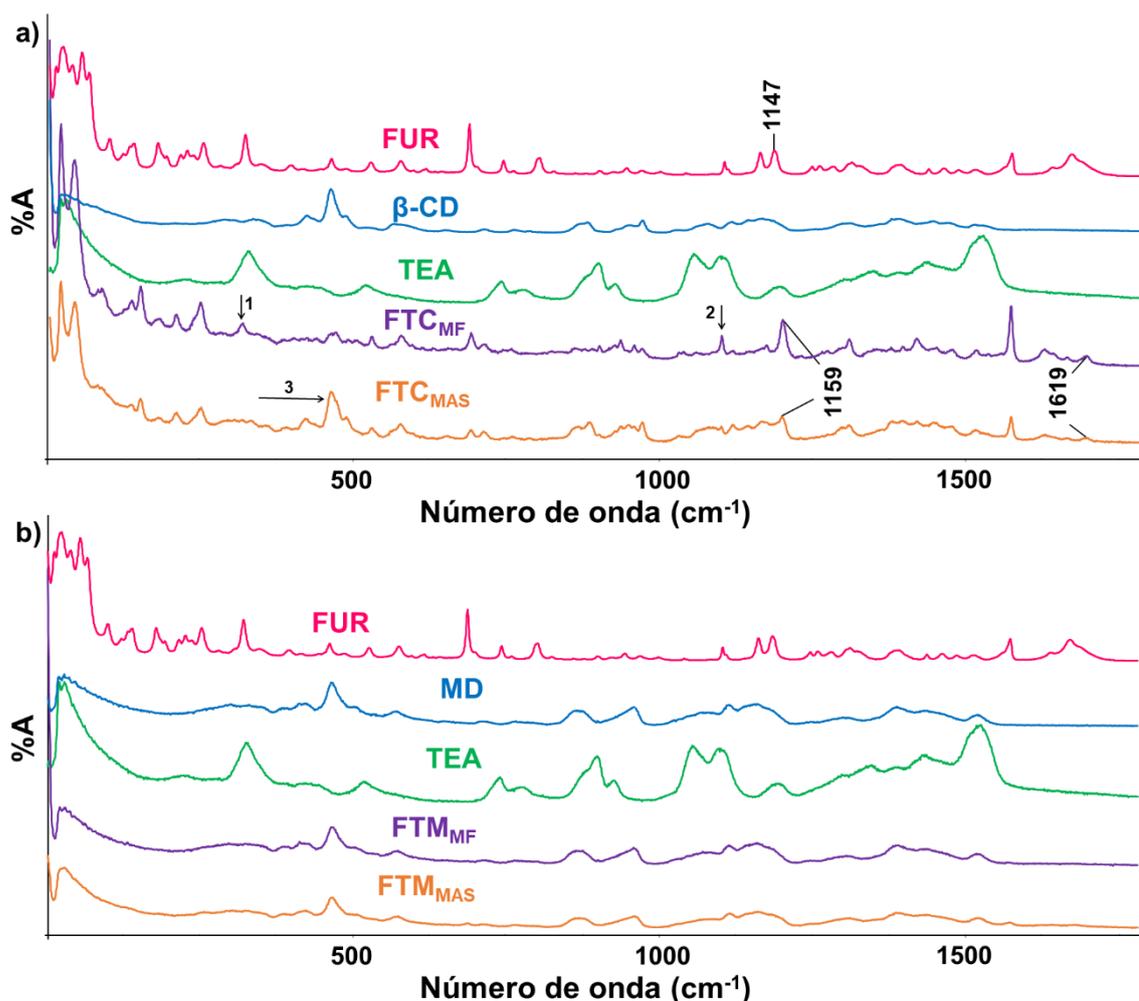


Figura 3.28. Espectros Raman de: (a) FUR, β -CD, TEA, FTC_{MF} , FTC_{MAS} ; (b) FUR, MD, TEA, FTM_{MF} , FTM_{MAS} .

Por otro lado, como ocurre en los espectros FT-IR, no se observan diferencias entre los espectros Raman de los sistemas FTM_{MF} y FTM_{MAS} , ni con el espectro de MD. Este comportamiento puede atribuirse a la cantidad de oligosacárido presente en los sólidos y a la capacidad de dispersar y emitir la luz de cada uno de los componentes (Figura 3.28b).

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO

El espectro ^{13}C CP-MAS de β -CD se corresponde con un sólido cristalino ya que se caracteriza por poseer resonancias múltiples y agudas para cada tipo de átomo de carbono (C1, 101-104 ppm; C4, 80-85 ppm; C2,3,5, 72-76 ppm; C6, 58-65 ppm), las cuales se atribuyen a más de una conformación o entornos de empaquetamiento. Estas características se han correlacionado con diferentes ángulos de torsión de los enlaces α 1 \rightarrow 4 y con los ángulos de torsión que describen la orientación de los grupos hidroxilos.¹²⁷ Al comparar los

espectros de las sustancias puras, se puede observar que la única superposición de señales entre FUR y β -CD es entre el C11 y el C1', respectivamente (Figura 3.29a). Por el contrario, las señales anchas en el espectro de MD (Figura 3.29b) confirman que se trata de un sólido amorfo con resonancias de 400 Hz de ancho.⁹³ Adicionalmente, se puede apreciar que las señales en el espectro de MD se encuentran dentro de la región 58-107 ppm, prácticamente separadas de las señales del espectro de FUR.

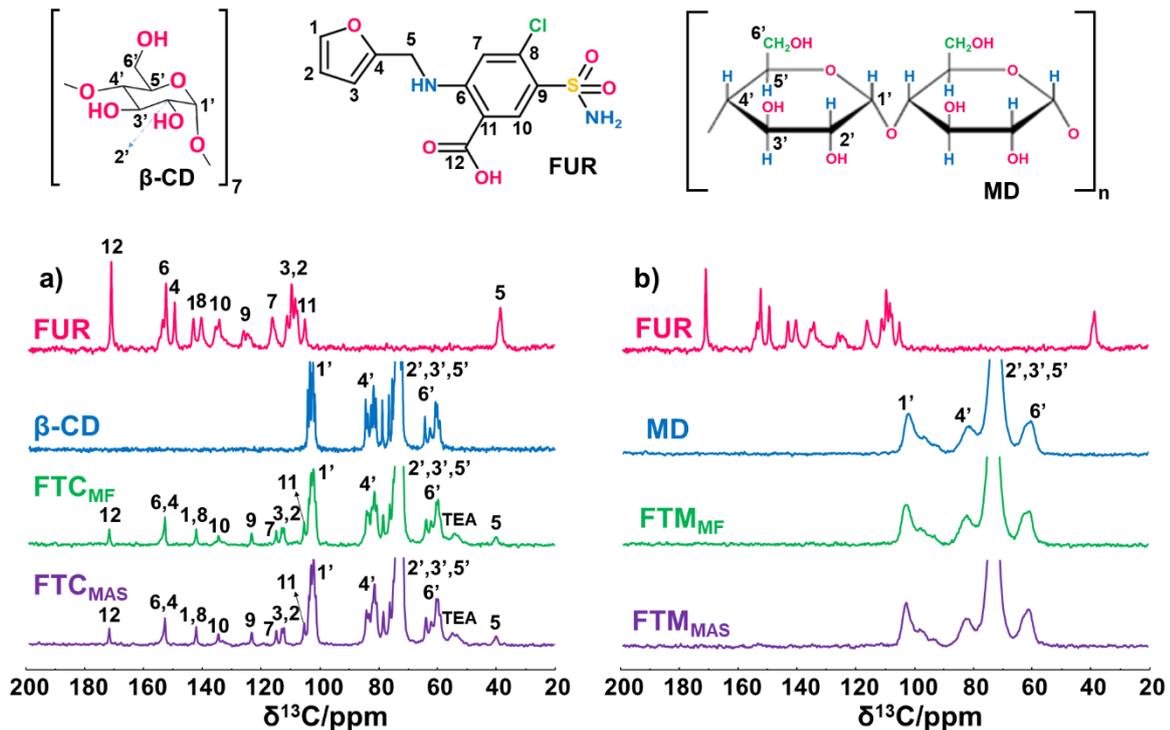


Figura 3.29. Espectros ^{13}C CP-MAS de: (a) FUR, β -CD, FTC_{MF} , FTC_{MAS} ; (b) FUR, MD, FTM_{MF} , FTM_{MAS} .

Los espectros ^{13}C CP-MAS de los sistemas ternarios FTC_{MF} y FTC_{MAS} (Figura 3.29a) evidencian similitud en la intensidad de las señales y en las posiciones de los desplazamientos químicos. Además, las señales correspondientes a FUR [modificadas por la presencia de TEA (Figura 3.23, página 105)] pueden reconocerse en ambos espectros sugiriendo una fuerte interacción, principalmente entre FUR y TEA y en menor medida con β -CD. Las semejanzas encontradas en los espectros de FTC_{MF} y FTC_{MAS} evidencian que las interacciones entre los componentes ocurren de la misma manera en ambos sistemas ternarios, sustentando los resultados de las espectroscopias FT-IR y Raman.

Como era de esperarse teniendo en cuenta los resultados de FT-IR y Raman, los espectros ^{13}C CP-MAS de FTM_{MF} y FTM_{MAS} (Figura 3.29b) sólo muestran la señal MD, debido

a la cantidad de oligosacárido en la muestra, impidiendo la extracción de cualquier información espectroscópica en estos sistemas.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las microfotografías de las muestras ternarias obtenidas por MAS (FTC_{MAS} y FTM_{MAS}) muestran partículas de forma irregular con cambios en el tamaño y en la morfología con respecto a los componentes puros correspondientes, sugiriendo la formación de nuevas fases sólidas entre FUR y los ligandos en estado sólido (Figura 3.30). En particular, en las imágenes de FTC_{MAS} se exhiben estructuras rugosas compactas de diferentes tamaños, mientras que para FTM_{MAS} se observa un sistema compacto de superficie lisa, con forma irregular y adherencia de partículas de diferentes tamaños.

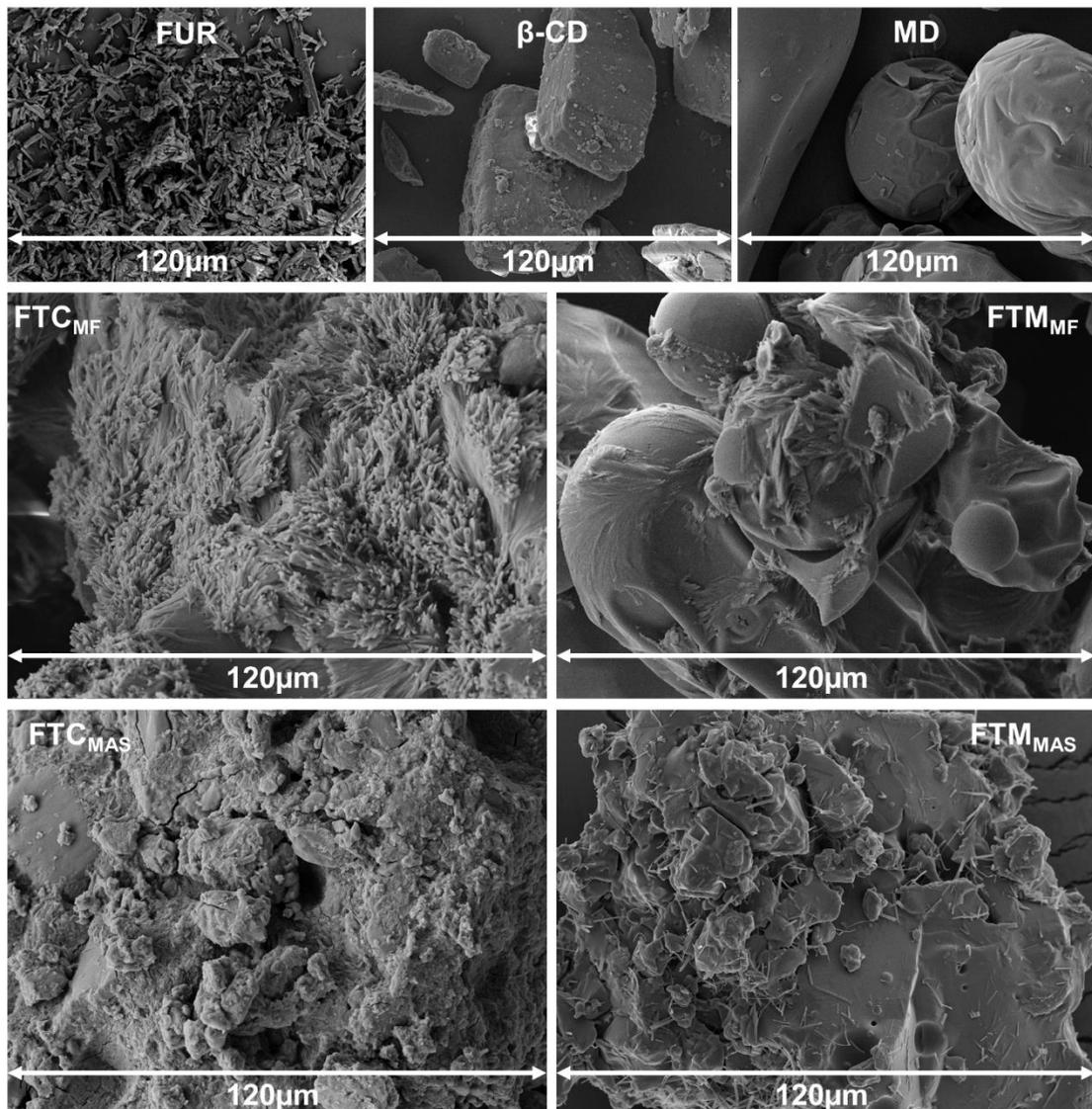


Figura 3.30. Microfotografías SEM de: FUR , β - CD , MD y de los sistemas ternarios.

Por otro lado, las microfotografías de FTC_{MF} y FTM_{MF} muestran ligeras diferencias con las de los sistemas obtenidos por MAS, sin embargo, la forma y el tamaño de las partículas en ambas muestras difieren completamente de las de los componentes puros. En la microfotografía de FTC_{MF} se observan estructuras finas y alargadas unidas a una base de mayor tamaño, mientras que en la imagen de FTM_{MF} se aprecian estructuras lisas con pequeñas adherencias a la superficie.

Las microfotografías de los sistemas ternarios FTC_{MAS} y FTM_{MAS} se asemejan a las de los sistemas binarios FC_{MAS} (Figura 3.16, página 99) y FM_{MAS} (Figura 3.17, página 100), respectivamente. Mientras que las imágenes de los sistemas FTC_{MF} y FTM_{MF} se aproximan más a las del sistema binario FT (Figura 3.24, página 106).

Las diferencias morfológicas entre muestras obtenidas por MF y MAS, observadas en las imágenes de SEM, podrían atribuirse a la metodología utilizada para obtener los diferentes sistemas, ya que el tiempo de malaxado es considerablemente superior en los sistemas obtenidos por MAS. Sin embargo, el cambio drástico en la forma y el aspecto de las partículas de todos los sistemas obtenidos confirma la presencia de nuevas fases sólidas.

ANÁLISIS TÉRMICO

Las curvas DCS de los sistemas ternarios (Figura 3.31) muestran la desaparición completa de los eventos térmicos de FUR confirmando la interacción molecular del fármaco con los ligandos. En particular, las curvas de FTC_{MF} y FTC_{MAS} evidencian algunas diferencias entre ellas hasta 150 °C y luego son muy similares. Por otro lado, los perfiles de FTM_{MF} y FTM_{MAS} no muestran diferencias significativas entre ellos.

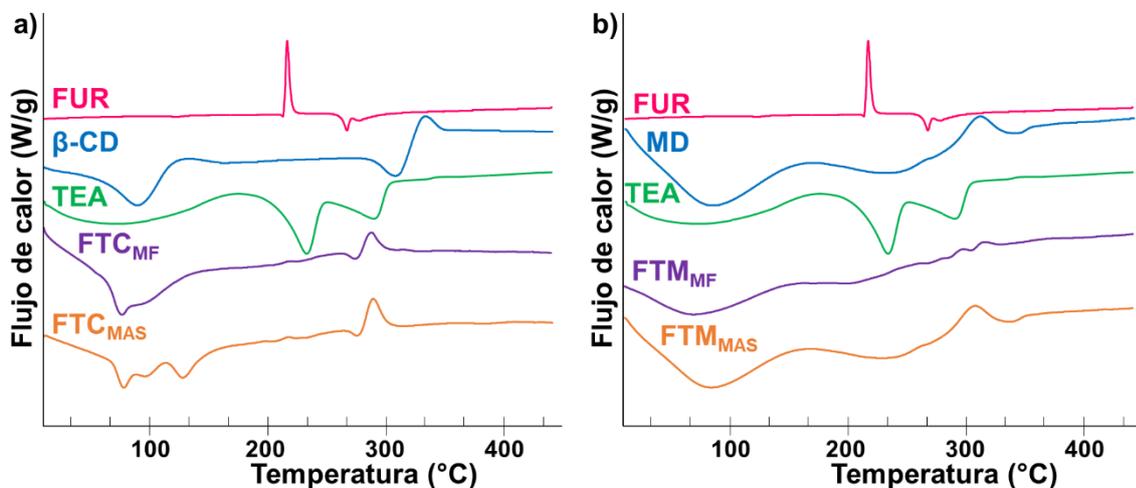


Figura 3.31. Perfil DSC de: (a) FUR, β -CD, TEA, FTC_{MF} , FTC_{MAS} ; (b) FUR, MD, TEA, FTM_{MF} , FTM_{MAS} .

Las curvas TG revelan un proceso de deshidratación con una pérdida de masa de 8,4% para FTC_{MAS} , de 8,3% para FTC_{MF} , de 6,1% para FTM_{MAS} y de 6,3% para FTM_{MF} (Figura 3.32), en comparación con una pérdida de masa de 1% para TEA, de 9% para β -CD y de 4,5% para MD.

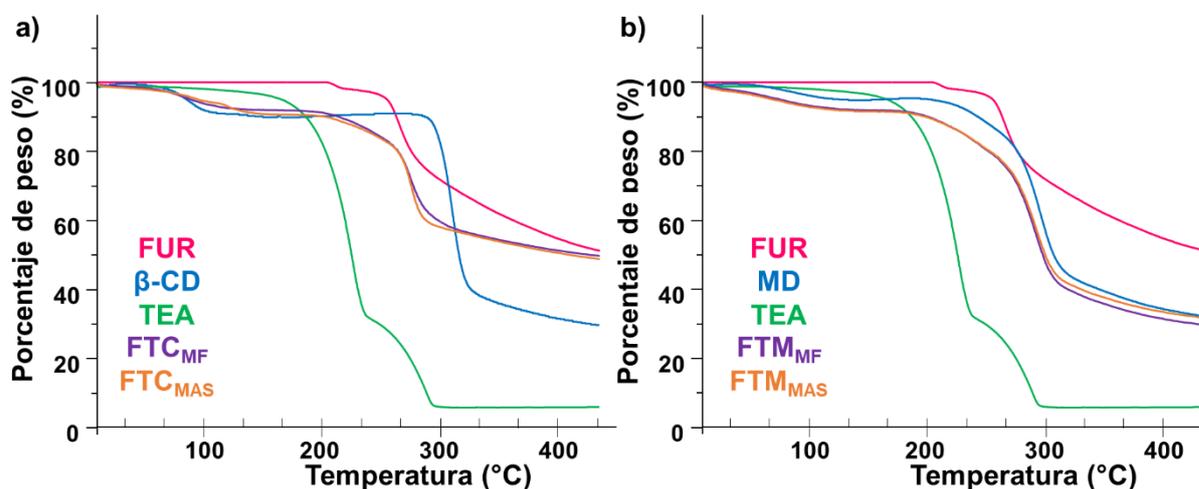


Figura 3.32. Curvas TG de: (a) FUR, β -CD, TEA, FTC_{MF} , FTC_{MAS} ; (b) FUR, MD, TEA, FTM_{MF} , FTM_{MAS} .

En las curvas TG (Figura 3.32) se puede apreciar que la temperatura necesaria para degradar a FUR es similar a la temperatura necesaria para degradar al IFA en FTC_{MF} , FTC_{MAS} , FTM_{MF} y FTM_{MAS} , lo que sugiere que la estabilidad térmica de FUR en estado sólido no se ve afectada al interactuar con los diferentes componentes.

DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO

En los difractogramas de FTC_{MF} y FTC_{MAS} se observan señales características de β -CD y señales de FUR indicando que la naturaleza cristalina del fármaco se mantiene en ambos casos [el mismo comportamiento se observó en los sistemas binarios de FUR con β -CD (Figura 3.20, página 103) y de FUR con TEA (Figura 3.26, página 108) descritos anteriormente]. Además, no se aprecian diferencias entre los patrones de difracción de FTC_{MF} y FTC_{MAS} confirmando que a partir de ambos métodos de preparación se obtiene el mismo sólido cristalino (Figura 3.33a).

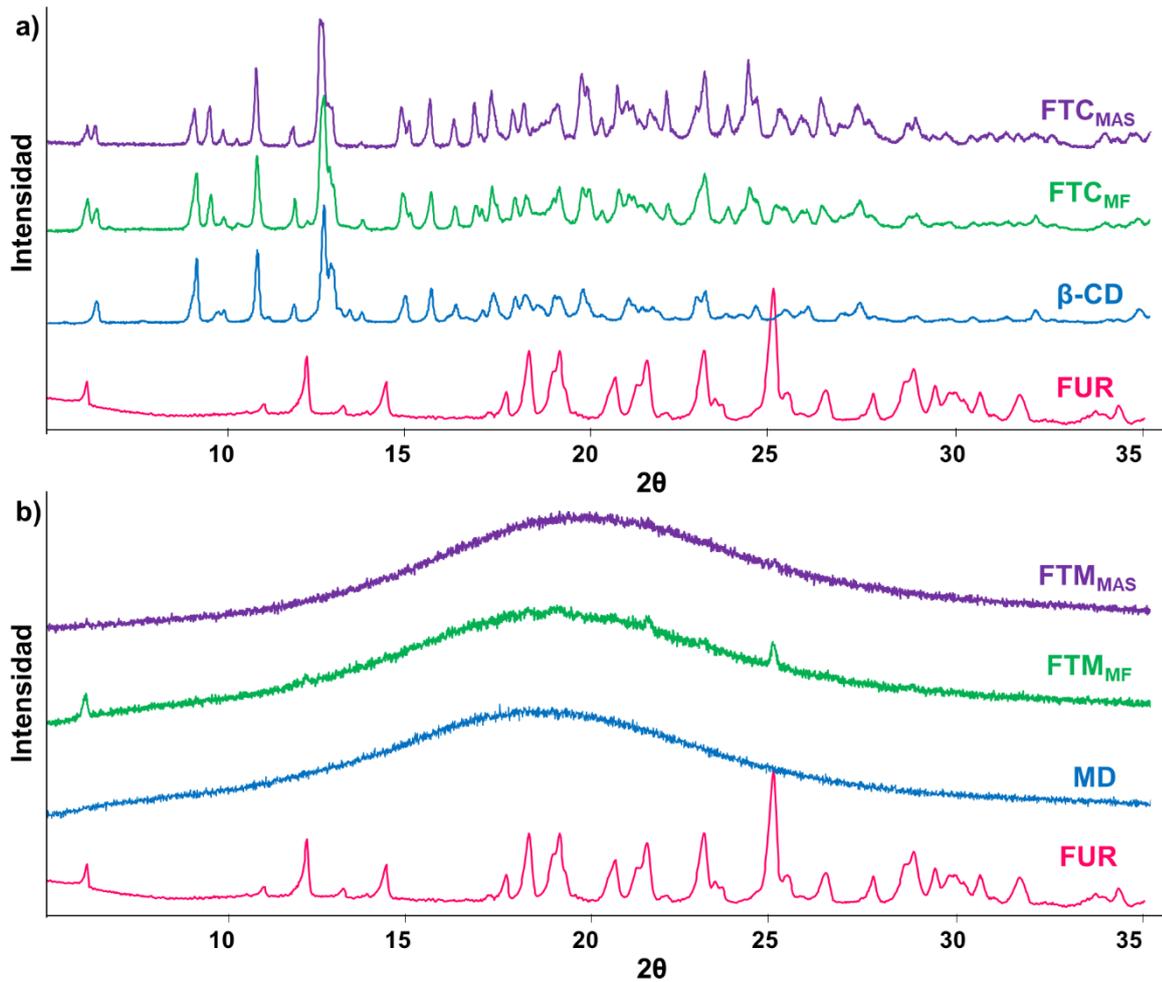


Figura 3.33. Patrones DRXP de: (a) FUR, β -CD, FTC_{MF} , FTC_{MAS} ; (b) FUR, MD, FTM_{MF} , FTM_{MAS} .

Por otro lado, los patrones de difracción de FTM_{MF} y FTM_{MAS} (Figura 3.33b) muestran una disminución en el grado de cristalinidad del fármaco al igual que se pudo apreciar anteriormente para el sistema binario FUR:MD (Figura 3.20, página 103). Adicionalmente, aunque fue posible observar algunos picos característicos de FUR en FTM_{MF} , estos picos no aparecen en FTM_{MAS} lo que puede atribuirse al tiempo de malaxado aplicado en cada una de las técnicas de preparación.

Los resultados obtenidos por todas las técnicas de caracterización empleadas, sumado al cambio en el aspecto de las partículas observado por SEM, confirman que existen interacciones en estado sólido entre los componentes donde, por un lado, FTC_{MF} y FTC_{MAS} y, por el otro, FTM_{MF} y FTM_{MAS} forman un mismo sistema sólido, que de ahora en adelante se llamarán FTC y FTM, respectivamente.

SISTEMA BINARIO CON ARGININA

Teniendo en cuenta que FUR forma un sistema soluble en solución con ARG^{xi}, mediado por interacciones iónicas, y con el objetivo de confirmar la formación de este sistema en estado sólido, las muestras binarias obtenidas entre FUR y ARG por MAS y MF se analizaron utilizando diversas técnicas de caracterización.

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Los espectros de FA_{MF} y FA²_{MF} no muestran diferencias entre ellos y corresponden simplemente a la superposición de los espectros FT-IR de los componentes puros. A su vez, en el espectro FT-IR del sistema binario FA_{MAS} se aprecia la aparición de una nueva banda a 1611 cm⁻¹ que corresponde al grupo COO⁻ y el desplazamiento de las bandas correspondientes a S=O de 1324 cm⁻¹ a 1311 cm⁻¹ y de 1141 cm⁻¹ a 1147 cm⁻¹. Por su parte, el espectro del sistema FA²_{MAS} no muestra diferencias en comparación con FA_{MAS} (Figura 3.34).¹²⁸ A partir de estos resultados se puede decir que en las MF no se observan interacciones entre FUR y ARG. Por el contrario, en ambos sistemas obtenidos por MAS se origina la formación del ion COO⁻, lo que indica la presencia de interacciones del tipo iónicas entre FUR y ARG revelando en ambos casos la formación de una sal farmacéutica. Este comportamiento evidenciado entre ambos componentes concuerda con el trabajo de Jensen y colaboradores,¹²⁹ donde se informa la obtención de una sal entre FUR y ARG mediante la técnica de molienda de bolas.

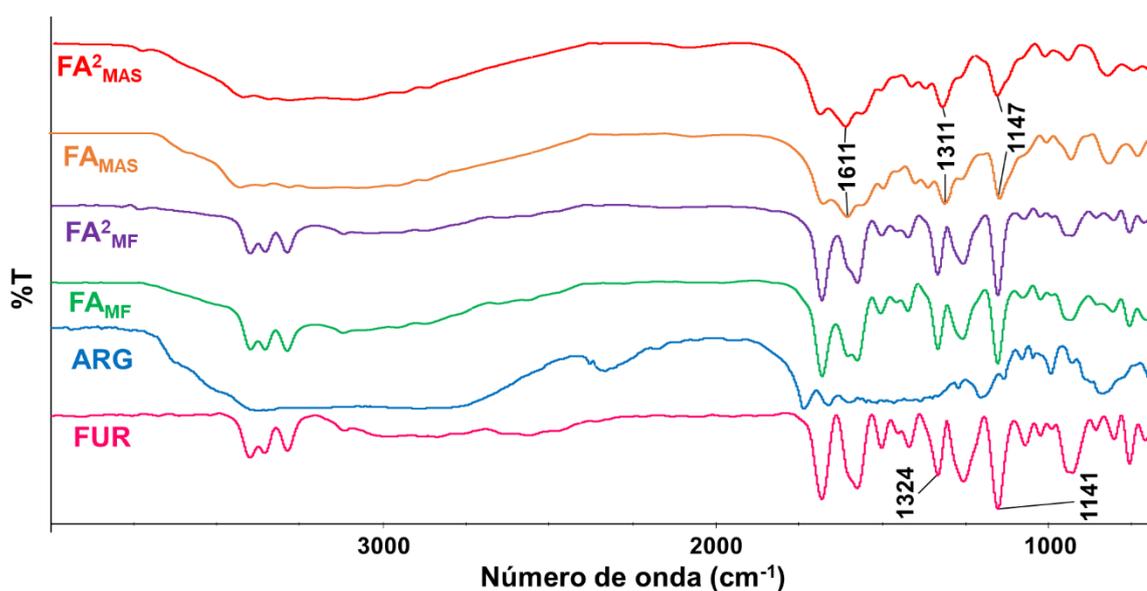


Figura 3.34. Espectros FT-IR de: FUR, ARG, FA_{MF}, FA²_{MF}, FA_{MAS}, FA²_{MAS}.

^{xi} El sistema soluble entre FUR y ARG se forma en agua y PBS cuando parte del IFA se encuentra ionizado como FUR⁻.

ESPECTROSCOPIA RAMAN

Los espectros Raman de ambas MF muestran la superposición de los espectros de los componentes puros. Por otra parte, en los espectros de FA_{MAS} y FA^2_{MAS} , que no muestran diferencias entre ellos, se evidencian pequeños desplazamientos y desaparición de algunas señales de FUR y ARG sumado a un corrimiento de las dos bandas correspondientes al estiramiento del grupo S=O de 1338 cm^{-1} a 1369 cm^{-1} y de 1147 cm^{-1} a 1156 cm^{-1} (Figura 3.35).¹²⁸ Estos resultados son consistentes con los obtenidos por espectroscopia FT-IR.

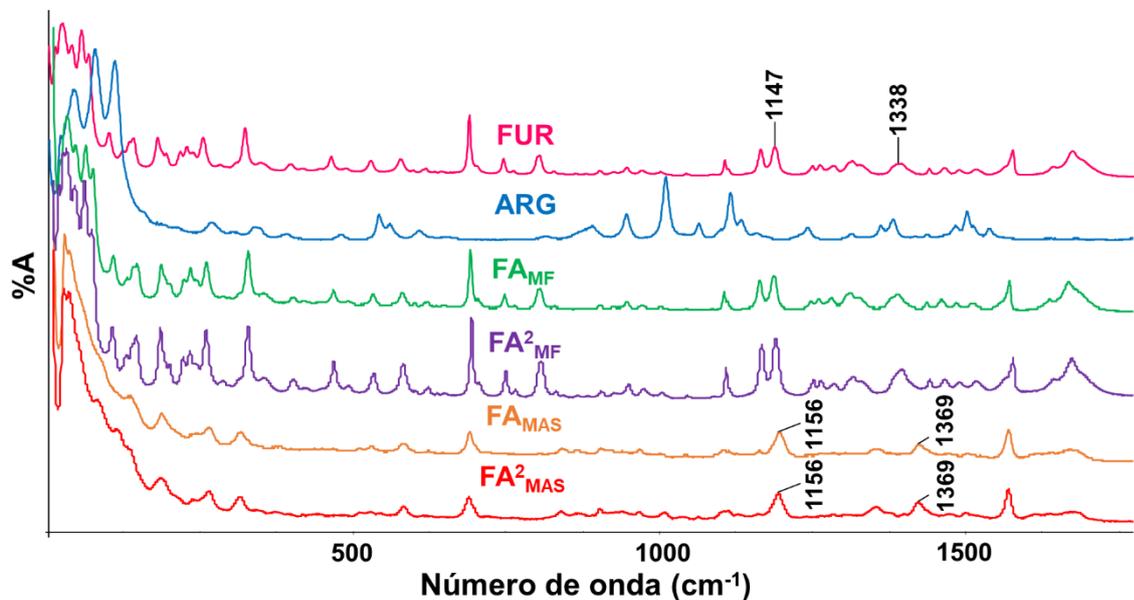


Figura 3.35. Espectros Raman de: FUR, ARG, FA_{MF} , FA^2_{MF} , FA_{MAS} , FA^2_{MAS} .

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO

Los espectros ^{13}C CP-MAS de FUR y ARG, previamente analizados, se corresponden con sólidos cristalinos ya que presentan resonancias agudas para cada tipo de átomo de carbono. Los espectros de FA_{MF} y FA^2_{MF} evidencian similitudes en las posiciones de los desplazamientos químicos de los componentes de partida, indicando que no existen interacciones entre los componentes y que ambos mantienen su estructura cristalina. Sin embargo, existe modificación en la intensidad de las señales del C1' de ARG donde disminuyen las señales que aparecen a 179,1 y 180,4 ppm e incrementa la señal originada a 181,8 ppm (Figura 3.36). Adicionalmente, en el espectro de FA^2_{MF} se puede apreciar que las señales correspondientes a los carbonos de ARG son más intensas que en FA_{MF} debido a la cantidad del AA en cada una de las muestras.

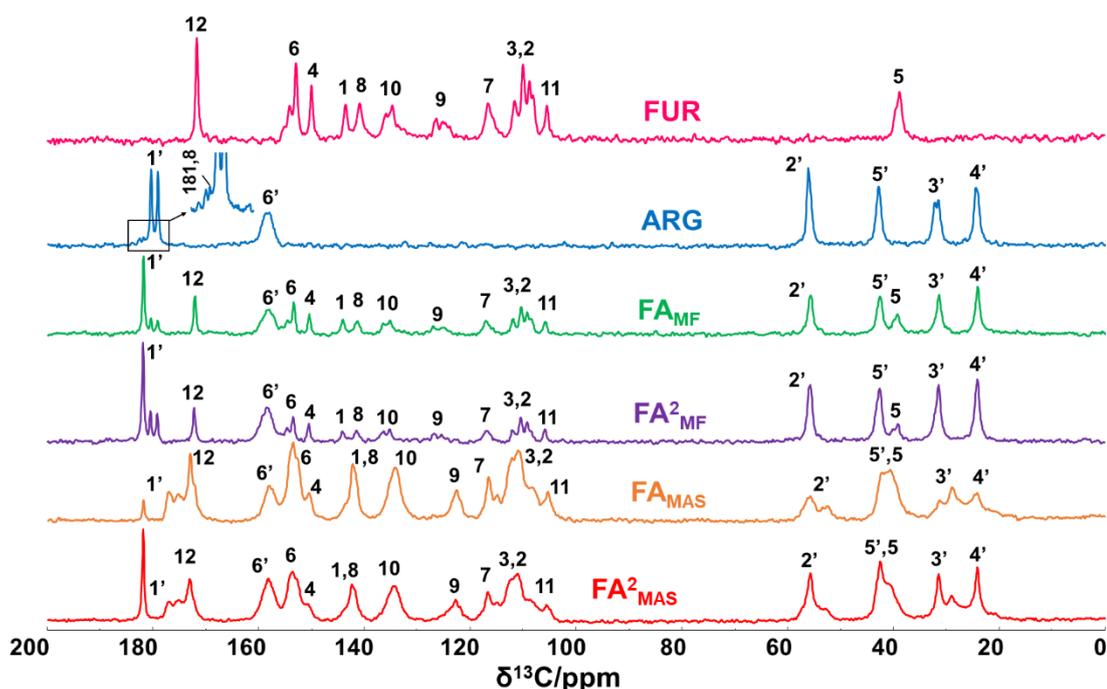


Figura 3.36. Espectros ^{13}C CP-MAS de: FUR, ARG, FA_{MF} , FA^2_{MF} , FA_{MAS} , FA^2_{MAS} .

Por el contrario, los picos anchos en los espectros de FA_{MAS} y FA^2_{MAS} sugieren que existe una disminución en la cristalinidad de los sistemas sólidos con respecto a la cristalinidad de los componentes de partida, pero las señales correspondientes a FUR, modificadas por la presencia de ARG, pueden reconocerse en ambos espectros. Los principales desplazamientos en los carbonos de FUR en los espectros de FA_{MAS} y FA^2_{MAS} ocurren en el C12 de 171,6 ppm a 173 ppm, los C1 y C8 que pasan de presentar dos señales a 143,5 y 141,1 ppm a evidenciar sólo una a 142 ppm, el C9 que pasa de dos señales a 126 y 124 ppm a una señal a 122,6 ppm y el C5 que se solapa con la señal del C5' de ARG. Además, dos de las señales del C1' de ARG se desplazan de 180,4 ppm a 177 ppm y de 179,1 ppm a 175,3 ppm. Las semejanzas encontradas en los espectros de FA_{MAS} y FA^2_{MAS} evidencian que las interacciones entre los componentes ocurren de la misma manera en ambos sistemas binarios, sin embargo, ambos espectros difieren principalmente entre 50 y 60 ppm y entre 170 y 180 ppm en la intensidad de algunas señales originadas por ARG debido a diferencia de cantidad del AA en cada sistema.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

En las imágenes de FA_{MF} y FA^2_{MF} se puede evidenciar la morfología original de FUR y ARG. En las microfotografías de FA_{MAS} y FA^2_{MAS} se aprecian cambios en la morfología y el tamaño de las partículas en comparación con los componentes puros. En estos sistemas se puede observar que las estructuras son compactas, de forma irregular y que presentan

adherencias de partículas de diferentes tamaños en la superficie confirmando la formación de nuevas formas sólidas entre los componentes.¹²⁸

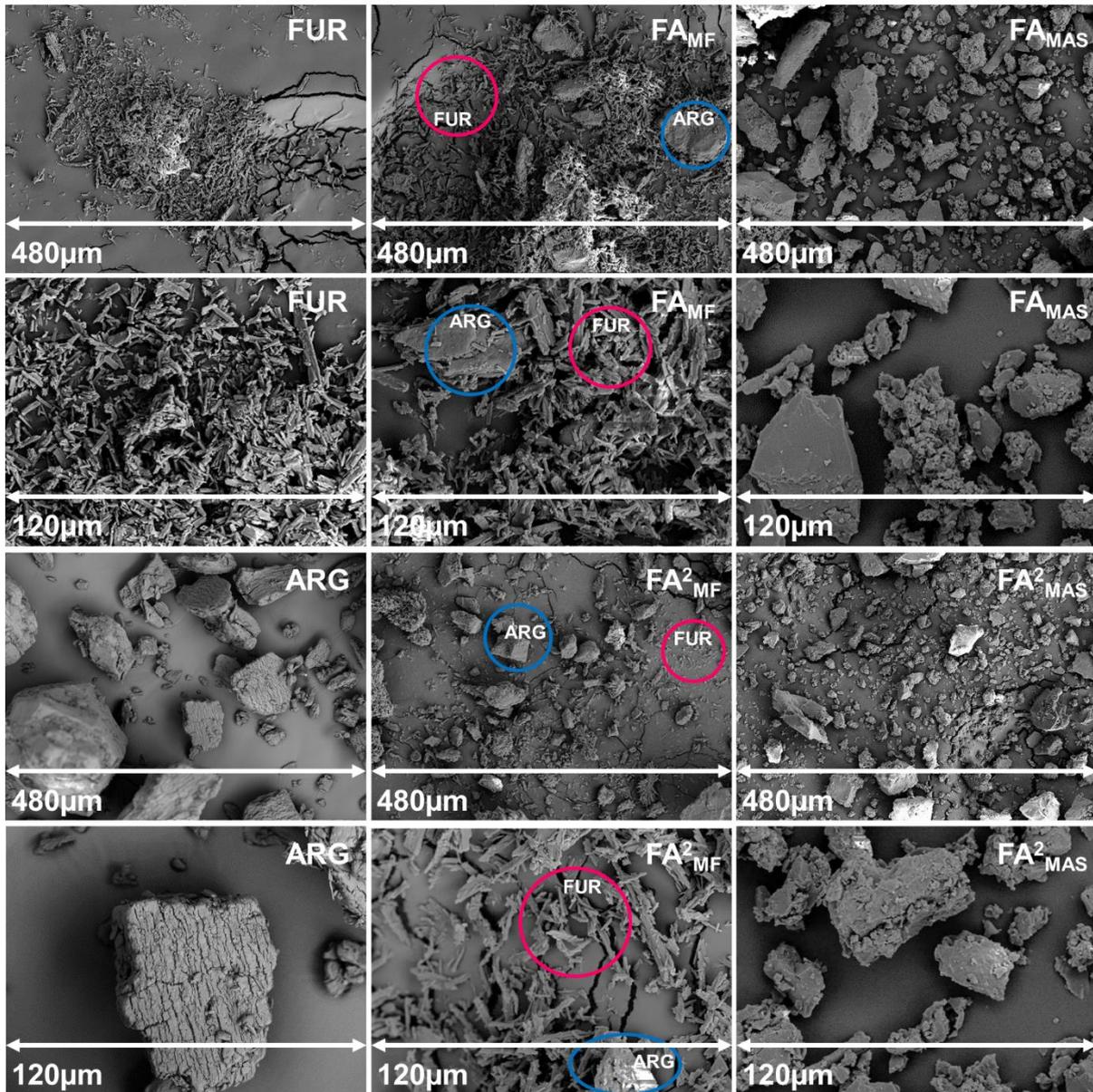


Figura 3.37. Microfotografías SEM de: FUR, ARG, FA_{MF} , FA^2_{MF} , FA_{MAS} , FA^2_{MAS} .

ANÁLISIS TÉRMICO

Como se describió anteriormente (Figura 3.5, página 87-88), el perfil de DSC de ARG presenta varios procesos endotérmicos. El primero atribuido a la pérdida de agua, el segundo a la fusión acompañada de descomposición y el último, a 239 °C, a la descomposición total de ARG. Los perfiles DSC de FA_{MAS} y FA^2_{MAS} muestran la desaparición completa de los eventos térmicos de FUR confirmando la interacción del fármaco con ARG (Figura 3.38a). Las

diferencias encontradas entre ambas curvas se deben a la diferencia de cantidad del AA en cada sistema.¹²⁸

Las curvas TG revelan un proceso de deshidratación, entre 30 y 150 °C, con una pérdida de masa de 5,3% para FA_{MAS} , de 8,1% para FA_{MF} , de 6,3% para FA^2_{MAS} y de 8,8% para FA^2_{MF} en comparación con una pérdida de masa de 7,2% para ARG.¹²⁸

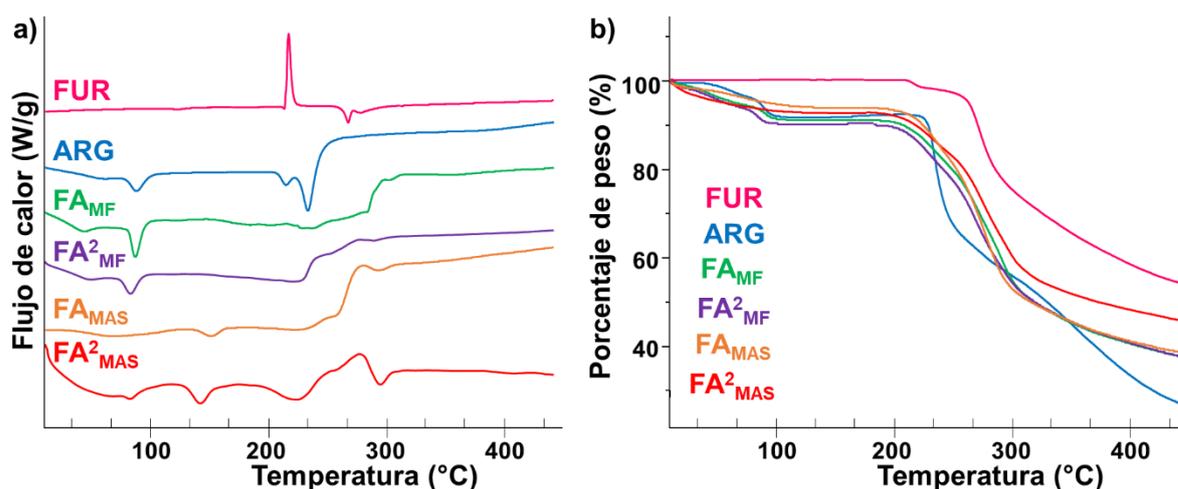


Figura 3.38. Perfil DSC (a) y curvas TG (b) de: FUR, ARG, FA_{MF} , FA^2_{MF} , FA_{MAS} , FA^2_{MAS} .

A partir de las curvas TG podemos concluir que la temperatura necesaria para degradar al fármaco en los sistemas binarios y en las MF es similar a la temperatura necesaria para degradar a FUR libre, lo que sugiere que su estabilidad térmica en estado sólido no se ve afectada al interactuar con ARG.

DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO

En la Figura 3.39 se puede observar que los difractogramas de FUR y ARG muestran el comportamiento típico de sólidos con características cristalinas. Sin embargo, los patrones de difracción de FA_{MAS} y FA^2_{MAS} evidencian disminución en el grado de cristalinidad de los componentes. A partir de un análisis más profundo de estos difractogramas, se observa que en el patrón DRXP de FA_{MAS} aparecen las señales más intensas de FUR, detrás de una fase amorfa, pero no se observan señales de ARG. Mientras que en el patrón DRXP de FA^2_{MAS} , además de la fase amorfa y las señales más intensas de FUR, también aparecen algunas de ARG. Este comportamiento puede deberse a las diferentes cantidades de ARG presentes en cada uno de los sistemas. La disminución en la cristalinidad de los sistemas binarios FUR:ARG obtenidos por MAS podría conducir a una disminución en la estabilidad del fármaco

porque, como es sabido los sólidos amorfos tienden a cristalizar a la estructura termodinámicamente más estable. Por otro lado, en los patrones de difracción de FA_{MF} y FA^2_{MF} se puede apreciar la superposición de las señales características de los patrones de los componentes puros indicando ausencia de interacción entre estos.¹²⁸

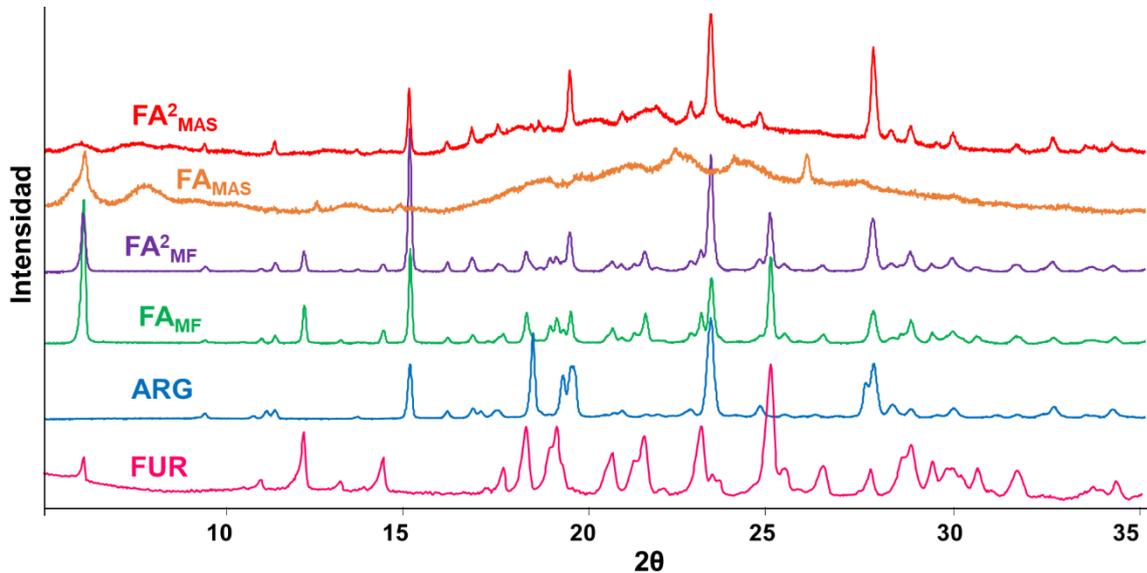


Figura 3.39. Patrones DRXP de: FUR, ARG, FA_{MF} , FA^2_{MF} , FA_{MAS} , FA^2_{MAS} .

Estos resultados coinciden con los obtenidos por las técnicas de espectroscopias FT-IR, Raman y RMNss, SEM, DSC y TG, confirmando la obtención de sales farmacéuticas FUR:ARG (de estequiometría 1:1 y 1:2) mediante la técnica de MAS.

SISTEMAS TERNARIOS CON ARGININA Y OLIGOSACÁRIDOS

Teniendo en cuenta que FUR forma complejos de inclusión con β -CD y MD (página 102) y una sal farmacéutica con ARG, y con el objetivo de confirmar la formación de sistemas supramoleculares ternarios entre estos componentes, las muestras obtenidas entre FUR, ARG y β -CD y entre FUR, ARG y MD se analizaron empleando diferentes técnicas de caracterización.

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Los espectros de FAC_{MF} y FAM_{MF} (Figura 3.40) corresponden simplemente a la superposición de los espectros FT-IR de los componentes puros donde evidencian que las

señales de FUR en la región de $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ se superponen con las señales de los grupos OH^- de los oligosacáridos.

En el espectro de FAC_{MAS} se distingue la señal correspondiente al COO^- (1615 cm^{-1}) observada previamente para los sistemas binarios FA_{MAS} y FA^2_{MAS} (Figura 3.34, página 117), el corrimiento de la banda asociada al estiramiento del grupo $\text{C}=\text{O}$ de FUR hacia mayores frecuencias (de 1673 cm^{-1} a 1684 cm^{-1}) y, adicionalmente, se puede evidenciar cambios en la intensidad de la señal originada por el estiramiento del grupo $\text{S}=\text{O}$ la cual, a su vez, se desplaza levemente a frecuencias mayores (de 1324 cm^{-1} a 1328 cm^{-1}).

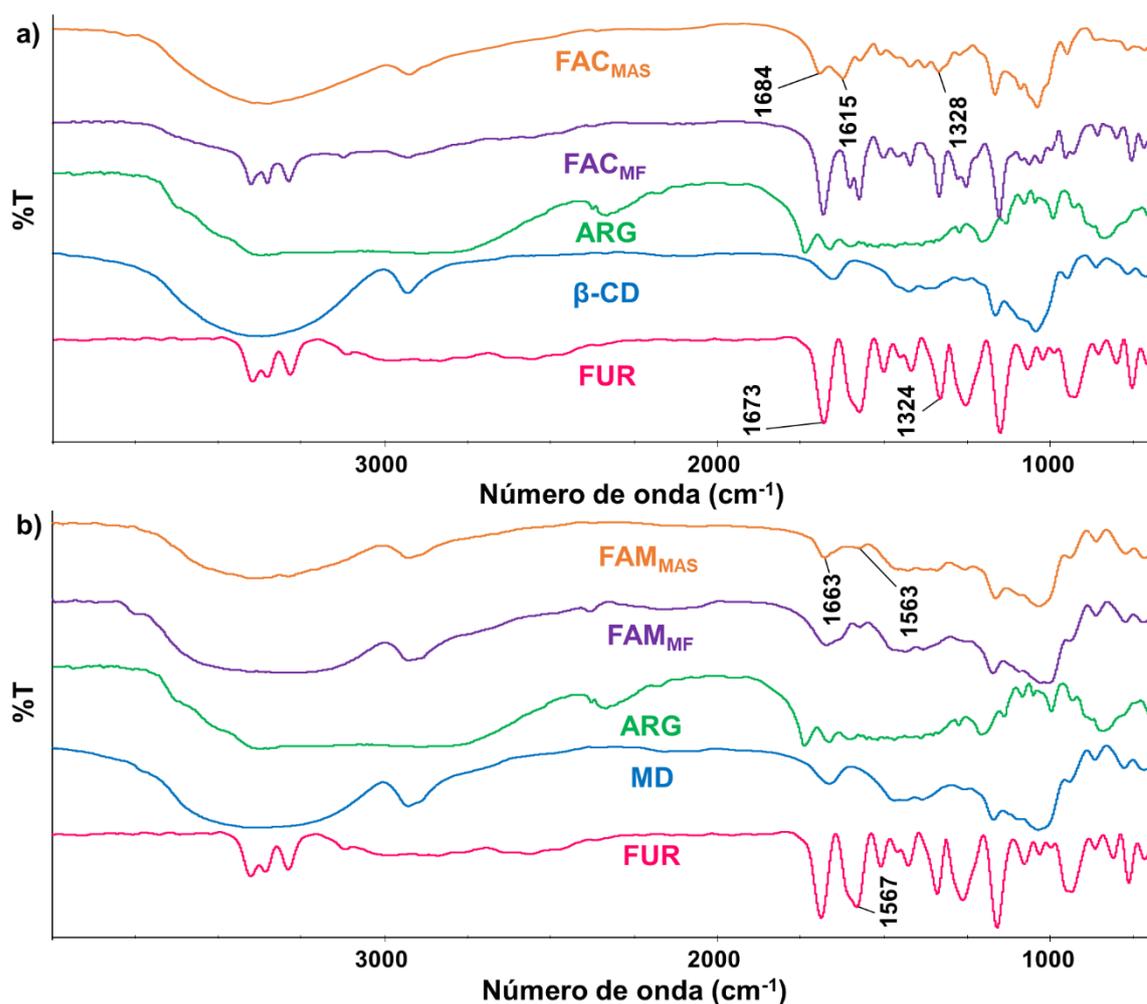


Figura 3.40. Espectros FT-IR de: (a) FUR, $\beta\text{-CD}$, ARG, FAC_{MF} , FAC_{MAS} ; (b) FUR, MD, ARG, FAM_{MF} , FAM_{MAS} .

En el espectro FAM_{MAS} se puede apreciar cambio en la intensidad de ciertas señales de FUR las cuales muestran también corrimiento hacia frecuencias menores: la del estiramiento

del grupo C=O de 1673 cm^{-1} a 1663 cm^{-1} y la del estiramiento del grupo -NH de la sulfonamida de 1567 cm^{-1} a 1563 cm^{-1} .¹²⁸

Estos resultados sugieren que FUR interactúa con ARG de forma iónica y con β -CD mediante enlaces puente hidrógeno formando el sistema ternario. Aunque no se evidencia la banda correspondiente al grupo COO^- en el sistema FAM_{MAS} , no podemos asegurar que la sal entre FUR y ARG no se forma debido a que en esa región del espectro predomina el espectro de MD pura, debido a la cantidad de este componente en el sistema.

ESPECTROSCOPIA RAMAN

Los espectros Raman de FAC_{MF} y FAM_{MF} (Figura 3.41) evidencian la superposición de los espectros individuales de los componentes, con mayor predominio de las señales de FUR debido a la mayor intensidad de las mismas en el espectro del IFA puro.

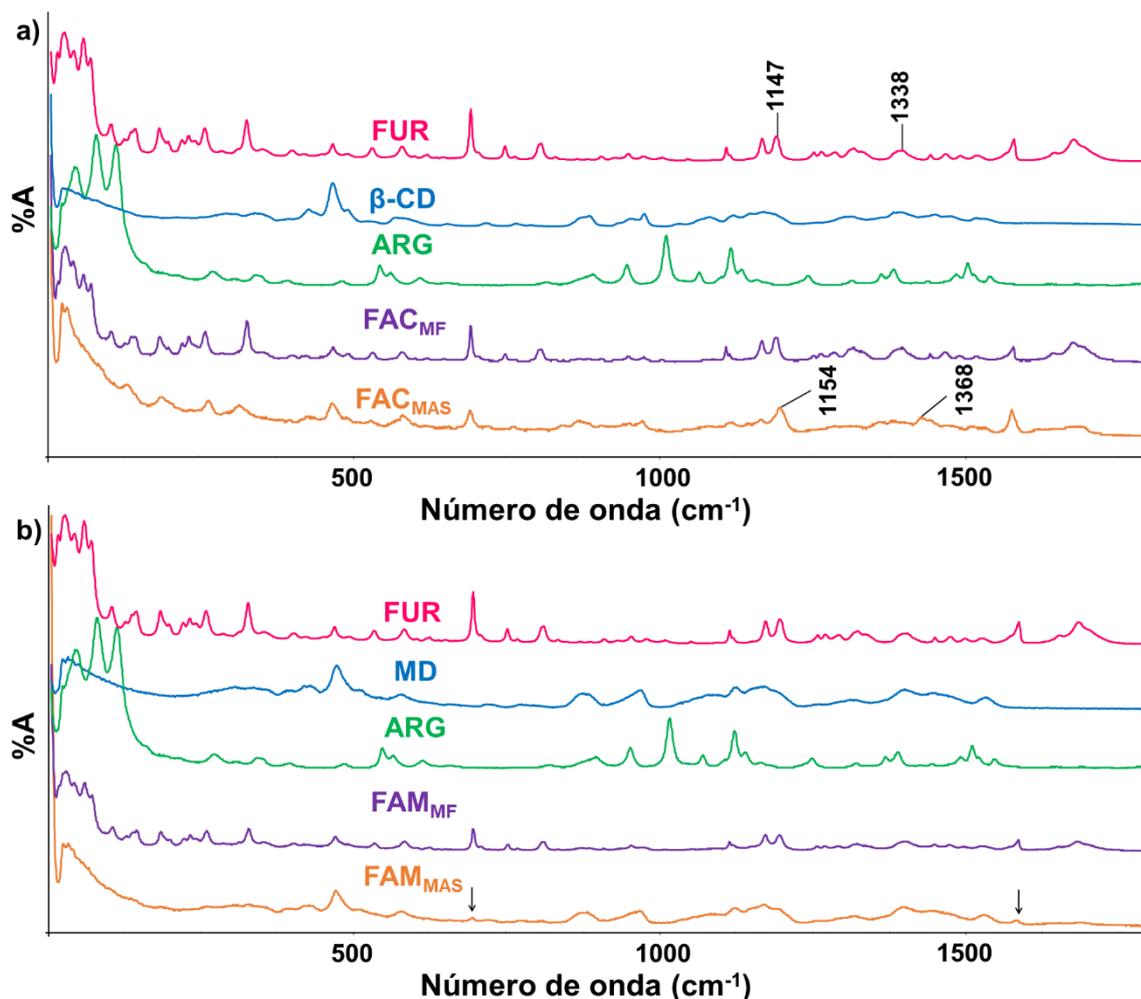


Figura 3.41. Espectros Raman de: (a) FUR, β -CD, ARG, FAC_{MF} , FAC_{MAS} ; (b) FUR, MD, ARG, FAM_{MF} , FAM_{MAS} .

El espectro del sistema FAC_{MAS} (Figura 3.41a) exhibe modificaciones en las regiones espectrales de $350\text{-}550\text{ cm}^{-1}$ y $1200\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ y desplazamiento a mayores frecuencias de las bandas correspondientes al estiramiento del grupo $\text{S}=\text{O}$ de 1338 cm^{-1} a 1368 cm^{-1} y de 1147 cm^{-1} a 1154 cm^{-1} . Por otra parte, en el espectro de FAM_{MAS} se observan principalmente las señales correspondientes a MD. Sin embargo, algunas bandas del IFA aparecen, aunque con pequeños corrimientos en la frecuencia, entre 1500 y 1650 cm^{-1} y entre 650 y 800 cm^{-1} (marcadas con flechas en la Figura 3.41b). Estos resultados sustentan los obtenidos por espectroscopia FT-IR.¹²⁸

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO

El espectro ^{13}C CP-MAS de FAC_{MF} (Figura 3.42a) evidencia similitud en la intensidad de las señales y en las posiciones de los desplazamientos químicos de los componentes de partida, indicando que no existen interacciones entre los componentes.

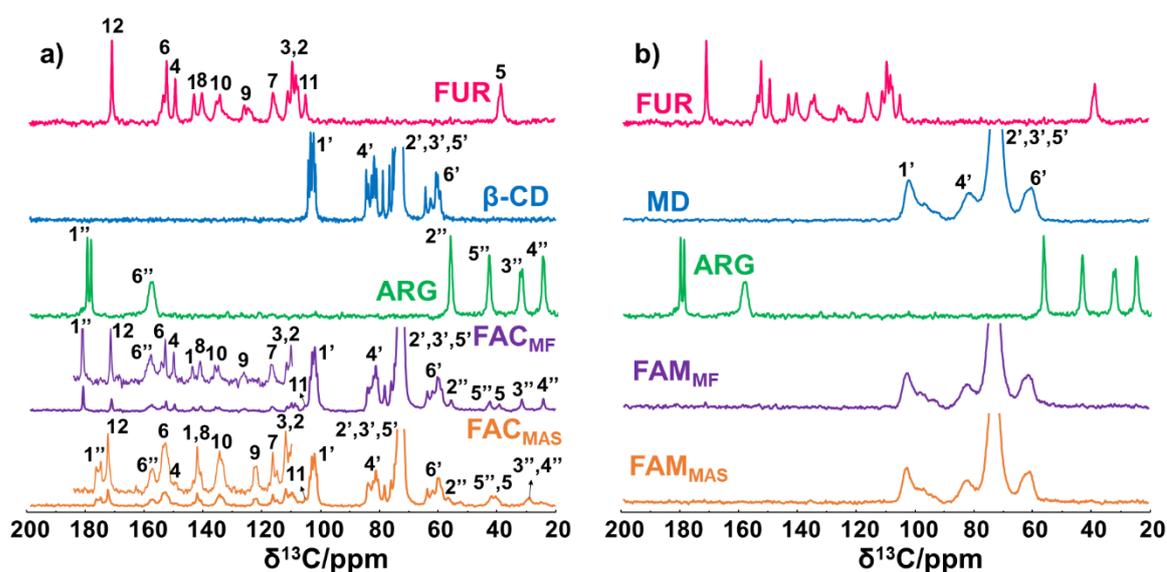


Figura 3.42. Espectros ^{13}C CP-MAS de: (a) FUR, β -CD, ARG, FAC_{MF} , FAC_{MAS} ; (b) FUR, MD, ARG, FAM_{MF} , FAM_{MAS} .

El espectro de FAC_{MAS} muestra diferencias en la región de 20 a 50 ppm y de 110 a 185 ppm con respecto a la de los componentes de partida, donde las señales correspondientes a FUR [modificadas por la presencia de ARG (Figura 3.36, página 119) y β -CD] pueden reconocerse en el espectro. Por un lado, se observa solapamiento de las señales del C5 de FUR y del C5'' de ARG entre 40 y 45 ppm ; además, en las señales de FUR se observa un desplazamiento de la señal del C12 de $171,6$ a 173 ppm , de los C1 y C8, que de presentar dos señales a $143,5$ y $141,1\text{ ppm}$ pasan a presentar sólo una a $142,5\text{ ppm}$ y del C9 que pasa

de dos señales a 126 y 124 ppm a evidenciar una señal a 122,3 ppm. Sumado a esto, una de las señales del C1' de ARG desaparece y las otras dos señales se desplazan de 180,4 y 179,1 ppm a 177 y 175,5 ppm. Estos desplazamientos son similares a los evidenciados en el espectro del sistema FA_{MAS}. En el espectro de FAC_{MAS} se aprecia el desplazamiento de los C3 y C2 de FUR de 110 ppm a 112 ppm y de 108 ppm a 110 ppm; y del C4'' de ARG hacia mayor ppm, ocasionando el solapamiento de la señal del C4'' con la señal del C3'' de ARG.

Por otro lado, los espectros de FAM_{MF} y FAM_{MAS} (Figura 3.42b) sólo muestran la señal de MD, debido a la cantidad de oligosacárido en la muestra, impidiendo la extracción de cualquier información espectroscópica en estos sistemas.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

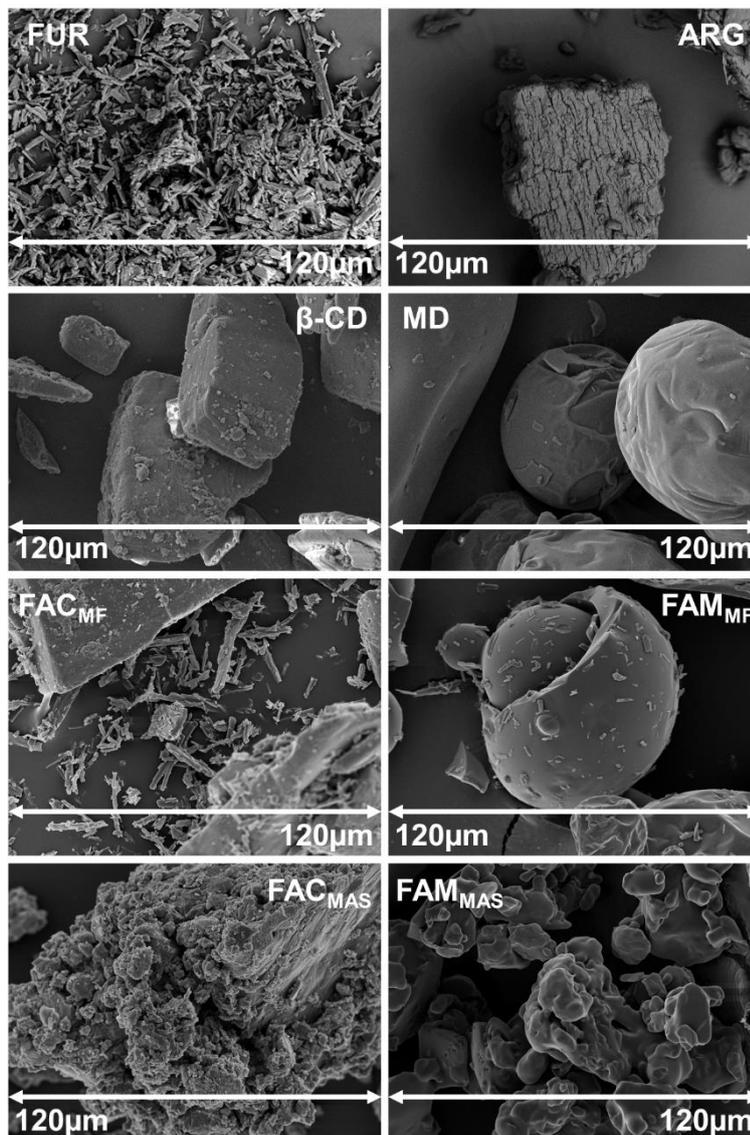


Figura 3.43. Microfotografías SEM de los componentes puros y de los sistemas ternarios.

En la Figura 3.43 las microfotografías de FAC_{MF} y FAM_{MF} muestran partículas que conservan la morfología original de todos los componentes de partida.

Las imágenes de FAC_{MAS} exhiben estructuras compactas rugosas con adherencias de partículas de menor tamaño en la superficie. Éstas exhiben mayores similitudes, aunque no son iguales, con las imágenes del sistema binario FC_{MAS} (Figura 3.16, página 99) que con las de los sistemas binarios FA_{MAS} y FA^2_{MAS} (Figura 3.37, página 120).

En las fotografías de FAM_{MAS} se aprecian estructuras lisas y compactas de diferentes tamaños las cuales presentan marcadas diferencias respecto a los componentes de partidas y a la de los sistemas binarios FM_{MAS} (Figura 3.17, página 100), FA_{MAS} y FA^2_{MAS} (Figura 3.37, página 120).

El cambio en la forma y en el tamaño de las partículas sugiere la formación de nuevas formas sólidas entre los componentes en los sistemas FAC_{MAS} y FAM_{MAS} .¹²⁸

ANÁLISIS TÉRMICO

Los perfiles DCS de FAC_{MAS} y FAM_{MAS} (Figura 3.44) evidencian la desaparición de los eventos térmicos del fármaco, confirmando la interacción molecular entre los componentes. Por el contrario, ambas MF muestran los eventos característicos de los componentes individuales confirmando la ausencia de interacciones, donde el punto de fusión de FUR (219,9 °C) aparece a 220,3 °C en el DSC de FAC_{MF} y a 220,6 °C en el de FAM_{MF} .

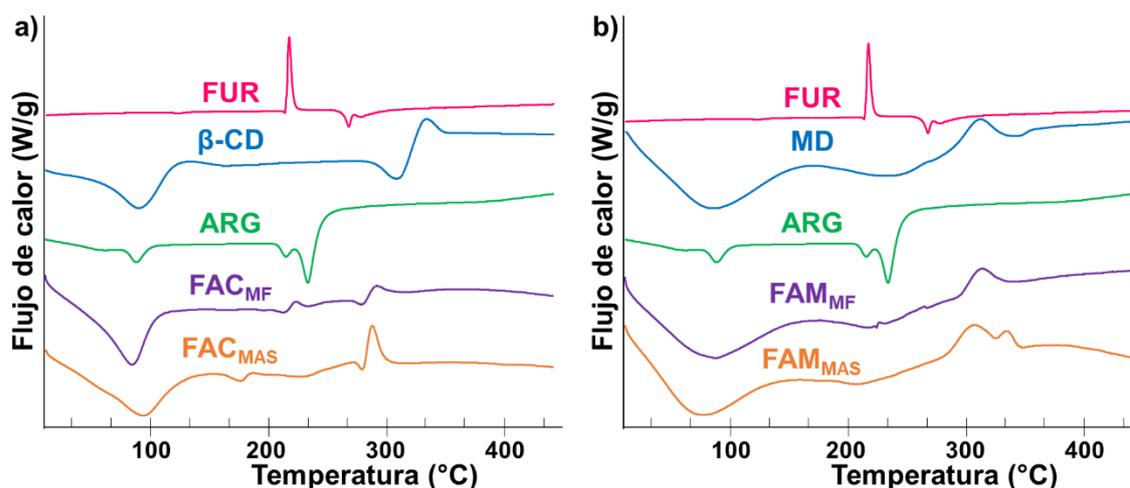


Figura 3.44. Perfil DSC de: (a) FUR, β -CD, ARG, FAC_{MF} , FAC_{MAS} ; (b) FUR, MD, ARG, FAM_{MF} , FAM_{MAS} .

En la curva de TG (Figura 3.45) se evidencia pérdida de masa asociada al proceso de deshidratación de 12,8% para FAC_{MAS}, de 8,6% para FAC_{MF}, de 9,1 para FAM_{MAS} y de 5,9% para FAM_{MF} en comparación con una pérdida de masa de 7,2% para ARG, de 9% para β -CD y de 4,5% para MD. La mayor pérdida de masa evidenciada por los sistemas obtenidos mediante MAS, respecto a las MF, puede atribuirse a que en estos sistemas el solvente utilizado (agua) queda retenido en el sistema supramolecular.

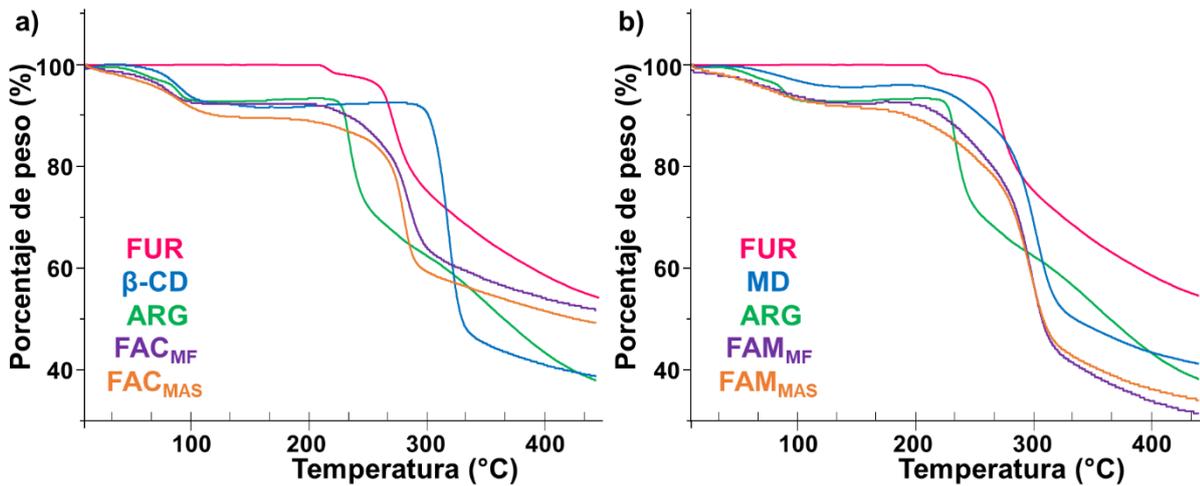


Figura 3.45. Curvas TG de: (a) FUR, β -CD, ARG, FAC_{MF}, FAC_{MAS}; (b) FUR, MD, ARG, FAM_{MF}, FAM_{MAS}.

Además, las curvas TG otorgan información sobre la temperatura a la que FUR comienza a degradarse. Los resultados indican que la temperatura necesaria para degradar al fármaco libre es similar a la temperatura necesaria para degradar los sistemas ternarios y las MF sugiriendo que en estado sólido la estabilidad térmica de FUR no se ve afectada al ser combinada con ARG y ambos oligosacáridos.

DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO

Del análisis realizado anteriormente, se desprende la hipótesis de que la adición de los oligosacáridos podría constituir una estrategia interesante para estabilizar el sistema amorfo FUR:ARG debido a que β -CD es ampliamente utilizada para incrementar la estabilidad física de sólidos farmacéuticos.¹³⁰

En los difractogramas de FAC_{MF} y FAM_{MF} (Figura 3.46) se aprecia la superposición de las señales características de todos los componentes puros sin evidencia de interacción entre éstos. Por otro lado, en el difractograma de FAC_{MAS} (Figura 3.46a) el sólido obtenido mantiene la cristalinidad de todos los componentes, mientras que en el patrón de difracción de FAM_{MAS}

(Figura 3.46b) se observa pérdida en la cristalinidad de FUR y ARG y una completa amorfización del sistema. Por lo tanto, se confirma que FAC_{MAS} y FAM_{MAS} constituyen estrategias alentadoras en cuanto a estabilidad física del sistema FUR:ARG ya que β -CD ayuda a mantener todos los componentes en estado cristalino, mientras que MD logra la completa amorfización del sistema (lo cual era esperado debido a que MD es un sólido intrínsecamente amorfo).¹²⁸

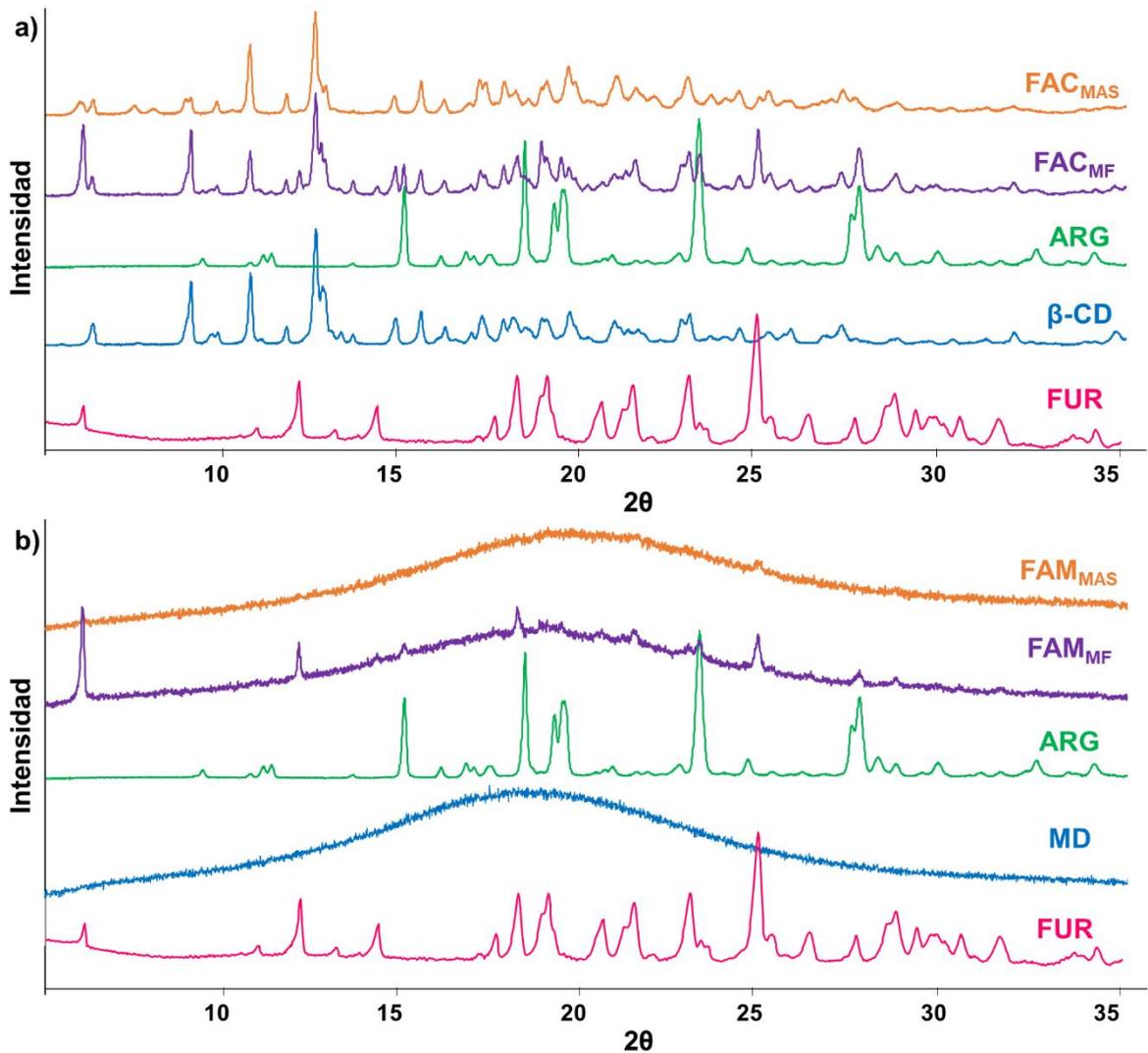


Figura 3.46. Patrones DRXP de: (a) FUR, β -CD, ARG, FAC_{MF} , FAC_{MAS} ; (b) FUR, MD, ARG, FAM_{MF} , FAM_{MAS} .

Estos resultados sustentan los obtenidos previamente por las otras técnicas de caracterización confirmando que los sistemas FAC_{MAS} y FAM_{MAS} constituyen nuevas formas sólidas.

CONCLUSIONES PARCIALES

A partir de los resultados presentados en este capítulo es posible confirmar la obtención de nuevos sistemas sólidos entre los fármacos estudiados (SMZ y FUR) y diferentes ligandos, utilizando técnicas de preparación sencillas, de bajo costo, alto rendimiento, fácil reproducción y, lo que es muy importante, escalables a nivel industrial como lo son la molienda asistida con solvente y la liofilización.

Tanto la espectroscopia FT-IR y Raman, como la RMNss, resultaron herramientas útiles en la caracterización de los nuevos sistemas sólidos ya que revelaron el comportamiento de los diferentes grupos funcionales presentes en las muestras permitiendo estimar el tipo de interacción entre los componentes de cada sistema. Adicionalmente, las imágenes de SEM confirmaron la formación de nuevas formas sólidas binarias y ternarias al evidenciar grandes cambios en la morfología de las partículas. Por otra parte, los resultados obtenidos por DSC/TG permitieron analizar el comportamiento térmico de las muestras, mientras que los estudios de los DRXP brindaron información sobre la cristalinidad de los sólidos obtenidos. A partir de esto, se demuestra la necesidad de utilizar numerosos métodos para caracterizar un sólido debido a que cada uno de éstos aporta información complementaria.

SULFAMETOXAZOL

Los resultados de los estudios de caracterización utilizando espectroscopia FT-IR, RMNss, SEM, DSC/TG y DRXP demostraron la formación de nuevas fases sólidas entre SMZ y los AA. En todos los sistemas se observó que las interacciones entre los componentes están mediadas por cargas al igual que en solución. Al combinar SMZ con HIS, tanto por MAS como por LF, se observó la formación de una **sal cristalina**, mientras que al combinar el IFA con ARG por la técnica de liofilización se obtiene una **sal amorfa**. Adicionalmente, se comprobó que mediante la MF de los componentes no se forman nuevos sistemas sólidos.

FUROSEMIDA

La forma II de FUR fue obtenida mediante evaporación de una solución de fármaco en acetona. Sin embargo, se determinó que la pureza del solvente y las condiciones climáticas afectan la conversión de FUR al polimorfo II dificultando la reproducibilidad del método. A partir de estos resultados, y sumado a que la solubilidad intrínseca de FUR no incrementa para el polimorfo II, se decidió no continuar con el estudio de FURII dado que no constituye un polimorfo atractivo desde el punto de vista farmacéutico.

Adicionalmente, se comprobó la formación de nuevos sistemas binarios sólidos de FUR con β -CD, MD y ARG utilizando para su preparación la técnica de MAS. El sistema FUR: β -CD demostró ser cristalino y presentar interacciones entre el grupo sulfonamida de FUR y β -CD. El sistema FUR:MD resultó en un sólido amorfo en el que interactúan el grupo sulfonamida y el anillo aromático del IFA. Los sistemas FUR:ARG (en relación equimolar 1:1 y 1:2) resultaron ser sales amorfas donde las interacciones entre los componentes son del tipo iónicas. Debido a que la disminución en la cristalinidad de los sistemas binarios FUR:ARG puede conducir a una disminución en la estabilidad física del fármaco, se obtuvieron por MAS los sistemas ternarios FUR:ARG: β -CD y FUR:ARG:MD, donde la adición de los oligosacáridos resultó ser una estrategia prometedora para estabilizar el sistema amorfo FUR:ARG, ya que β -CD ayuda a mantener todos los componentes en estado cristalino y con MD, al ser un sólido intrínsecamente amorfo, se obtiene la completa amorfización del sistema. Se comprobó también que mediante la MF de los componentes no se producen interacciones ni la formación de nuevos sistemas sólidos.

Adicionalmente, el sistema binario FUR:TEA se obtuvo utilizando diferentes métodos de preparación. Los resultados de los estudios de caracterización revelaron que mediante MAS, MF y EL se obtiene la misma sal cristalina entre ambos componentes. Se prepararon también, por MAS y MF, los sistemas multicomponentes FUR:TEA: β -CD y FUR:TEA:MD que, al igual que el sistema binario FUR:TEA, presentaron las mismas interacciones entre los componentes. A partir de estos resultados, y teniendo en cuenta que el sólido obtenido mediante las diferentes técnicas de preparación es el mismo, se decide unificar la nomenclatura de los sistemas conteniendo TEA para llamarlos FT, FTC y FTM.

CAPÍTULO 4: ENSAYOS DE DISOLUCIÓN Y PERMEABILIDAD

ENSAYOS DE DISOLUCIÓN Y PERMEABILIDAD

CONSIDERACIONES GENERALES

Para lograr una óptima biodisponibilidad de los IFAs administrados por vía oral, es necesario que factores tales como solubilidad, disolución, permeabilidad y estabilidad, entre otros, se encuentren especificados y sean lo más favorables posible.

La solubilidad de SMZ y FUR, tanto en forma libre como en combinación con otros ligandos, fue estudiada en el capítulo “Estudios en Solución” donde se demostró que algunos sistemas binarios y ternarios poseen resultados altamente positivos. A partir de estos hallazgos se diseñaron y desarrollaron diversos sistemas en estado sólido. Luego de su exhaustiva caracterización, se diferenciaron en sales farmacéuticas y complejos de inclusión.

En el presente capítulo se evaluará como influyen los sistemas supramoleculares sólidos desarrollados en el proceso de disolución y/o permeabilidad de los IFAs, dado que éstas son algunas de las propiedades biofarmacéuticas que pueden influir en su biodisponibilidad oral.

ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN

La absorción de un IFA tras la administración oral, desde una forma de dosificación sólida, depende de la liberación del fármaco desde el medicamento, su disolución bajo condiciones fisiológicas y su permeabilidad a través del tracto gastrointestinal. Es por esto que la disolución *in vitro* puede ser relevante para la predicción del rendimiento de disolución *in vivo* de los IFAs. En base a esta consideración general, las pruebas de disolución *in vitro* son ampliamente utilizadas por la industria farmacéutica para evaluar la calidad de un medicamento lote a lote, guiar el desarrollo de nuevas formulaciones y asegurar la calidad y el rendimiento del producto después de ciertos cambios en la formulación, en el proceso de fabricación, entre otros.¹³¹ En el área de investigación y desarrollo, el método de disolución *in vitro* puede ser empleado para comparar los perfiles de disolución^{xii} de los IFAs libres con los de los sistemas supramoleculares y los de las MF con el objetivo de predecir el comportamiento de disolución *in vivo* de los IFAs a partir de estos sistemas.

^{xii} El perfil de disolución es el gráfico del porcentaje de IFA disuelto en función del tiempo.

EQUIPOS DE DISOLUCIÓN

Existen 4 tipos de aparatos utilizados para las pruebas de disolución *in vitro*. Los más utilizados son el de cesta (aparato I) y el de paleta (aparato II).¹³¹ Los métodos de cesta y paleta son sencillos, robustos, están bien normalizados y se utilizan en todo el mundo. Además, son lo suficientemente flexibles como para permitir la realización de pruebas de disolución para una gran variedad de fármacos. Por este motivo deberían utilizarse los métodos del aparato I o II descritos en la Farmacopea Estadounidense (USP) salvo que se pruebe que no son satisfactorios. En dichos casos, se pueden considerar procedimientos como el del cilindro de doble acción (aparato III) o un sistema celular de flujo continuo (aparato IV), también descritos en la USP.^{104,131}

MEDIO DE DISOLUCIÓN

Las pruebas de disolución se deben realizar bajo condiciones fisiológicas debido a que esto permite la interpretación de los datos de disolución en relación al rendimiento *in vivo* del producto. Sin embargo, las condiciones de prueba deberán basarse en las características fisicoquímicas del IFA y en las condiciones a las que podría estar expuesto tras la administración oral.

Por lo general el volumen del medio de disolución es de 500, 900 o 1000 mL y se utiliza un medio acuoso con un pH que varía entre 1,2 y 6,8. Para simular el fluido intestinal (FIS), generalmente se utiliza un medio de disolución de pH de 6,8 sin enzimas. Si se utiliza un pH más alto, se debe justificar la elección del mismo teniendo en cuenta que el pH no puede excederse de 8,0. Para simular un fluido gástrico (FGS) se emplea un medio de disolución de pH de 1,2 sin enzimas. La necesidad de enzimas en el FGS o FIS debe ser evaluada y se debe justificar para cada caso en particular cuando las mismas sean agregadas al medio. No se recomienda el uso de agua como medio ya que el pH y la tensión superficial pueden cambiar durante la prueba de disolución debido a la influencia de los ingredientes activos y los excipientes.¹³¹

MÉTODO

Todas las pruebas de disolución deben realizarse a 37,0 (\pm 0,5) °C, manteniendo condiciones de agitación suave. La agitación comúnmente utilizada para el método de cesta es de 50 o 100 rpm, mientras que para el método de paleta es de 50 o 75 rpm.¹³¹

COMPARACIONES DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN

Para comparar los perfiles de disolución generalmente se emplea un enfoque independiente de modelo en el cual se utiliza un factor de diferencia (f_1) y un factor de similitud (f_2).¹³² El factor de diferencia (f_1) calcula la diferencia porcentual entre las dos curvas en cada punto temporal y es una medida del error relativo entre las dos curvas. El factor de similitud (f_2) es una transformación de raíz cuadrada recíproca logarítmica de la suma del error cuadrado y es una medición de la similitud en la disolución porcentual entre las dos curvas. Los factores f_1 y f_2 se calculan a partir de las siguientes ecuaciones:

$$f_1 = \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum R_t} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} 100 \right\} \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

donde n es el número de puntos de muestreo, R_t y T_t son los porcentajes disueltos de la referencia (IFA libre) y el producto de prueba, respectivamente, en cada tiempo t .¹³³

Para que las curvas se consideren similares, los valores de f_1 deberán estar cerca de 0, así como los valores de f_2 cerca de 100. Por lo general, los valores de f_1 de hasta 15 (0-15) y los valores de f_2 mayores de 50 (50-100) aseguran la igualdad de las dos curvas.¹³³

Este método independiente de modelo se utiliza cuando hay cuatro o más puntos temporales de disolución disponibles, teniendo en cuenta que los perfiles de disolución a comparar deben realizarse bajo exactamente las mismas condiciones, mientras que los puntos temporales de disolución para ambos perfiles deben ser los mismos. Para el cálculo de f_1 y f_2 sólo se debe considerar una medición después de la disolución del 85% del IFA en ambos sólidos. Por otro lado, para permitir el uso del valor promedio de las mediciones el coeficiente porcentual de variación (CV%) en los puntos temporales más tempranos (0-15 min) no deberá ser mayor al 20% y en otros puntos temporales no deberá ser superior al 10%.

También son utilizados métodos dependientes de modelo para calcular la diferencia entre los perfiles de disolución. Estos métodos se diferencian de los anteriores en que el cálculo empleado en éstos utiliza los datos de disolución en su forma nativa, mientras que los cálculos en un método dependiente de modelo se basan en diferentes funciones matemáticas. También son utilizados métodos basados en ANOVA donde los datos de disolución se utilizan en su forma nativa o con una transformación simple, ya que no se basan en procedimientos de ajuste de curva. El análisis de un método basado en ANOVA es capaz de mostrar las diferencias entre los perfiles de disolución completos y las diferencias entre los perfiles a cada

tiempo en particular. Esta última característica es especialmente importante para diferenciar el mecanismo de disolución de cada sistema.¹³⁴

ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD

La absorción intestinal de un IFA administrado por vía oral es esencial para el éxito terapéutico por lo cual son necesarios métodos fiables de pesquisa para la rápida evaluación y predicción de dicha propiedad. Las técnicas que se utilizan en la actualidad para predecir la absorción de un fármaco pueden ser modelos *in vivo*, *ex vivo*, *in silico* o *in vitro*.

DIFUSIÓN A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

La membrana celular es una estructura compuesta por una bicapa lipídica y proteínas (Figura 4.1).¹³⁵ Las principales clases de lípidos anfipáticos que la componen son: fosfolípidos, glicolípidos y esteroides, siendo la proporción de cada uno dependiente del tipo de célula. Generalmente los fosfolípidos son los más abundantes, dentro de los cuales la fosfatidilcolina juega un rol fundamental y es el que se encuentra en mayor cantidad. La disposición de los fosfolípidos en la bicapa lipídica (donde las colas apolares hidrofóbicas se encuentran hacia el interior de la membrana y las cabezas polares hidrofílicas hacia afuera) previene la difusión a través de la membrana de solutos polares tales como iones, aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas y, en general, permite la difusión pasiva de moléculas hidrofóbicas. Debido a esta bicapa fosfolipídica y a las proteínas de membrana específicas, la membrana celular presenta una permeabilidad selectiva a diferentes moléculas mediante mecanismos de transporte pasivo y activo.¹³⁶

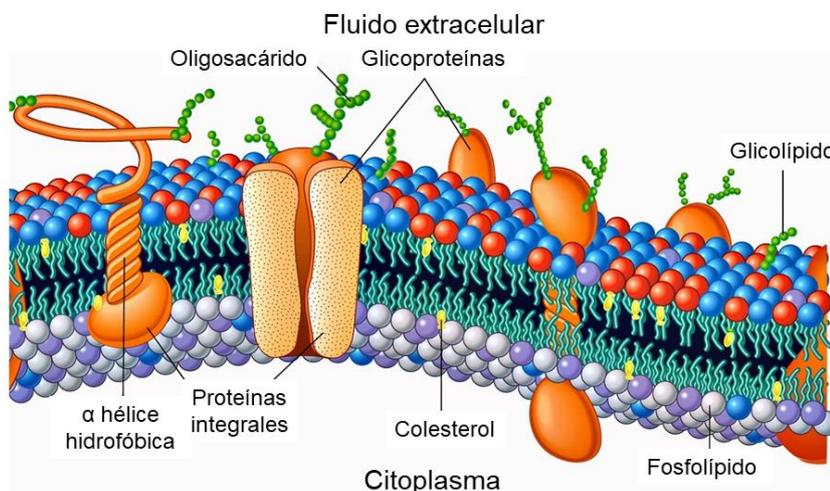


Figura 4.1. Estructura de la membrana celular.

Se denomina transporte pasivo al movimiento de sustancias a través de la membrana por medio de un equilibrio químico o eléctrico sin requerimientos de energía. El transporte pasivo puede darse por difusión debido a un gradiente de concentración (vía transcelular o paracelular) o mediante difusión facilitada (mediada por proteínas transportadoras). Cuando el transporte de sustancias se realiza en contra del gradiente químico o eléctrico se requiere energía, las células utilizan dos tipos de transporte activo mediante el uso de ATP (Figura 4.2).¹³⁶ La difusión pasiva de un IFA hacia el interior celular es impulsada por concentraciones altas de éste en el exterior acuoso de la membrana.¹³⁷ La combinación de un IFA con otros componentes puede incrementar la biodisponibilidad del fármaco, ya sea optimizando su solubilidad o mejorando su permeabilidad a través de la membrana.

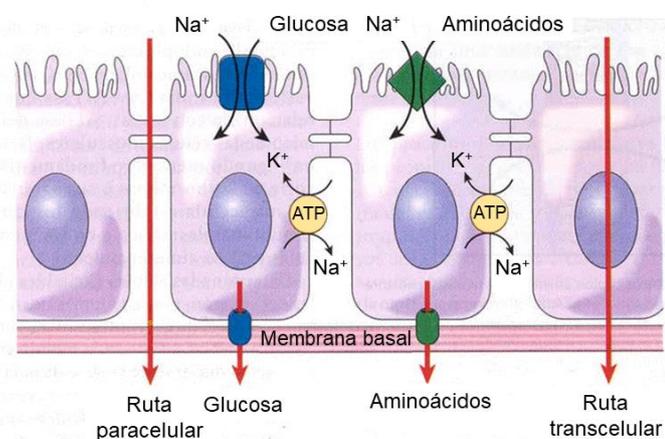


Figura 4.2. Mecanismos de transporte celular.

PREDICCIÓN DE LA PERMEABILIDAD

La permeabilidad intestinal de un IFA, tras la administración oral, constituye uno de los principales factores que gobiernan tanto la tasa como la extensión de la absorción en humanos (F_{abs}). Numerosas investigaciones científicas han establecido la existencia de correlación positiva entre la permeabilidad en yeyuno humano (P_{eff}) y la fracción de dosis absorbida a partir de una formulación oral de liberación inmediata.

Para el transporte a través de una membrana, la primera ley de Fick establece que el flujo de un IFA (masa/área/tiempo) a través de la pared intestinal es igual a la permeabilidad de éste multiplicada por la concentración del IFA sobre la superficie de la membrana.

En términos generales, la permeabilidad depende de la posición del IFA en el tracto gastrointestinal y del tiempo de permanencia en el sitio de absorción, así como su dependencia está dada por la concentración del IFA.

La predicción teórica de F_{abs} puede llevarse a cabo en base al balance de masa, resultando en la siguiente ecuación:¹³⁸

$$F_{abs} = (\text{dosis}^{-1}) \int_0^{t_{res}} \int_A P_{eff} C \, dA \, dt \quad (\text{Ecuación 4.3})$$

donde t_{res} es el tiempo de permanencia del IFA en el lumen intestinal; A es el área de la membrana intestinal; P_{eff} es la permeabilidad efectiva del IFA a través de la membrana; C es la concentración del IFA en el lumen intestinal; y t es el tiempo.

En un experimento predictivo de la permeabilidad de un IFA es importante proveer condiciones de sumidero durante el experimento, a fin de evitar efectos artificiales de saturación. La condición de sumidero se cumple cuando la concentración del fármaco en el medio liberado no excede el 10% de la solubilidad del mismo en este medio, bajo las condiciones experimentales, a un tiempo dado.¹³⁹

MÉTODOS

Los métodos *in vivo* resultan altamente eficaces para predecir la absorción intestinal de fármacos, sin embargo, los mismos no son capaces de satisfacer los requerimientos productivos de las industrias en términos de costos, estabilidad y productividad.¹³⁶ Por otra parte, las técnicas *in silico* (basadas en cálculos computacionales para estimar el potencial de absorción de los IFAs teniendo en cuenta sus propiedades fisicoquímicas) resultan muy atractivas en la actualidad, aunque su poder de predicción aún es insatisfactorio.¹⁴⁰ Dentro de las técnicas *in vitro* existen diversos métodos. La utilización de cultivos de monocapas de células Caco-2 presenta la ventaja de que contempla tanto el transporte pasivo como el transporte activo, pero su principal desventaja es el tiempo y costo de crecimiento de estas células, lo que la deriva en una técnica difícilmente aplicable para pesquisa de alto rendimiento en la industria farmacéutica.¹⁴¹ Por otro lado, debido a que la mayoría de los IFAs son absorbidos mediante transporte pasivo, el uso de membranas artificiales, que imiten a las membranas biológicas, ofrece una estrategia de alto rendimiento y efectividad para establecer el potencial de absorción de un fármaco que es absorbido por este mecanismo.¹⁴⁰ Dentro de este tipo de estudios, el ensayo de permeabilidad de membranas artificiales paralelas (PAMPA, de sus siglas en inglés *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) ha recibido considerable atención en la industria farmacéutica, ya que ofrece una determinación fisicoquímica simple de la permeabilidad de un IFA con un bajo costo y un alto rendimiento.¹⁴² Sin embargo, la desventaja de esta técnica es que debido al escaso volumen de los compartimentos donores y receptores no mantiene las condiciones de sumidero durante los experimentos de permeación.¹⁴⁰ Otro método de permeabilidad *in vitro* es el ensayo en celdas de difusión de Franz con membranas artificiales biológicamente apropiadas.¹⁴³ Dicho método

es uno de los más comúnmente utilizados ya que constituye una técnica simple, rápida y útil para predecir la absorción oral de fármacos con buena reproducibilidad y bajo costo. Además, presenta la ventaja de que la temperatura puede ser controlada, es posible mantener las soluciones donora y receptora bajo agitación continua y, en comparación con PAMPA, los compartimentos donador y receptor presentan mayor volumen permitiendo la conservación de las condiciones de sumidero durante el experimento de permeación. Por estos motivos, esta técnica suele ser utilizada para los estudios de IFAs en términos de su absorción oral, contribuyendo a remplazar y/o reducir el uso de animales de investigación.

Con el objetivo de predecir el efecto de los sistemas desarrollados en la biodisponibilidad oral de SMZ (baja solubilidad, alta permeabilidad) y FUR (baja solubilidad, baja permeabilidad) se evaluaron los perfiles de disolución de los sistemas binarios SMZ:AA y los perfiles de disolución y permeabilidad para los sistemas conteniendo FUR.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Se utilizaron los siguientes productos de origen comercial: Lipoid® S100 y Colesterol (Sigma-Aldrich®, USA). El resto de los materiales utilizados fueron descritos en el capítulo “Estudios en Solución”. Todos los otros reactivos y solventes utilizados fueron de grado analítico.

INSTRUMENTAL Y DESARROLLO y EXPERIMENTAL

La balanza, el espectrofotómetro UV-Vis, el pH-metro, el sonicador y el vortex utilizados fueron descritos en el capítulo “Estudios en Solución”. Los estudios de disolución se realizaron en un equipo Hanson SR11 Dissolution Test Station, Hanson Research Corporation (Chatsworth, USA).

PREPARACIÓN DE SISTEMAS EN ESTADO SÓLIDO

Los sistemas de SMZ (SH_{MF} , SH_{MAS} , SH_{LF} , SA_{MF} y SA_{LF}) y los sistemas binarios y ternarios de FUR con β -CD, MD y ARG (FC_{MAS} , FC_{MF} , FM_{MAS} , FM_{MF} , FA_{MAS} , FA_{MF} , FA^2_{MAS} , FA^2_{MF} , FAC_{MAS} , FAC_{MF} , FAM_{MAS} y FAM_{MF}) utilizados en el ensayo de disolución se prepararon siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo “Estudios en Estado Sólido”.

Luego del estudio realizado en estado sólido y tras dilucidar que al combinar FUR con TEA a través de distintos métodos de preparación se obtiene el mismo sistema en estado sólido

(tanto para sistemas binarios como ternarios), se decide unificar la nomenclatura de los sistemas por lo que FT_{MAS} , FT_{EL}^A , FT_{EL}^M y FT_{MF} se denominan FT, a su vez FTC_{MAS} y FTC_{MF} se nombran como FTC y, finalmente, FTM_{MAS} y FTM_{MF} como FTM. Considerando que la técnica de MAS utiliza agua como solvente y, teniendo en cuenta la facilidad en su escalado a nivel industrial, fue la elegida para obtener el sistema FT (cabe destacar que se decidió preparar al sistema por éste método de preparación, y no por MF, debido a que el polvo obtenido es más homogéneo macroscópicamente y más fácil de manipular que el obtenido a partir de la mezcla de los componentes sin solvente). Por otro lado, los sistemas FTC y FTM utilizados en el ensayo de disolución se obtuvieron a partir de la MF de los componentes sin adición de solvente.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE IFA

Con el objetivo de determinar el contenido exacto de SMZ y FUR en cada sistema binario y ternario, se disolvió una cantidad de sólido conteniendo el equivalente a 7 mg de SMZ en 25 mL de una mezcla etanol:agua (50:50, v/v) y el equivalente a 10 mg de FUR en 10 mL de una mezcla metanol:agua (50:50, v/v). Después de la dilución apropiada con agua MQ, las muestras se analizaron mediante espectroscopia UV-Vis a 266 nm (SMZ) y 274 nm (FUR).

ENSAYOS DE DISOLUCIÓN

Los ensayos de disolución se llevaron a cabo por triplicado y el resultado informado es el valor promedio de las mediciones. Se utilizó el aparato de paletas, y el medio de disolución fue FGS sin enzimas preparado de acuerdo a USP XXX.¹⁰⁴ Las pruebas se realizaron a los IFAs libres y a los sistemas sólidos desarrollados (MAS, LF y MF).

Para los ensayos de SMZ se suspendieron cantidades adecuadas de cada sistema conteniendo 130 mg del IFA en 500 mL del medio de disolución y en el caso de FUR se suspendieron cantidades adecuadas de cada sistema conteniendo 40 mg del IFA en 900 mL del medio de disolución. Para ambos IFAs, los experimentos se llevaron a cabo durante 120 min a $37,0 (\pm 0,5) ^\circ\text{C}$ y con agitación constante de $50 (\pm 5)$ rpm. Se tomaron muestras a intervalos de tiempo preestablecidos con posterior reemplazo del medio de disolución para mantener constante el volumen final. Las muestras se filtraron utilizando un filtro de membrana de polivinilideno fluoruro de tamaño de poro de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore®, USA) y se diluyeron apropiadamente con FGS para su cuantificación mediante espectroscopia UV-Vis a 266 nm (SMZ) y 274 nm (FUR).

A partir de los ensayos de disolución, se calculó el porcentaje acumulado del IFA liberado del sistema y los factores f_1 (ecuación 4.1) y f_2 (ecuación 4.2) para realizar la comparación de los perfiles de disolución a partir de un método independiente de modelo.

Adicionalmente, se realizó la comparación de los perfiles de disolución por un modelo estadístico utilizando como método un ANOVA de una vía cuando los factores f no fueron suficientemente exactos a la hora de diferenciar los perfiles. Este test se realizó una comparación múltiple utilizando el post-test de Tukey con un intervalo de confianza del 95%. El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa GraphPad Prism 7®.

ENSAYOS DE PERMEABILIDAD

Los ensayos se desarrollaron con el fin de estudiar el efecto de TEA, ARG, β -CD y MD en la permeabilidad de FUR. El estudio fue llevado a cabo utilizando un procedimiento *in vitro* en celdas de difusión de Franz desarrollado y validado previamente por el grupo de investigación.¹⁴⁴ Se emplearon membranas de éster de celulosa de 0,45 μm (Gamafilm, Argentina) como soporte. Dichas membranas fueron impregnadas por inmersión durante 30 min con una solución al 10% p/p lípidos/n-octanol con el propósito de imitar las propiedades lipofílicas de las membranas biológicas. Dicha solución se preparó dispersando 80% de Lipoid S100 y 20% de Colesterol en 2 mL de n-octanol.

Las membranas artificiales fueron montadas entre el compartimento donador y receptor de las celdas de Franz. Como medio de difusión se utilizó una solución de buffer fosfato 0,01 M de pH 7,4 (PBS₇) preparado de acuerdo a la USP XXX.¹⁰⁴ Cantidades adecuadas de FUR y de cada sistema (FUR:TEA, FUR:ARG, FUR: β -CD, FUR:MD y FUR:TEA: β -CD en relación equimolar 1:1 o 1:1:1) conteniendo el equivalente a 30 mg del IFA se suspendieron en 25 mL de PBS₇. Posteriormente, la solución resultante fue introducida en el compartimento donador y el compartimento receptor fue cargado con PBS₇. Las soluciones dentro de ambos compartimentos fueron sometidas a agitación mecánica constante a 14000 rpm (Auto Science®) y fueron termostalizadas a 37,0 (\pm 0,5) °C utilizando un baño de circulación. Las muestras (2 mL) fueron extraídas del compartimento receptor a intervalos fijos restituyendo el volumen extraído con PBS₇ previamente termostalizado.

Se calculó la relación entre la concentración de FUR en los compartimentos receptor y donador a todos los tiempos, con el fin de monitorear el cumplimiento de la condición de sumidero durante los experimentos, considerando apropiado un cociente menor a 0,1.

Las concentraciones de FUR fueron determinadas espectrofotométricamente a 274 nm, los ensayos se realizaron por triplicado y el resultado informado es el valor promedio de las mediciones.

Para evaluar el comportamiento de permeabilidad de FUR libre y en los sistemas, el coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) fue calculado a partir de la pendiente de la porción lineal inicial de los perfiles de permeación de acuerdo a la siguiente ecuación, que deriva de la primera Ley de Fick:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{V}{A \cdot C_0 \cdot 60} \quad (\text{Ecuación 4.4})$$

donde dQ/dt es la concentración acumulada de FUR permeada en función del tiempo (mg/min), V es el volumen del compartimento receptor, A es el área de superficie de la membrana, C_0 es la concentración inicial de FUR en el compartimento donador y 60 es el factor de conversión de min a seg.

Adicionalmente, se realizó la comparación de los perfiles de permeabilidad por un modelo estadístico utilizando como método un ANOVA de una vía, en el que se realizó una comparación múltiple aplicando el post-test de Tukey con un intervalo de confianza del 95%. El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa GraphPad Prism 7®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DISOLUCIÓN

Debido a que la interacción de un IFA con un ligando puede modificar la velocidad de disolución y la cantidad de fármaco disuelto, se evaluaron los perfiles de disolución de SMZ y FUR en forma pura, así como también los perfiles de las MF y los de los sistemas supramoleculares binarios y ternarios obtenidos en estado sólido.

Los ensayos de disolución se realizaron utilizando FGS sin enzimas como medio para simular el comportamiento de los fármacos y los sistemas en estómago. Además, el tiempo de cada experimento fue de 120 min ya que es el tiempo aproximado de residencia de los medicamentos en estómago.¹⁴⁵ Todos los experimentos se realizaron bajo exactamente las mismas condiciones [37,0 (\pm 0,5) °C y 50 (\pm 5) rpm] para poder realizar la comparación de los perfiles de disolución utilizando un método independiente de modelo.

SULFAMETOXAZOL

SISTEMAS BINARIOS CON HISTIDINA

Los perfiles de disolución obtenidos para SMZ, SH_{MF}, SH_{MAS} y SH_{LF} se pueden observar en la Figura 4.3. Además, en la Tabla 4.1 se muestra el porcentaje de SMZ disuelto a

diferentes tiempos y la comparación de los perfiles de disolución obtenidos mediante el cálculo de los factores f_1 y f_2 .

Como se puede apreciar en la Figura 4.3, el porcentaje de SMZ disuelto, tanto en el perfil de disolución del IFA libre como en el perfil de SH_{MF} , se encuentra cercano a un 40% luego de 120 min. Sin embargo, a pesar de que el porcentaje del fármaco disuelto al final del estudio es prácticamente el mismo en ambos casos, la velocidad de disolución de la MF es considerablemente superior a la velocidad de disolución de SMZ como lo evidencia la pendiente de la primera parte de la curva de disolución.

Por otra parte, se puede observar que SH_{MAS} y SH_{LF} presentan perfiles de disolución notablemente diferentes al perfil del IFA libre logrando mayores porcentajes de SMZ disuelto, al finalizar el ensayo, con valores de 68,4% para el sistema SH_{MAS} y 78,9% para SH_{LF} .

El marcado incremento en la velocidad y cantidad de fármaco disuelto en SH_{MAS} y SH_{LF} , con respecto a SH_{MF} , puede estar asociado a la formación de la sal farmacéutica entre SMZ e HIS en los sistemas preparados por MAS y LF, mientras que en la MF no existen interacciones en estado sólido entre el IFA y el AA.

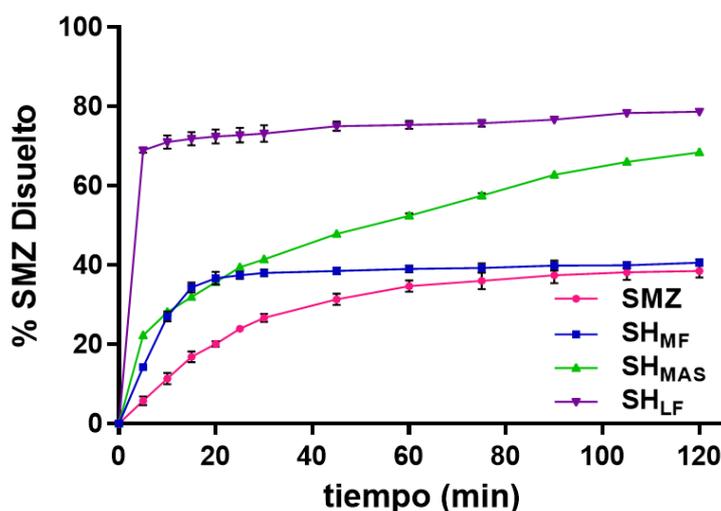


Figura 4.3. Perfil de disolución de SMZ, SH_{MF} , SH_{MAS} y SH_{LF} .

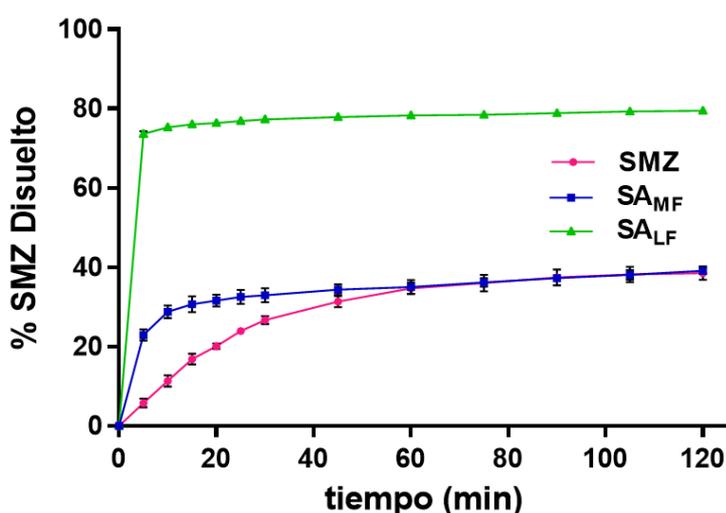
El análisis de los resultados obtenidos en cuanto a factores f_1 y f_2 (Tabla 4.1) evidencia que el perfil de disolución del fármaco libre es diferente al de SH_{MF} , SH_{MAS} y SH_{LF} , ya que se considera que dos perfiles son iguales cuando f_1 es menor a 15 y f_2 mayor a 50.¹³³ A su vez, se realizó la comparación entre los perfiles de disolución de SH_{MF} , SH_{MAS} y SH_{LF} donde el valor de f_1/f_2 fue de 24/42 entre SH_{MF} y SH_{MAS} , de 52/21 entre SH_{MF} y SH_{LF} y de 38/27 entre SH_{MAS} y SH_{LF} evidenciando que presentan diferencias significativas entre ellos.

Tabla 4.1. Porcentaje de SMZ disuelto a diferentes tiempos. Valor de los factores de diferencia y similitud entre SMZ y los sistemas.

SISTEMA	% SMZ Disuelto (5 min)	% SMZ Disuelto (15 min)	% SMZ Disuelto (30 min)	% SMZ Disuelto (60 min)	% SMZ Disuelto (120 min)	f_1	f_2
SMZ	6 ± 1	17 ± 1	27 ± 1	35 ± 1	39 ± 2	-	-
SH _{MF}	14,3 ± 0,3	34 ± 1	38,1 ± 0,8	39,0 ± 0,8	40,6 ± 0,9	32	46
SH _{MAS}	22,3 ± 0,4	32,3 ± 0,3	41,4 ± 0,4	52 ± 1	68,4 ± 0,7	42	40
SH _{LF}	69 ± 1	72 ± 2	73 ± 1	75 ± 2	78,7 ± 0,8	64	20

SISTEMAS BINARIOS CON ARGININA

Los perfiles de disolución de SMZ y SA_{MF} (Figura 4.4) evidencian que la velocidad de disolución de la MF es superior a la de SMZ, aunque a partir de los 60 min el porcentaje de SMZ disuelto en ambas curvas es muy similar alcanzando aproximadamente un 40% de fármaco disuelto a los 120 min. Por otro lado, se puede observar que SA_{LF} presenta un perfil notablemente diferente con una disolución significativamente mayor desde el inicio, logrando un porcentaje de IFA disuelto de aproximadamente 80% al finalizar el ensayo. Este gran incremento en la velocidad y cantidad de IFA disuelto puede deberse a la sal formada por SMZ y ARG en el sistema LF, sumado a la completa amorfización del sistema que pudo observarse por DRXP. Es sabido que los sólidos amorfos presentan una velocidad de disolución considerablemente superior a la de los sólidos cristalinos.

**Figura 4.4.** Perfil de disolución de SMZ, SA_{MF}, y SA_{LF}.

Se determinaron valores de 25 para f_1 y de 47 para f_2 al comparar los perfiles de disolución de SMZ libre y SA_{MF}, y de 65 para f_1 y de 15 para f_2 al comparar los perfiles del IFA libre y

SA_{LF} (Tabla 4.2). El análisis de los resultados obtenidos evidencia que a pesar de que el porcentaje de IFA disuelto al final del ensayo es el mismo, los perfiles de disolución de la MF y del IFA son considerados diferentes teniendo en cuenta los factores f_1 y f_2 . A su vez, los perfiles de disolución de SMZ y de SA_{LF} también son considerados diferentes entre sí.

Tabla 4.2. Porcentaje de SMZ disuelto a diferentes tiempos. Valor de los factores de diferencia y similitud entre SMZ y los sistemas.

SISTEMA	% SMZ Disuelto (5 min)	% SMZ Disuelto (15 min)	% SMZ Disuelto (30 min)	% SMZ Disuelto (60 min)	% SMZ Disuelto (120 min)	f_1	f_2
SMZ	6 ± 1	17 ± 1	27 ± 1	35 ± 1	39 ± 2	-	-
SA _{MF}	23 ± 1	31 ± 2	33 ± 2	36 ± 2	39,1 ± 0,8	25	47
SA _{LF}	73,6 ± 0,7	76, 0 ± 0,3	77,3 ± 0,3	78,3 ± 0,2	79,5 ± 0,3	65	15

Adicionalmente, se realizó la comparación entre los perfiles de disolución de SA_{MF} y SA_{LF}, donde el valor de f_1 fue de 57 y el de f_2 de 18, confirmando también que ambos perfiles de disolución son diferentes entre sí.

FUROSEMIDA

SISTEMAS BINARIOS CON OLIGOSACÁRIDOS

En los perfiles de disolución de FC_{MF}, FM_{MF}, FC_{MAS} y FM_{MAS} (Figura 4.5) se puede apreciar mayor velocidad de disolución en comparación al IFA libre donde el perfil de FC_{MF} muestra la menor velocidad de disolución y el menor porcentaje disuelto de fármaco al final del ensayo.

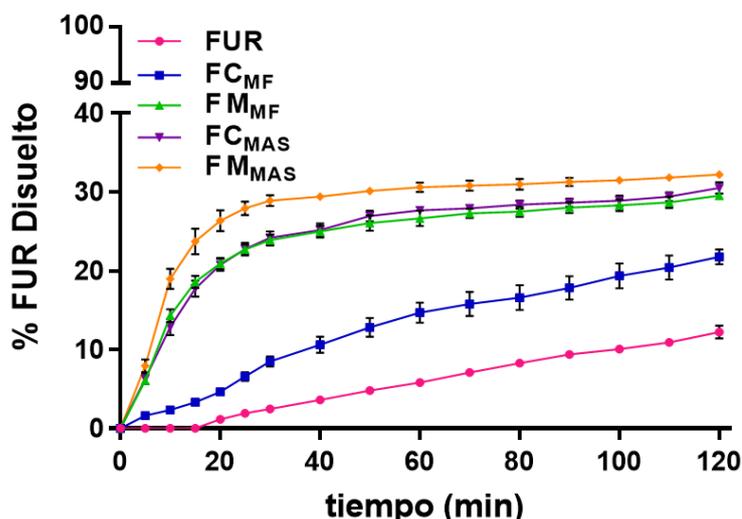


Figura 4.5. Perfil de disolución de FUR, FC_{MF}, FM_{MF}, FC_{MAS} y FM_{MAS}.

En la Tabla 4.3 se presenta el porcentaje de FUR disuelta a diferentes tiempos, observándose que luego de 120 min el porcentaje disuelto del fármaco libre es de 12,2%, mientras que para FC_{MF}, FM_{MF}, FC_{MAS} y FM_{MAS} el porcentaje del IFA disuelto es superior (22%, 29%, 30% y 32%, respectivamente).

Los valores de f_1 y f_2 determinados muestran que los perfiles de disolución de FC_{MF}, FM_{MF}, FC_{MAS} y FM_{MAS} son diferentes al de FUR libre ya que en todos los casos el valor de f_1 es mayor a 15 y el valor de f_2 es menor a 50.¹³³

Tabla 4.3. Porcentaje de FUR disuelto a diferentes tiempos. Valor de los factores de diferencia y similitud entre FUR y los sistemas.

SISTEMA	% FUR Disuelto (5 min)	% FUR Disuelto (15 min)	% FUR Disuelto (30 min)	% FUR Disuelto (60 min)	% FUR Disuelto (120 min)	f_1	f_2
FUR	0	0	2,5 ± 0,2	5,8 ± 0,3	12,2 ± 0,8	-	-
FC _{MF}	1,6 ± 0,1	3,3 ± 0,1	8,5 ± 0,6	15 ± 1	21,8 ± 0,7	61	48
FM _{MF}	6,0 ± 0,3	18,6 ± 0,8	23,9 ± 0,7	27 ± 1	29,5 ± 0,2	78	36
FC _{MAS}	6,3 ± 0,7	18 ± 1	24,2 ± 0,8	27,7 ± 0,2	30,5 ± 0,7	78	36
FM _{MAS}	7,9 ± 0,8	24 ± 1	28,9 ± 0,7	30,6 ± 0,6	32,3 ± 0,1	81	32

Se realizó la comparación entre los perfiles de disolución de FC_{MF}, FM_{MF}, FC_{MAS} y FM_{MAS} a partir de lo cual se determinó que el perfil de FC_{MF} es diferente a los otros sólidos estudiados con valores de f_1/f_2 de 51/45 al compararlo con el perfil de FM_{MF}, de 51/45 con FC_{MAS} y de 57/38 con FM_{MAS}. Sin embargo, los perfiles de FM_{MF}, FC_{MAS} y FM_{MAS} no presentan diferencias entre ellos ya que en todos los casos f_1 es menor a 15 y f_2 es mayor a 50.¹³³

SISTEMAS BINARIOS Y TERNARIOS CON TRIETANOLAMINA

A partir de los datos presentes en la Tabla 4.4 se puede apreciar que desde los 5 min el porcentaje de IFA disuelto en los sistemas FT, FTC y FTM es superior al porcentaje disuelto de FUR libre, manteniéndose esta relación hasta el final del estudio. Además, en los perfiles de disolución (Figura 4.6) se evidencia que, en todos los sistemas, la velocidad de disolución se encuentra optimizada con respecto al fármaco libre.

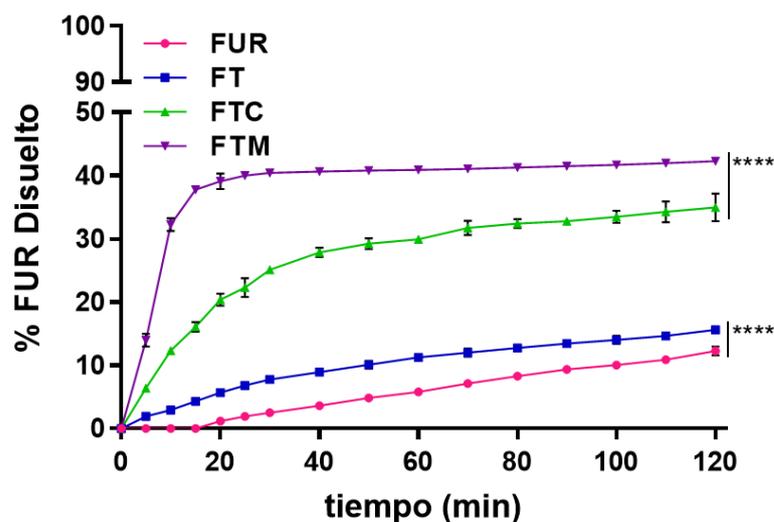


Figura 4.6. Perfil de disolución de FUR, FT, FTC y FTM. Análisis por ANOVA de una vía post-test de Tukey. ****p<0,0001.

En la Tabla 4.4 se muestran los valores de f_1 y f_2 calculados al comparar FUR con los diferentes sistemas. Del análisis de estos factores es posible concluir que los perfiles de disolución de FTC y FTM son diferentes al de FUR ($f_1 > 15$ y $f_2 < 50$)¹³³, lo que revela que los sistemas ternarios influyen en la disolución del fármaco. Sin embargo, para el sistema FT el análisis de f_1 y f_2 no arroja el mismo resultado, ya que uno de los factores indica que los perfiles son diferentes entre sí (f_1) y el otro que son iguales (f_2).

Tabla 4.4. Porcentaje de FUR disuelto a diferentes tiempos. Valor de los factores de diferencia y similitud entre FUR y los sistemas.

SISTEMA	% FUR Disuelto (5 min)	% FUR Disuelto (15 min)	% FUR Disuelto (30 min)	% FUR Disuelto (60 min)	% FUR Disuelto (120 min)	f_1	f_2
FUR	0	0	2,5 ± 0,2	5,8 ± 0,3	12,2 ± 0,8	-	-
FT	1,9 ± 0,1	4,3 ± 0,2	7,8 ± 0,2	11,3 ± 0,2	15,6 ± 0,1	44	67
FTC	6,4 ± 0,1	16,1 ± 0,8	25,1 ± 0,3	29,9 ± 0,2	35 ± 1	80	33
FTM	13,9 ± 1	37,8 ± 0,1	40,4 ± 0,3	40,9 ± 0,4	42,3 ± 0,7	86	24

Yuksel y colaboradores analizaron diferentes métodos de comparación de perfiles de disolución y sugieren que los métodos basados en ANOVA son más informativos y discriminativos que el de modelo independiente; aunque en el trabajo los autores concluyen que ambos métodos son útiles y pueden ser aplicados para la comparación de los perfiles de disolución.¹³⁴

En consecuencia, se realizó un ANOVA de una vía para profundizar en la comparación de los perfiles de disolución teniendo en cuenta una comparación “punto por punto”. Como se puede observar en la Figura 4.6, a partir del ANOVA^{xiii} se pudo confirmar que existe diferencia estadísticamente significativa entre el perfil de FUR con el de FT (como indicó el factor f_1) y, a su vez, entre el perfil de FTC con el de FTM, comprobado por el método independiente de modelo.

A partir de estos resultados, se puede inferir que la formación de sistemas multicomponentes entre FUR, TEA y los oligosacáridos es una estrategia interesante para mejorar el perfil de disolución del IFA, ya que los sistemas FTC y FTM presentan mayor velocidad de disolución y mayor cantidad de fármaco disuelto respecto de los sistemas binarios (FT, FC_{MAS} y FM_{MAS}).

SISTEMAS BINARIOS Y TERNARIOS CON ARGININA

Los perfiles de disolución obtenidos para FUR, los sistemas binarios (FA_{MF} , FA^2_{MF} , FA_{MAS} y FA^2_{MAS}) y los sistemas ternarios (FAC_{MF} , FAM_{MF} , FAC_{MAS} y FAM_{MAS}) se presentan en la Figura 4.7. La Tabla 4.5 se muestra el porcentaje de FUR disuelto a diferentes tiempos y los factores f_1 y f_2 obtenidos al comparar el perfil de disolución de FUR con los sistemas y las MF.

A partir de los perfiles de disolución se evidencia que las MF y los sistemas, tanto binarios como ternarios, presentan mayor velocidad de disolución que el fármaco libre y, además, que a partir de los 5 min todos los perfiles muestran un porcentaje de FUR disuelto superior al del IFA puro.

El perfil de disolución de la sal farmacéutica FA^2_{MAS} es notablemente diferente al perfil del IFA libre, al de las MF y a los del resto de los sistemas, tanto binarios como ternarios, por lo que, el porcentaje de FUR disuelta en FA^2_{MAS} es considerablemente superior al porcentaje de IFA disuelto en todos los otros casos (y a todos los tiempos evaluados).^{xiv}

^{xiii} ANOVA de una vía en el que se realizó una comparación múltiple utilizando el post- test de Tukey con un intervalo de confianza del 95%.

^{xiv} A partir de estos resultados se preparó por MAS el sistema FUR:ARG de estequiometría 1:3 en estado sólido y se realizó el ensayo de disolución, sin embargo, el perfil de disolución obtenido no presentó diferencias con el de FA^2_{MAS} .

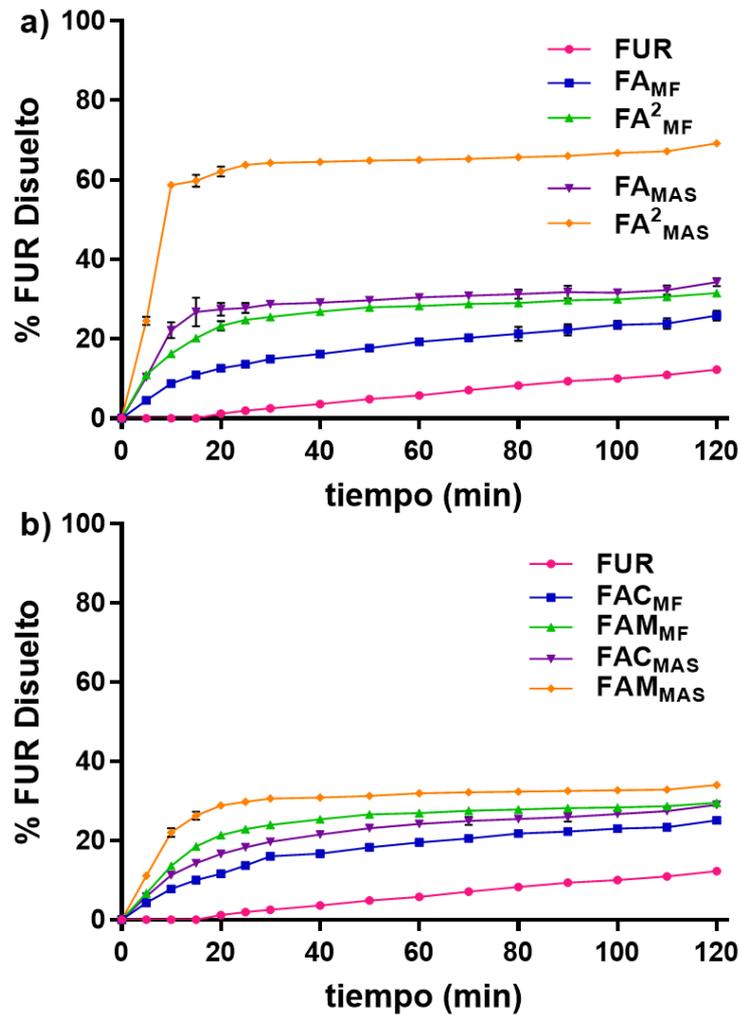


Figura 4.7. Perfil de disolución de FUR, los sólidos binarios (a) y ternarios (b).

Del análisis de los resultados de f_1 y f_2 obtenidos es posible decir que el perfil de disolución de FUR es diferente al de todas las MF y al de los sistemas tanto binarios como ternarios, dado que presentan valores de f_1 mayores a 15 y valores de f_2 menores a 50.

Al llevar a cabo la comparación entre los perfiles de disolución de todas las MF y todos los sistemas entre sí, se determinó que la mayoría de los perfiles no presentan diferencias significativas entre ellos. No obstante, se pudo comprobar que el perfil de FA^2_{MAS} es diferente al resto de los perfiles, ya que al compararlo con los de todas las MF y con los de FA_{MAS} , FAC_{MAS} y FAM_{MAS} los valores de f_1 obtenidos son mayores a 15 y los de f_2 menores a 50 en todos los casos.

Tabla 4.5. Porcentaje de FUR disuelto a diferentes tiempos. Valor de los factores de diferencia y similitud entre FUR y los sistemas.

SISTEMA	% FUR Disuelto (5 min)	% FUR Disuelto (15 min)	% FUR Disuelto (30 min)	% FUR Disuelto (60 min)	% FUR Disuelto (120 min)	f_1	f_2
FUR	0	0	2,5 ± 0,2	5,8 ± 0,3	12,2 ± 0,8	-	-
FAMF	4,5 ± 0,1	11,0 ± 0,5	14,9 ± 0,7	19,3 ± 0,9	26 ± 1	70	46
FA ² MF	11,0 ± 0,8	20,2 ± 0,6	25,5 ± 0,7	28,3 ± 0,4	31,5 ± 0,3	80	34
FAMAS	10,3 ± 0,3	26,8 ± 0,5	28,7 ± 0,9	30,4 ± 0,7	34 ± 1	82	31
FA ² MAS	24,5 ± 0,3	60 ± 1	64,3 ± 0,2	65,0 ± 0,5	69,2 ± 0,3	92	12
FACMF	4,28 ± 0,01	10,1 ± 0,2	16,0 ± 0,4	19,5 ± 0,3	25,2 ± 0,3	69	46
FAMMF	6,7 ± 0,1	18,6 ± 0,9	23,9 ± 0,2	26,9 ± 0,1	29,5 ± 0,1	78	36
FACMAS	5,9 ± 0,3	14,3 ± 0,7	19,7 ± 0,5	24,2 ± 0,9	29,0 ± 0,1	75	39
FAMMAS	11,1 ± 0,4	26 ± 1	30,6 ± 0,1	32,0 ± 0,4	34,2 ± 0,3	82	31

Los resultados obtenidos demuestran que la sal FUR:ARG de estequiometría 1:2 es la estrategia más prometedora para optimizar la biodisponibilidad oral de FUR en los seres humanos ya que es la que presenta el mejor perfil de disolución del fármaco.

PERMEABILIDAD

Se ha informado que tanto TEA como ARG pueden actuar promoviendo la absorción de ciertos IFAs en el organismo, administrados por diferentes vías. Por ejemplo, el sistema ternario entre acetazolamida (ACZ), hidroxipropil- β -CD y TEA (9,9% IFA permeado) incrementó considerablemente la permeabilidad corneal *in vitro* del fármaco en comparación con los sistemas binarios ACZ:hidroxipropil- β -CD (1,5% IFA permeado) y ACZ:TEA (1,5% IFA permeado); además, el agregado de TEA mostró un aumento en la eficacia y una reducción en los efectos secundarios del IFA en estudios de presión intraocular *in vivo*.⁸³ Por otro lado, se demostró que ARG es clave para promover la permeación de insulina a través de las barreras epiteliales intestinales dado que existe una notable mejora de la absorción de insulina después de la administración conjunta con L-ARG. También se ha informado que el efecto de este AA fue más significativo que el de otros AA catiónicos como HIS y LIS, y que el de D-ARG a diversas concentraciones. Otros estudios revelaron que después de la administración de L-ARG no se detectan filtraciones de lactato deshidrogenasa del epitelio intestinal y que no hay cambios en la resistencia eléctrica transepitelial de una monocapa de células Caco-2, indicando que no aparecen efectos indeseables en la integridad de las membranas celulares tras la administración de ARG. También se observó que luego de la administración oral de insulina o el sistema insulina:L-ARG a ratones, los efectos hipoglucemiantes fueron más importantes con la administración concomitante del fármaco con L-ARG.⁷⁰

A partir de estos antecedentes, con el propósito de evaluar el efecto de los diferentes ligandos sobre la permeabilidad de FUR y teniendo en cuenta que en el área farmacéutica se tiende a disminuir los estudios *in vivo* suplantándolos por pruebas *in vitro*, se realizaron experimentos de permeación *in vitro* para sistemas binarios de FUR con TEA, ARG, β -CD y MD y el sistema ternario de FUR con TEA y β -CD. Debido a que FUR es absorbida por un mecanismo de difusión pasiva, los experimentos se realizaron utilizando celdas de difusión de Franz bicompartimentales, con una membrana artificial biomimética a $37,0 (\pm 0,5) ^\circ\text{C}$ y con agitación continua de 14000 rpm. En todos los experimentos, los cocientes entre las concentraciones del fármaco en el compartimento receptor y donador, a todos los tiempos, fueron iguales o menores a 0,1 indicando que se mantuvieron las condiciones de sumidero durante todo el procedimiento. La comparación de los perfiles de permeabilidad se realizó utilizando un ANOVA de una vía con comparación múltiple utilizando el post-test de Tukey con un intervalo de confianza del 95%. Adicionalmente, los valores de P_{app} fueron determinados a partir de las pendientes de las porciones lineales iniciales de los gráficos de dQ vs t (Figura 4.8) utilizando la ecuación 4.4, los datos se muestran en la Tabla 4.6. La clasificación de la permeabilidad en baja/alta, tanto de FUR como de los sistemas, se realizó considerando que una $P_{app} < 0,64 \times 10^{-6}$ cm/seg indica baja permeabilidad, mientras que una $P_{app} > 0,64 \times 10^{-6}$ cm/seg apunta a una alta permeabilidad.¹⁴⁴

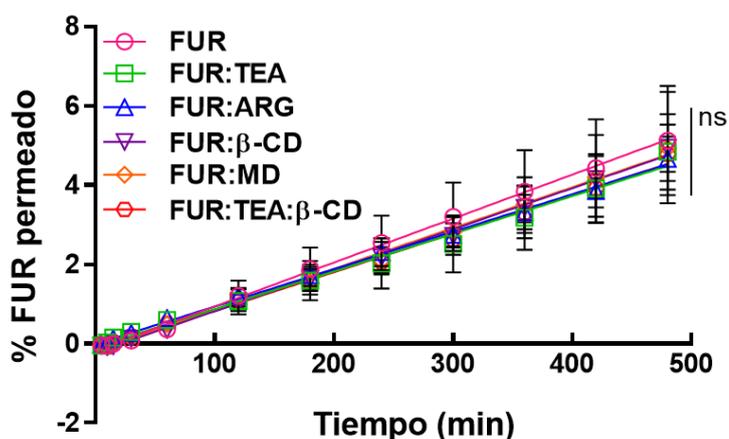


Figura 4.8. Perfiles de permeabilidad de FUR y los sistemas bajo estudio. Análisis por ANOVA de una vía post-test de Tukey. (ns) no significativo.

A pesar de que TEA y ARG potencian la permeación de ACZ e insulina, respectivamente, en la Figura 4.8 se puede observar que los perfiles de permeación de los diferentes sistemas estudiados no presentan diferencias estadísticamente significativas al perfil de permeación del IFA libre indicando que, en este modelo experimental, la permeabilidad de FUR no se ve

afectada por la presencia de los ligandos. A partir de estos resultados y de los valores de P_{app} obtenidos (Tabla 4.6) es posible clasificar a los sistemas como de baja permeabilidad al igual que al fármaco puro.

Tabla 4.6. Datos de P_{app} y clasificación de la permeabilidad de acuerdo al SCB para FUR y los sistemas derivados.

SISTEMA	$P_{app} \times 10^{-6}$ (cm/s)	Permeabilidad
FUR	0,408 \pm 0,006	Baja
FUR:TEA	0,34 \pm 0,01	Baja
FUR:ARG	0,37 \pm 0,01	Baja
FUR:CD	0,36 \pm 0,01	Baja
FUR:MD	0,36 \pm 0,01	Baja
FUR:TEA:CD	0,37 \pm 0,01	Baja

El factor limitante de la velocidad de permeación para fármacos de baja permeabilidad es la difusión a través de la membrana.¹⁴⁶ En la presente tesis doctoral se empleó un modelo experimental que representa la difusión pasiva por una vía paracelular o transcelular, sin considerar otros tipos de transporte (como por ejemplo la difusión pasiva facilitada por proteínas transportadoras, o los diferentes tipos de transporte activo).¹⁴⁴ Considerando esto, es posible postular que los sistemas desarrollados no favorecen la difusión pasiva del IFA a través de la membrana por una vía paracelular o transcelular, aunque no es posible predecir su efecto sobre la difusión pasiva facilitada por proteínas transportadoras o el transporte activo.

CONCLUSIONES PARCIALES

A partir de los resultados presentados en este capítulo, es posible concluir que muchos de los sistemas sólidos desarrollados tienen efectos altamente positivos sobre la velocidad de disolución y la cantidad de fármaco disuelto con respecto a su contraparte pura (SMZ y FUR libres).

SULFAMETOXAZOL

A partir de los estudios de disolución realizados a SMZ, las MF y las sales SH_{MAS} , SH_{LF} y SA_{LF} se comprobó que la MF de los componentes no aumenta el porcentaje de fármaco disuelto, aunque incrementa su velocidad de disolución.

SISTEMA	% SMZ Disuelto (120 min)	Incremento en la disolución
SMZ	39 ± 2	-
SH _{MAS}	68,4 ± 0,7	1,7
SH _{LF}	78,7 ± 0,8	2
SA _{LF}	79,5 ± 0,3	2

Por otro lado, SH_{MAS}, SH_{LF} y SA_{LF} evidenciaron aumento tanto en la velocidad como en el porcentaje final de SMZ disuelto. En el caso de SH_{MAS} y SH_{LF} este comportamiento puede deberse a la formación de la sal cristalina entre los componentes y en el caso de SA_{LF}, además

de la formación de la sal, a la amorfización del sólido. Los sistemas obtenidos mediante liofilización son los que presentaron los mejores resultados en cuanto a optimización del perfil de disolución de SMZ.

FUROSEMIDA

Luego de los estudios realizados se comprobó que los sistemas evaluados no modifican la difusión pasiva de FUR a través de membranas artificiales por vía paracelular o transcelular. Sin embargo, no se puede conocer el efecto de los ligandos en otros tipos de transporte, tales como la difusión pasiva facilitada por proteínas transportadoras o el transporte activo, ya que el método utilizado no permite detectar procesos que involucren a estas vías.

SISTEMA	% FUR Disuelto (120 min)	Incremento en la disolución
FUR	12,2 ± 0,8	-
FC _{MAS}	30,5 ± 0,7	2,5
FM _{MAS}	32,3 ± 0,1	2,6
FT	15,6 ± 0,1	1,3
FA _{MAS}	34 ± 1	2,8
FA ² _{MAS}	69,2 ± 0,3	5,7
FTC	35 ± 1	2,9
FTM	42,3 ± 0,7	3,5
FAC _{MAS}	29,0 ± 0,1	2,4
FAM _{MAS}	34,2 ± 0,3	2,8

Los estudios de disolución evidenciaron notables mejoras en los perfiles de los sistemas binarios y ternarios de FUR con respecto al del IFA libre, debido a que en todos los casos la velocidad de disolución y el porcentaje de fármaco disuelto fue superior a FUR libre. En esta tabla se puede apreciar que la sal FT es el sistema que presentó el menor porcentaje de FUR disuelto el cual fue solamente 1,3 veces superior al del fármaco libre, mientras que el

sistema binario FA²_{MAS} es el que evidenció el mejor perfil de disolución con un porcentaje disuelto 5,7 veces superior respecto al fármaco libre.

A partir de estos resultados se puede concluir que los sistemas ternarios FTC y FTM presentan ventajas con respecto a los sistemas binarios FC_{MAS}, FM_{MAS} y FT, ya que el incremento en la disolución es superior. Sin embargo, a pesar de que los sistemas ternarios FAC_{MAS} y FAM_{MAS} podrían presentar ventajas en las propiedades fisicoquímicas del estado sólido al estabilizar la sal amorfa FUR:ARG, no muestran ninguna ventaja desde el punto de vista de la disolución sobre el sistema binario FA_{MAS}. Finalmente, el sistema FA²_{MAS} es el que presentó los mejores resultados en cuanto a optimización del perfil de disolución de FUR.

CAPÍTULO 5: ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

CONSIDERACIONES GENERALES

El término **estabilidad** hace referencia a la permanencia de las características de un elemento o de una situación a través del tiempo. En el área de la química farmacéutica se considera que un medicamento se mantiene estable desde su fecha de producción hasta que la actividad química o biológica del IFA no sea menor al 90% de la cantidad declarada y sus características físicas, microbiológicas y biofarmacéuticas se mantengan dentro de los parámetros establecidos.¹⁴⁷

Cuando la estabilidad química y/o física de un medicamento se ve modificada pueden surgir numerosos efectos adversos que podrían afectar su calidad, seguridad y eficacia; por ejemplo: (1) la disminución o incremento en la concentración del principio activo puede afectar el efecto farmacológico, ya sea por pérdida o potenciación de la actividad terapéutica; (2) la formación de productos de degradación del principio activo o de los excipientes presentes en la formulación pueden resultar nocivos para el paciente; (3) se pueden producir cambios en la biodisponibilidad del medicamento.¹⁴⁸ Estos problemas implican grandes riesgos para la salud de los seres humanos debido a que la patología que se desea tratar podría progresar causando severos inconvenientes e incluso la muerte del paciente. Es por esto que un medicamento se debe mantener estable desde su elaboración hasta el momento de la administración a un paciente (pasando por las etapas de almacenamiento, transporte, distribución y dispensación).

FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE UN IFA

Entre los factores que afectan la estabilidad de un IFA o de un medicamento se pueden mencionar factores ambientales como temperatura, humedad, oxígeno, luz; la interacción entre el IFA y los otros componentes de la formulación; la presencia de solventes; entre otros. A su vez, entre las principales vías de degradación de un IFA se encuentran hidrólisis, oxidación, deshidratación, fotodegradación, isomerización y racemización, las cuales conllevan a que ciertos IFAs presenten grandes limitaciones para su aprobación y comercialización por sus inadecuadas características de estabilidad.¹⁴⁷

ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE UN IFA

Los estudios o análisis de estabilidad son efectuados para determinar el periodo de tiempo y las condiciones de almacenamiento en las cuales las materias primas y los medicamentos se mantienen dentro de las especificaciones sobre identidad, potencia, calidad y pureza establecidas en la Farmacopea Argentina, bajo la influencia de una variedad de factores ambientales tales como temperatura, humedad, luz y los demás componentes de la formulación.¹⁴⁹ Los procedimientos analíticos empleados para cuantificar al IFA en los estudios de estabilidad deben ser cuantitativos y permitir determinar la disminución en la cantidad de fármaco debido a su degradación; es decir, deben poder cuantificar al IFA en forma precisa y exacta, en presencia de sus productos de degradación, de los excipientes y de otras impurezas. Además, los estudios de estabilidad deben tener en cuenta los cambios en las propiedades físicas del IFA a lo largo del tiempo.

TIPOS DE ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN FORZADA

Estos estudios se llevan a cabo para obtener datos sobre los productos de degradación, los mecanismos de descomposición del fármaco y verificar la aptitud de los métodos analíticos propuestos para la cuantificación del IFA. Los ensayos se realizan bajo condiciones más severas que las aplicadas en los otros tipos de estudios de estabilidad. Generalmente se evalúa el efecto de altas temperaturas, de la humedad, de la oxidación, de la luz y la susceptibilidad del IFA a la hidrólisis a distintos valores de pH.¹⁴⁹

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD ACELERADOS

Este tipo de estudios se realizan para aumentar la velocidad de degradación o los cambios físicos de un IFA o un medicamento, utilizando condiciones de almacenamiento extremas, aunque más leves que las condiciones empleadas en los estudios de degradación forzada. Los estudios acelerados permiten establecer un período de vida útil provisorio, además, permiten obtener información sobre los parámetros cinéticos (orden de reacción y constante de velocidad) de la degradación química de un fármaco.¹⁴⁹

ESTUDIOS DE LARGA DURACIÓN O EN TIEMPO REAL

Estos estudios son utilizados para evaluar las características de estabilidad química, física, biológica y microbiológica de un IFA o medicamento, cubriendo el período de vida útil o el período de re-análisis propuesto (como mínimo doce meses). Debe realizarse en las condiciones de almacenamiento determinadas previamente para cada fármaco o

medicamento en particular. Los estudios de larga duración permiten confirmar el período de vida útil proyectado en los estudios acelerados.¹⁴⁹

ESTABILIDAD QUÍMICA

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

La mayoría de los procedimientos empleados para analizar la calidad de los IFAs y los medicamentos se encuentran descritos en Farmacopeas. Sin embargo, cuando el método requerido para controlar un IFA no se encuentra descrito, es necesario desarrollar un procedimiento analítico que sea indicativo de estabilidad. El procedimiento desarrollado debe considerar las características de las muestras a analizar, de manera de obtener un método que permita la correcta resolución de todos los compuestos presentes (IFA, excipientes y productos de degradación).

VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

De acuerdo a la Farmacopea Argentina la validación es el proceso por el cual se establece, por medio de estudios de laboratorio debidamente documentados, que un método es apropiado para el uso propuesto. El objetivo de la validación es asegurar que cada medición es lo suficientemente cercana al valor verdadero y que los resultados producidos son confiables.

A la hora de realizar la validación de un nuevo procedimiento analítico o de modificar un procedimiento ya existente, se deben considerar los siguientes parámetros^{104,149-151}:

- **Selectividad:** es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de interferentes (productos de degradación, excipientes o impurezas).
- **Linealidad:** es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean directamente proporcionales a la cantidad del analito.
- **Sensibilidad:** es la capacidad de un método de producir una gran variación de respuesta ante un pequeño cambio de concentración del analito.
- **Precisión:** es el grado de concordancia entre los resultados de un ensayo individual. La precisión se puede estudiar a tres niveles:
 - **Repetibilidad:** es la precisión bajo condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen en el mismo laboratorio por el mismo

operador utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo.

- Precisión intermedia: es la precisión bajo condiciones donde los resultados de los análisis independientes se obtienen en condiciones diferentes en el mismo laboratorio (diferentes días, diferentes operadores, diferentes equipos).
- Reproducibilidad: es la precisión bajo condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen en diferentes laboratorios. Es un parámetro aplicable sólo en el caso de la estandarización de procedimientos analíticos, por ejemplo, para métodos que serán incluidos en una Farmacopea.
- Exactitud: este parámetro expresa la proximidad entre el valor verdadero o valor de referencia y el valor encontrado experimentalmente.
- Robustez: es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método; proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento.
- Rango: es el intervalo de concentraciones para el cual se ha demostrado la correcta linealidad, precisión y exactitud del método.
- Límite de detección: es la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, en una muestra bajo las condiciones experimentales establecidas. Se expresa en unidades de concentración.
- Límite de cuantificación: es la mínima cantidad de analito que puede cuantificarse con una adecuada precisión y exactitud. Se expresa en unidades de concentración.

MODELO CINÉTICO

En una reacción de degradación m moléculas del IFA (F) colisionan con n moléculas de X para dar origen a uno o más productos de degradación (P). El o los productos de degradación se formarán si F y X colisionan con suficiente energía para permitir el reordenamiento molecular que dé origen a P.



Reacción 5.1. Reacción general de degradación.

La ecuación de velocidad expresa cómo varía la concentración de una especie molecular con respecto al tiempo, como función matemática de una constante de velocidad

(k) y de las concentraciones de cada especie molecular que interviene en la reacción (Ecuación 5.1). La velocidad de degradación de F depende de la concentración de F y de la concentración de X.

$$-\frac{d[F]}{dt} = k [F]^m [X]^n \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

La forma en que la concentración de un componente influye en la velocidad de la reacción expresa el orden de reacción. Si analizamos la ecuación 5.1, se puede apreciar que el orden global de la reacción será $m + n$ y la reacción será de orden m con respecto a la concentración de F y de orden n con respecto a la concentración de X; por ejemplo, si $m = n = 1$ la reacción será de segundo orden.

Cuando la concentración de un componente se mantiene constante durante el transcurso de una reacción, ésta puede considerarse como una reacción de pseudo orden menor. Por ejemplo, si X representa a moléculas de agua, éstas se encontrarán en exceso con respecto a F, por lo que se considera que su concentración no se modificará con el tiempo, por lo tanto, tendríamos una reacción de pseudo-primero orden donde k' tiene en cuenta la concentración de X.

$$-\frac{d[F]}{dt} = k' [F]^m \quad (\text{Ecuación 5.2})$$

La velocidad de reacción puede ser expresada con los valores de k, aunque la forma más utilizada de expresarla es con el tiempo de vida media (t_{50}) o con el tiempo de vida útil (t_{90})^{xv} del IFA (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Parámetros para reacciones de orden cero, primer orden y segundo orden con respecto a la concentración de IFA.

	Orden Cero	Primer Orden	Segundo Orden
Ecuación lineal	$[F] = [F_0] - k_0 t$	$\ln [F] = \ln [F_0] - k_1 t$	$1/[F] = 1/[F_0] + k_2 t$
Ordenada al origen	$[F_0]$	$\ln [F_0]$	$1/[F_0]$
Pendiente	$-k_0$	$-k_1$	k_2
Unidades de k	concentración tiempo ⁻¹	tiempo ⁻¹	concentración ⁻¹ tiempo ⁻¹
t₅₀	$\frac{0,5[F_0]}{k_0}$	$\frac{0,693}{k_1}$	$\frac{1}{[F_0]k_2}$
t₉₀	$\frac{0,1[F_0]}{k_0}$	$\frac{0,105}{k_1}$	$\frac{0,111}{[F_0]k_2}$

[F₀] = concentración inicial del IFA

^{xv} El tiempo de vida media (t_{50}) y el tiempo de vida útil (t_{90}) representan el tiempo que tarda un IFA en alcanzar el 50% o 90% de su concentración inicial, respectivamente.

ESTABILIDAD FÍSICA

Es requisito indispensable que los sólidos farmacéuticos se mantengan estables a través del tiempo tanto conservando su composición química como su forma sólida, es decir su estado amorfo o cristalino. De encontrarse el sólido en forma cristalina es fundamental que no exista una transformación polimórfica con el correr del tiempo.

Es por esto que en el sector farmacéutico es necesario controlar la forma sólida de los IFAs durante el proceso de fabricación de los medicamentos, así como también en el período de almacenamiento de éstos.

Numerosas metodologías que son empleadas en la caracterización de los IFAs sólidos pueden ser utilizadas para evaluar su estabilidad física. Dichas técnicas se seleccionan teniendo en cuenta las características de cada IFA en particular. En este trabajo de tesis doctoral, las técnicas utilizadas para evaluar la estabilidad física se escogieron teniendo en cuenta los resultados evidenciados previamente en la caracterización de los sistemas supramoleculares sólidos.

Como se dijo anteriormente, FUR es un IFA utilizado en el tratamiento de la hipertensión y el edema que presenta varias formas polimórficas, siendo la forma I la que se encuentra disponible comercialmente, dado que las otras formas cristalinas tienden a transformarse en ésta con el tiempo. Se conoce que FUR es susceptible a hidrólisis catalizada por ácidos y por altas temperaturas debido a que contiene un grupo amino secundario, además es inestable a la luz ya que exhibe fotooxidación, fotohidrólisis y fotodescloración.²⁷⁻³⁰

En capítulos anteriores se demostró que es posible superar el problema de solubilidad de FUR ya que incrementa más de 100 veces su solubilidad en agua al interactuar con ARG. Además, a partir de la formación de una sal farmacéutica con dicho AA se logró optimizar 6 veces su perfil de disolución y mantener su permeabilidad. En este contexto, con el objetivo de analizar el efecto de los sistemas supramoleculares desarrollados sobre la estabilidad del IFA, se estudió:

- La susceptibilidad de FUR y de los sistemas supramoleculares a absorber vapor de agua al ser almacenados en un gabinete de estabilidad durante 6 meses.
- La estabilidad química de FUR y de los sistemas supramoleculares utilizando un procedimiento analítico HPLC-UV indicativo de estabilidad, previamente desarrollado por el grupo de investigación, el cual permite la correcta resolución de todos los compuestos presentes (FUR, ligandos y productos de degradación).⁹⁵
- La estabilidad física de FUR y de los sistemas supramoleculares utilizando las técnicas de RMNss y DRXP.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Los materiales y reactivos utilizados fueron descritos en el capítulo “Estudios en Solución”. Los solventes utilizados fueron de grado analítico o HPLC. El agua utilizada en todos los ensayos fue obtenida a partir de un sistema de purificación de agua Millipore Milli-Q (Millipore®, USA).

INSTRUMENTAL Y DESARROLLO EXPERIMENTAL

La balanza, el pH-metro, el sonicador y el vortex utilizados fueron descritos en el capítulo “Estudios en Solución”.

Los espectros de alta resolución de ^{13}C en sólidos se adquirieron como se describió en el capítulo “Estudios en Estado Sólido”. Mientras que, los patrones de DRXP se registraron en la Facultad de Ciencias Químicas (UNC) utilizando un equipo PANalytical X Pert PRO con voltaje y corriente eléctrica de 40 kV y 40 mA, respectivamente. El ancho de ranura utilizado para el haz incidente en la muestra fue de 0,6 mm. Las muestras se escanearon en un rango de 2θ entre 4° y 35° en un modo de escaneo por pasos (tamaño de paso de 0,026 y 29 seg) y a temperatura ambiente.

PREPARACIÓN DE SISTEMAS EN ESTADO SÓLIDO

Los sistemas binarios y ternarios (FT, FA_{MAS} , FA_{MF} , FA^2_{MAS} , FA^2_{MF} , FTC, FTM, FAC_{MAS} , FAC_{MF} , FAM_{MAS} y FAM_{MF}) utilizados, se seleccionaron siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo “Estudios de Disolución y Permeabilidad”.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE IFA

Con el objetivo de determinar el contenido exacto de FUR en cada sistema binario y ternario se disolvió una cantidad de sólido conteniendo el equivalente a 10 mg de FUR en 10 mL de una mezcla metanol:agua (50:50, v/v). Luego de la dilución apropiada en agua Milli-Q, las muestras se analizaron con HPLC-UV utilizando el procedimiento que se describe a continuación. Cada determinación de contenido se realizó por triplicado.

ESTUDIO DE ESTABILIDAD

Con el fin de investigar el efecto de los sistemas supramoleculares desarrollados en los procesos de fotodegradación de FUR en condiciones de almacenamiento acelerado, se ejecutaron pruebas siguiendo los requisitos de las directrices de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH Q1A (R2), 2003). Las muestras se almacenaron por triplicado en un gabinete de estabilidad^{xvi} en viales de vidrio transparentes a 40 (\pm 2) °C, 75 (\pm 5) % de humedad relativa (HR) y expuestos a la luz durante un período de 6 meses.

ESTUDIO DE HIGROSCOPICIDAD

Las muestras sólidas de los estudios de estabilidad química y física se pesaron con precisión antes del almacenamiento. A intervalos predeterminados [un mes (t_1), tres meses (t_3) y seis meses (t_6)] se retiraron del gabinete muestras de cada sólido y se evaluaron posibles modificaciones en su masa.

ESTUDIO DE ESTABILIDAD QUÍMICA

SELECCIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Para estudiar el proceso de degradación química de un IFA se requiere de un procedimiento analítico indicativo de estabilidad que permita la correcta separación del componente de interés de otras sustancias presentes en la muestra (excipientes o ligandos, productos de degradación). Cuando no existe un procedimiento descrito para cuantificar un IFA en particular es necesario desarrollar y validar un nuevo método, para lo cual se expone al IFA a diferentes condiciones de estrés^{xvii} con la finalidad de obtener los principales productos de degradación. Sin embargo, para el caso de FUR se seleccionó un procedimiento analítico HPLC-UV previamente desarrollado y validado por el grupo de investigación.⁹⁵ Se utilizó un cromatógrafo líquido Agilent 1100 Series (Agilent, Waldbronn, Alemania) que cuenta con un sistema de bombeo isocrático G1310A, inyector automático G1313A, compartimento termostatzado para columna G1316A y detector UV-Visible con longitud de onda variable G1365B. Las condiciones experimentales se establecieron para evitar interferencias de los productos de degradación.

Condiciones cromatográficas:

- Fase móvil: Buffer fosfato de potasio (KH_2PO_4 10 mM, pH 3,0) - ACN 60:40 (v/v).

^{xvi} El gabinete de estabilidad fue adaptado por el Laboratorio de Investigación Aplicada y Desarrollo (LIADE) de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba.

^{xvii} En los estudios de degradación forzada se expone al IFA a condiciones extremas de temperatura, humedad, oxidación, luz y se mide la susceptibilidad a la hidrólisis a distintos valores de pH.

- Fase estacionaria: Columna Phenomenex Gemini-C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) y precolumna SecurityGuard-C18 (4 mm x 3,0 mm) suministradas por Phenomenex (Torrance, CA, USA).
- Longitud de onda: 276 nm
- Temperatura: 25 °C
- Flujo: 1,5 mL/min
- Volumen de inyección: 20 μ L

VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Para validar o modificar un procedimiento analítico previamente descrito se deben tener en cuenta diversos parámetros como: selectividad, linealidad, sensibilidad, precisión, exactitud, robustez. El procedimiento propuesto para la cuantificación de FUR fue previamente validado en el laboratorio y en el equipo a utilizar, no obstante, con el objetivo de establecer que este método es adecuado para la cuantificación de FUR en los sistemas desarrollados, se evaluó la linealidad, precisión y exactitud del procedimiento para cada caso en particular.

LINEALIDAD

Se realizaron las curvas de calibrado por triplicado con el objetivo de realizar la correcta cuantificación de las diferentes muestras: FUR, FT, FA_{MAS}, FA_{MF}, FA²_{MAS}, FA²_{MF}, FTC, FTM, FAC_{MAS}, FAC_{MF}, FAM_{MAS} y FAM_{MF}. Para ello, se utilizaron soluciones de FUR a 7 niveles de concentraciones (entre 8-32 μ g/mL), y se mantuvo constante la concentración de los ligandos estudiados en 20 μ g/mL. Las soluciones se prepararon por triplicado, se llevaron a volumen final de 5 mL con agua Milli-Q, se filtraron utilizando membranas de tamaño de poro de 0,45 μ m (Millipore®, USA), se inyectaron en el cromatógrafo y se corrieron bajo las condiciones descritas previamente.

Los datos de calibración se grafican como respuesta en función de la concentración de FUR y mediante análisis de regresión lineal se determina la recta de regresión:

$$y = b x + a \quad \text{(Ecuación 5.3)}$$

donde a = ordenada al origen y b = pendiente.

Un método común para estimar el ajuste de los puntos experimentales consiste en calcular el coeficiente de regresión lineal (r). El valor de r igual a 1 indica una recta perfectamente lineal; en la práctica se acepta un valor de r mayor de 0,99.

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}} \quad \text{(Ecuación 5.4)}$$

donde x_i = concentración, y_i = el valor medido, \bar{x} = media de la concentración y \bar{y} = media de los valores medidos.

En la Tabla 5.2 se presentan los parámetros calculados a partir del tratamiento estadístico de los datos de calibración. Los resultados obtenidos demuestran que el procedimiento analítico es lineal en el rango de concentraciones de FUR comprendido entre 8 y 32 µg/mL, en presencia de los diferentes ligandos evaluados dado que el valor del coeficiente de regresión lineal (r) se encuentra cercano a 1.

Tabla 5.2. Parámetros analíticos de las curvas de calibración.

Muestra	Ecuación de regresión	r
FUR	Área: 20194 C (µg/ml) + 43	0,9936
FT	Área: 32578 C (µg/ml) + 103	0,9922
FTC	Área: 29228 C (µg/ml) + 106	0,9915
FTM	Área: 29621 C (µg/ml) + 102	0,9936
FA (FAM _{MF} , FA _{MAS} , FA ² _{MF} y FA ² _{MAS})	Área: 35493 C (µg/ml) + 79	0,9945
FAC (FAC _{MF} y FAC _{MAS})	Área: 31542 C (µg/ml) + 87	0,9947
FAM (FAM _{MF} y FAM _{MAS})	Área: 27676 C (µg/ml) + 101	0,9908

C: Concentración

PRECISIÓN (REPETIBILIDAD) Y EXACTITUD

Se utilizaron soluciones de FUR a tres niveles de concentración: 80%, 100% y 120% de la concentración nominal de 20,0 µg/mL. Se prepararon tres replicas para cada nivel de concentración y se analizaron en el mismo día.

La repetibilidad se verificó mediante el coeficiente de variación porcentual (CV%) de la serie de medidas:

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{(Ecuación 5.5)}$$

donde SD = desviación estándar y \bar{x} = media de una serie de valores.

Según el criterio de aceptación, los valores obtenidos de CV% deben ser menores al 2% para que el método sea considerado preciso.

La precisión da idea del grado de concordancia entre los resultados de un ensayo individual. El parámetro fue determinado por la repetibilidad, dado que los resultados analíticos fueron obtenidos por el mismo operador, en el mismo laboratorio, utilizando el mismo equipamiento y dentro de intervalos cortos de tiempo. Los resultados que se exponen en la Tabla 5.3 permiten concluir que el procedimiento analítico cumple con el criterio de aceptación para la repetibilidad debido a que CV% es menor al 2% en todos los casos.

La exactitud se evaluó mediante el porcentaje de recuperación medio respecto al valor teórico:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración estimada}}{\text{Concentración nominal}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 5.6})$$

Según el criterio de aceptación, los % recuperación obtenidos deben estar comprendidos entre el 98% y el 102% del valor aceptado como verdadero para que el método sea considerado exacto.

La exactitud es un parámetro que da idea de la proximidad entre el valor de referencia y el valor encontrado experimentalmente. A partir de los resultados presentados en la Tabla 5.3, se puede concluir que el procedimiento analítico cumple con el criterio de aceptación para este parámetro, ya que tanto el porcentaje están comprendido en el intervalo 98-102% en todos los casos evaluados.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los diferentes parámetros (linealidad, precisión y exactitud), se puede confirmar que el procedimiento analítico seleccionado es el adecuado para cuantificar el contenido de FUR en las diferentes muestras sólidas obtenidas.

Tabla 5.3. Resultados obtenidos en ensayos de recuperación de FUR aplicando el método HPLC-UV (valor nominal: 20 µg/ml).

Muestra	% Valor Nominal	80%	100%	120%
	Concentración Teórica	16 µg/ml	20 µg/ml	24 µg/ml
FUR	Valor determinado	15,97 µg/ml	19,76 µg/ml	24,35 µg/ml
		16,24 µg/ml	20,11 µg/ml	24,44 µg/ml
		16,26 µg/ml	20,38 µg/ml	24,11 µg/ml
	CV%	1	1,5	0,7
	% Recuperación	99,8	98,8	101,4
		101,5	100,5	101,8
		101,6	101,9	100,5
	% Recuperación media	100,9		
FT	Concentración Hallada	15,85 µg/ml	20,01 µg/ml	24,38 µg/ml
		16,27 µg/ml	19,97 µg/ml	23,81 µg/ml
		15,71 µg/ml	19,87 µg/ml	23,94 µg/ml
	CV%	1,8	0,4	1,3
	% Recuperación	99	100	101,6
		101,7	99,9	99,2
		98,2	99,3	99,8
	% Recuperación media	99,9		
FTC	Concentración Hallada	16,21 µg/ml	20,33 µg/ml	23,59 µg/ml
		15,71 µg/ml	20,37 µg/ml	23,54 µg/ml
		15,96 µg/ml	20,34 µg/ml	24,26 µg/ml
	CV%	1,6	0,1	1,7
	% Recuperación	101,3	101,7	98,3
		98,2	101,9	98,1
		99,8	101,7	101,1
	% Recuperación media	100,2		
FTM	Concentración Hallada	16,05 µg/ml	20,30 µg/ml	24,01 µg/ml
		15,69 µg/ml	20,34 µg/ml	23,83 µg/ml
		15,68 µg/ml	20,31 µg/ml	24,45 µg/ml
	CV%	1,3	0,1	1,3
	% Recuperación	100,3	101,5	100
		98,1	101,7	99,3
		98,0	101,6	101,9
	% Recuperación media	100,3		
FA	Concentración Hallada	16,08 µg/ml	20,31 µg/ml	23,66 µg/ml
		16,22 µg/ml	20,29 µg/ml	23,59 µg/ml
		16,25 µg/ml	20,27 µg/ml	24,42 µg/ml
	CV%	0,6	0,1	1,9
	% Recuperación	100,5	101,5	98,6
		101,4	101,5	98,3
		101,6	101,3	101,8
	% Recuperación media	100,7		
FAC	Concentración Hallada	16,23 µg/ml	19,85 µg/ml	23,64 µg/ml
		15,73 µg/ml	19,66 µg/ml	23,83 µg/ml
		15,71 µg/ml	19,73 µg/ml	24,20 µg/ml
	CV%	1,9	0,5	1,2
	% Recuperación	101,5	99,2	98,5
		98,3	98,3	99,3
		98,2	98,6	100,8
	% Recuperación media	99,2		
FAM	Concentración Hallada	16,21 µg/ml	20,33 µg/ml	23,77 µg/ml
		15,74 µg/ml	20,37 µg/ml	23,59 µg/ml
		15,94 µg/ml	20,34 µg/ml	24,44 µg/ml
	CV%	1,5	0,1	1,9
	% Recuperación	101,3	101,7	99,0
		98,4	101,9	98,3
		99,6	101,7	101,8
	% Recuperación media	100,4		

RECUPERACIÓN DE FUROSEMIDA EN LAS MUESTRAS SÓLIDAS

Para evaluar la estabilidad química de FUR en las MF y en los sistemas supramoleculares, el contenido de FUR se determinó al tiempo inicial (t_0) y cada 30 días hasta los 6 meses (t_{1-6}). A cada muestra (conteniendo el equivalente a 10 mg de FUR) se le agregó 10 mL de una mezcla metanol:agua (50:50, v/v), se sonicó durante 15 minutos, se realizaron las diluciones adecuadas para su cuantificación y se filtró utilizando membranas de 0,45 μm (Millipore®, USA). El porcentaje de FUR recuperado en cada muestra almacenada en el gabinete se cuantificó aplicando el procedimiento analítico HPLC-UV previamente descrito. Se tomó como 100% de recuperación la relación concentración/área obtenida por HPLC-UV, para cada sistema, al ser analizado el día en que se preparó. Las soluciones se prepararon por triplicado y el resultado informado es el valor promedio de las mediciones.

A partir de los resultados se determinó la constante de velocidad de degradación (k), el t_{90} y el t_{50} de los sólidos en estudio utilizando las ecuaciones que se muestran en la Tabla 5.1.

ESTUDIO DE ESTABILIDAD FÍSICA

Con el fin de evaluar posibles transformaciones en fase sólida, se analizó la estabilidad física de FUR, de las MF y de los sistemas en el tiempo inicial (t_0), al mes (t_1), a los tres meses (t_3) y después de seis meses (t_6) de almacenamiento utilizando las técnicas de RMNss y DRXP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ESTUDIO DE ESTABILIDAD

ESTUDIO DE HIGROSCOPICIDAD

La cantidad de vapor de agua absorbida por una sustancia es un parámetro fisicoquímico conocido como higroscopicidad. Esta propiedad es muy importante para el sector farmacéutico y debe ser controlada durante el proceso de desarrollo de un medicamento ya que, si se determina que la humedad compromete las propiedades físicas o químicas de un IFA, estos datos pueden utilizarse para guiar la selección de excipientes, definir parámetros de procesamiento que aseguren la estabilidad fisicoquímica o identificar requisitos de empaque que controlen la penetración de humedad en el medicamento.¹⁵² Sin embargo, la Farmacopea Argentina no posee un procedimiento descrito para evaluar y clasificar esta propiedad. Asimismo, no existe un método que se utilice universalmente para clasificar a los sólidos farmacéuticos en cuanto a su nivel de higroscopicidad.

No obstante, diferentes autores han empleado diversos criterios para estudiar y clasificar la higroscopicidad de los sólidos. Por ejemplo, la Farmacopea Europea mide la cantidad de agua absorbida a 25 °C y 80% de HR y los clasifica como se describe en la Tabla 5.4.¹⁵³ Por otro lado, Callahan y colaboradores, al considerar tanto la cantidad como la tasa de absorción de agua en varios rangos de HR, establecieron cuatro clases de higroscopicidad también descritas en la Tabla 5.4.¹⁵³ Estos dos sistemas de clasificación son lo suficientemente diferentes como para que la categorización de la higroscopicidad dependa del esquema utilizado.

Tabla 5.4. Esquema de clasificación de la higroscopicidad. Tabla adaptada del trabajo publicado por Newman y colaboradores.¹⁵³

Clasificación	Farmacopea Europea	Callahan y colaboradores
No higroscópico	0 - 0,12 % (p/p)	Clase I: sin aumento de humedad por debajo del 90% de HR; menos del 20% (p/p) de aumento en el contenido de humedad por encima del 90% de HR en 1 semana
Levemente higroscópico	0,2 - 2 % (p/p)	Clase II: sin aumento de humedad por debajo del 80% de HR; menos del 40% (p/p) de aumento en el contenido de humedad por encima del 80% de HR en 1 semana
Moderadamente higroscópico	2 - 15 % (p/p)	Clase III: el contenido de humedad no aumenta más del 5% (p/p) por debajo del 60% de HR; menos del 50% (p/p) de aumento en el contenido de humedad por encima del 80% de HR en 1 semana
Muy higroscópico	> 15% (p/p)	Clase IV: el contenido de humedad aumenta a 40-50% de HR; aumento de más del 20% (p/p) en el contenido de humedad por encima del 90% de HR en 1 semana

A partir de la falta de un criterio unificado para estudiar y clasificar los sólidos en cuanto a higroscopicidad, en la presente tesis doctoral se evaluó la cantidad de agua absorbida por FUR y los sistemas supramoleculares al ser almacenados en un gabinete a 40 °C y 75% de HR y, además, se utilizó el criterio de la Farmacopea Europea para realizar la clasificación de los sólidos.

En la Figura 5.1 se muestra el porcentaje de aumento de masa de las muestras en función del tiempo. Los resultados evidencian la ganancia de masa del IFA puro, de las MF y de los sistemas en el transcurso del tiempo de estudio^{xviii}, lo que puede atribuirse a la absorción de vapor de agua por los sólidos. Al analizar los resultados de los sistemas binarios y ternarios conteniendo TEA, se puede apreciar que luego de un mes de almacenamiento el porcentaje de aumento de masa del sistema FT es similar al de FUR y significativamente menor que los valores determinados para los sistemas ternarios FTC y FTM. Sin embargo, luego de 3 meses la relación se invierte y el porcentaje de aumento de masa de los sistemas ternarios es menor

^{xviii} Se realizó la aproximación de atribuirle el cambio de masa a la incorporación de agua.

al del sistema binario y mayor al de FUR libre. Finalmente, transcurridos 6 meses de almacenamiento, se evidencia que el porcentaje de aumento de masa (con respecto a t_3) aumenta considerablemente para el fármaco libre, aumenta levemente para FT y FTM y se mantiene constante para el sistema FTC. A partir de estos resultados se puede clasificar a FUR y FT como sólidos “*moderadamente higroscópicos*” y a FTC y FTM como sólidos “*levemente higroscópicos*” (Tabla 5.5).

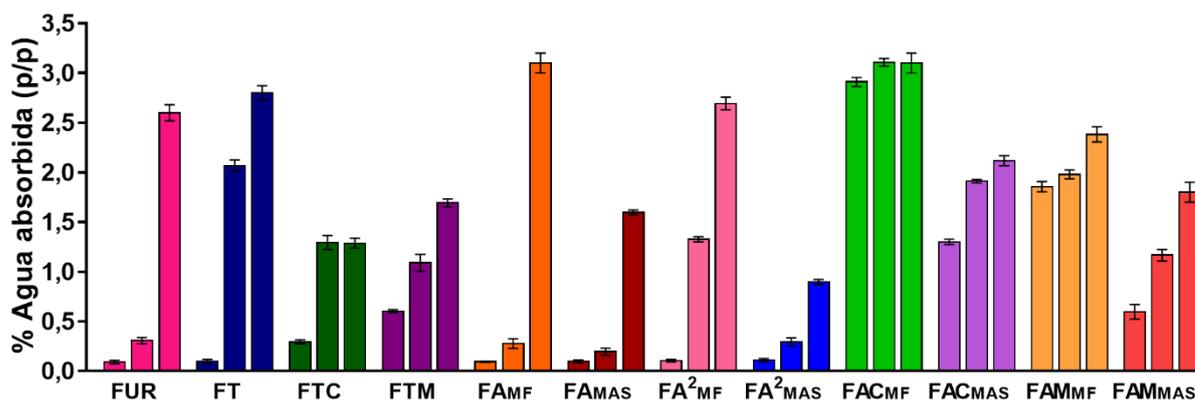


Figura 5.1. Porcentaje de agua absorbida por las muestras almacenadas a 40 °C y 75% de HR a diferentes tiempos expresados en meses: t_1 , t_3 y t_6 (de izquierda a derecha).

Los resultados obtenidos para los sólidos binarios y ternarios conteniendo ARG (Figura 5.1) evidencian que luego de transcurridos 6 meses las muestras obtenidas por MF son más higroscópicas que los respectivos sistemas obtenidos por MAS. En las muestras FA_{MF} , FA^2_{MF} , FA_{MAS} y FA^2_{MAS} la absorción de vapor de agua al t_1 es la misma en todos los casos mientras que al t_3 y t_6 es mayor en las MF que en FA_{MAS} y FA^2_{MAS} , siendo considerados FA_{MF} y FA^2_{MF} como sólidos “*moderadamente higroscópicos*” y, a su vez, FA_{MAS} y FA^2_{MAS} como sólidos “*levemente higroscópicos*” (Tabla 5.5).

Por otro lado, se observa un marcado incremento en la masa de FAC_{MF} al t_1 , el cual aumenta levemente hasta los 3 meses y luego se mantiene constante, mientras que el aumento de masa en FAC_{MAS} es menor (Figura 5.1), sin embargo, ambos sólidos son considerados “*moderadamente higroscópicos*” luego de 6 meses de almacenamiento a 40 °C y 75% de HR (Tabla 5.5).

Por su parte, tanto FAM_{MF} como FAM_{MAS} evidencian un aumento de masa mayor a FUR al t_1 , el cual se mantiene hasta los 3 meses de almacenamiento (Figura 5.1). Sin embargo, luego de transcurridos 6 meses, el aumento de masa de FUR es superior al de estas muestras ternarias. Finalmente, FAM_{MAS} es considerado “*levemente higroscópico*” mientras que FAM_{MF} es considerado “*moderadamente higroscópico*” (Tabla 5.5).

Tabla 5.5. t_6 : Aumento de masa después de 6 meses de almacenamiento a 40 °C y 75% de HR expresado como g de humedad absorbida por cada 100 g de sólido seco (p/p) y clasificación de la higroscopicidad de las muestras de acuerdo a la Farmacopea Europea (FE).

Muestra	Aumento de masa (p/p)	Clasificación (FE)
FUR	2,60 ± 0,08	Moderadamente higroscópico
FT	2,80 ± 0,07	Moderadamente higroscópico
FTC	1,29 ± 0,05	Levemente higroscópico
FTM	1,69 ± 0,04	Levemente higroscópico
FA_{MF}	3,1 ± 0,1	Moderadamente higroscópico
FA_{MAS}	1,60 ± 0,03	Levemente higroscópico
FA²_{MF}	2,69 ± 0,07	Moderadamente higroscópico
FA²_{MAS}	0,90 ± 0,03	Levemente higroscópico
FAC_{MF}	3,1 ± 0,1	Moderadamente higroscópico
FAC_{MAS}	2,12 ± 0,05	Moderadamente higroscópico
FAM_{MF}	2,38 ± 0,08	Moderadamente higroscópico
FAM_{MAS}	1,8 ± 0,1	Levemente higroscópico

El orden de higroscopicidad presentado por los sólidos es: $FA_{MF} = FAC_{MF} > FT > FA^2_{MF} > FUR > FAM_{MF} > FAC_{MAS} > FAM_{MAS} > FTM > FA_{MAS} > FTC > FA^2_{MAS}$. A partir de estos resultados se puede decir que los sólidos FT, FA_{MF} , FAC_{MF} y FA^2_{MF} son considerados más higroscópicos que FUR, mientras que los sistemas binarios FA_{MAS} y FA^2_{MAS} y los sistemas ternarios FTC, FTM y FAM_{MAS} mejoran ésta propiedad fisicoquímica del IFA presentando una higroscopicidad leve. Por otro lado, a pesar de que FAM_{MF} y FAC_{MAS} son menos higroscópicos que el fármaco son considerados sólidos de higroscopicidad moderada.

ESTUDIO DE ESTABILIDAD QUÍMICA

PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE FUR Y DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE REACCIÓN

Una vez seleccionado y validado el procedimiento analítico indicativo de estabilidad, se realizaron estudios de estabilidad acelerados de FUR libre, de las MF y de los sistemas supramoleculares sólidos durante 6 meses, para lo cual las muestras se almacenaron en un gabinete de estabilidad, expuestas a la luz, a 40 °C y 75% de HR.

El estudio del efecto producido por diferentes ligandos sobre la reacción de degradación de FUR en las muestras sólidas evidencia, en todos los casos, gráficos de ajuste de datos de tipo lineal^{xix} indicando que la degradación del IFA se ajusta a un modelo cinético de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de FUR ya que se considera que la

^{xix} Al representar el logaritmo natural del porcentaje remanente de FUR en función del tiempo.

concentración de ligando es constante (Figuras 5.2, 5.3 y 5.4). A partir de estos gráficos se calculó el valor de la constante de velocidad de degradación, el t_{50} y el t_{90} (Tabla 5.6).

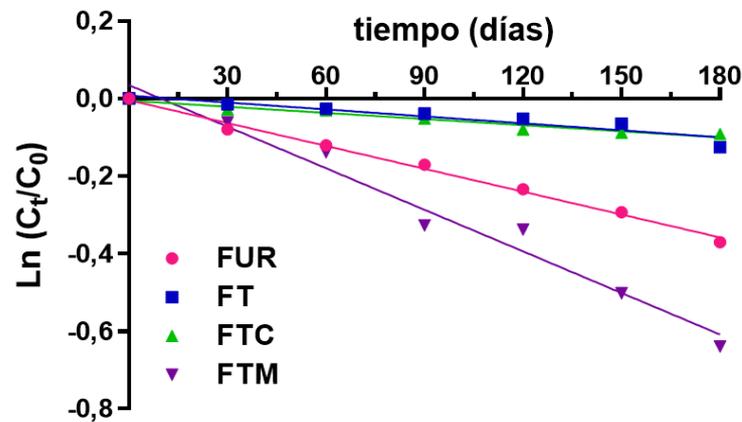


Figura 5.2. Gráfico de pseudo-primer orden obtenido para la degradación del IFA libre y en los sistemas FT, FTC y FTM.

Los estudios realizados en la presente tesis doctoral evidencian que la degradación de FUR en estado sólido se ve disminuida cuando el fármaco se encuentra formando una sal con TEA (Figura 5.2), demostrado por la disminución en el valor de la constante de velocidad de degradación observada (k_{Obs}) con respecto a k_0 (velocidad de degradación de FUR libre). El factor de estabilización (k_0/k_{Obs}) para FT es de 3,3, confirmando que en este sistema el fármaco es más estable a la degradación que en forma libre (Tabla 5.6). Por otro lado, fue reportado previamente el estudio de la fotoestabilidad química de FUR en combinación con β -CD y MD observándose que el sistema binario con β -CD mejora 3,2 veces la estabilidad y el sistema con MD 2,6 veces.⁹⁵

Adicionalmente, a partir de la Figura 5.2 se puede apreciar que, al combinar la alcanolamina con β -CD, se obtiene un efecto estabilizador sobre la degradación de FUR con un factor de estabilización de 3,8 para el sistema ternario FTC (superior a los obtenidos con ambos sistemas binarios) y un t_{90} de 198 días (Tabla 5.6). Sin embargo, en el sistema FTM la degradación de FUR se ve incrementada mostrando una k_{Obs} superior a k_0 y evidenciando que la combinación de TEA y MD potencian la degradación del IFA.

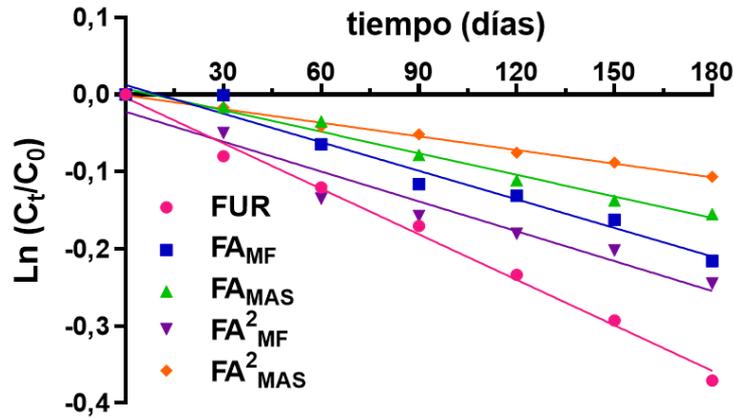


Figura 5.3. Gráfico de pseudo-primer orden obtenido para la degradación del IFA libre y en los sistemas FA_{MF} , FA_{MAS} , FA^2_{MF} y FA^2_{MAS} .

Por otra parte, los estudios mostraron que los sistemas conteniendo ARG (FA_{MF} , FA_{MAS} , FA^2_{MF} y FA^2_{MAS}) protegen al fármaco de la degradación (Figura 5.3). En particular, se determinó que el aumento de estabilidad más pronunciado se logra con el sistema FA^2_{MAS} . Este comportamiento se puede confirmar con los datos de k_{obs} , t_{50} , t_{90} y los factores de estabilización calculados para los diferentes sólidos (Tabla 5.6), donde se puede apreciar que FUR es 2,1 veces más estable en FA_{MAS} y 3,4 veces en FA^2_{MAS} que en forma libre. Mientras que la formación de sistemas ternarios entre FUR, ARG y los oligosacáridos no aporta mejoras sobre la estabilidad química del IFA o de los sistemas binarios (Figura 5.4).

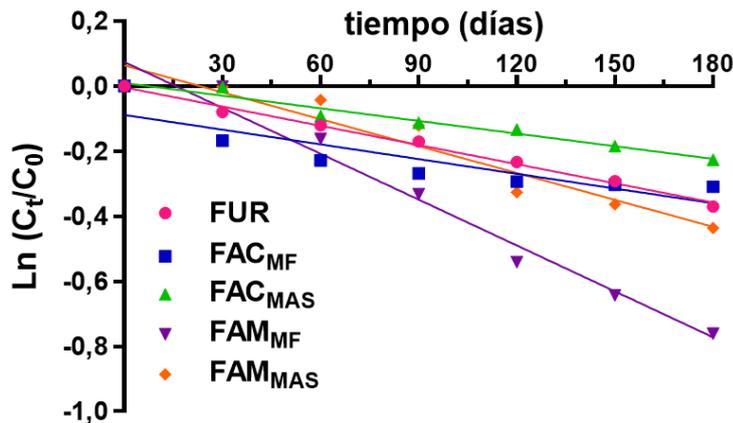


Figura 5.4. Gráfico de pseudo-primer orden obtenido para la degradación del IFA libre y en los sistemas FAC_{MF} , FAC_{MAS} , FAM_{MF} y FAM_{MAS} .

El porcentaje de recuperación de FUR que se observa en FAC_{MF} y FAC_{MAS} es levemente superior al del IFA puro, pero el efecto estabilizador de FAC_{MF} y FAC_{MAS} es inferior al de los sistemas binarios FUR:ARG y FUR: β -CD (Tabla 5.6). En tanto que para los sólidos conteniendo MD (FAM_{MF} y FAM_{MAS}), los porcentajes de recuperación de FUR son menores a los del fármaco libre y de los sistemas binarios, evidenciando que la combinación de MD con ARG potencia la degradación de FUR convirtiéndola en menos estable en estos sólidos (Tabla 5.6).

Transcurridos 6 meses de almacenamiento de los sólidos en un gabinete de estabilidad expuestos a la luz, a 40 °C y 75% de HR, se evidencia la siguiente relación de estabilidad de las muestras: $FTC > FA^2_{MAS} > FT > FA_{MAS} > FA_{MF} > FAC_{MAS} > FA^2_{MF} > FAC_{MF} > \mathbf{FUR} > FAM_{MAS} > FTM > FAM_{MF}$, lo que demuestra que la combinación de MD con los ligandos básicos produce una reducción de la estabilidad química del IFA, mientras que los mejores resultados se obtienen con los sistemas supramoleculares FTC, FA^2_{MAS} , FT y FA_{MAS} .

Tabla 5.6. Porcentaje recuperado de FUR en las muestras luego de 6 meses de almacenamiento. Valores de k_0 (constante de velocidad de degradación de FUR), k_{Obs} (constante de velocidad de la reacción de degradación de FUR en las muestras), t_{90} (tiempo de vida útil), t_{50} (tiempo de vida media) y k_0/k_{Obs} (factor de estabilización).

Muestra	% FUR	k_0 (día ⁻¹)	k_{Obs} (día ⁻¹)	t_{90} (día)	t_{50} (día)	k_0/k_{Obs}
FUR	69 ± 1	(2,0 ± 0,1) 10 ⁻³	-	53	352	-
FT	88 ± 4	-	(0,6 ± 0,1) 10 ⁻³	175	1155	3,3
FTC	91 ± 1	-	(0,53 ± 0,05) 10 ⁻³	198	1307	3,8
FTM	53 ± 3	-	(3,6 ± 0,3) 10 ⁻³	29	192	0,55
FA_{MF}	81 ± 2	-	(1,2 ± 0,1) 10 ⁻³	87	577	1,7
FA_{MAS}	84,7 ± 0,8	-	(0,93 ± 0,03) 10 ⁻³	112	745	2,1
FA^2_{MF}	74,3 ± 0,8	-	(1,3 ± 0,1) 10 ⁻³	81	533	1,5
FA^2_{MAS}	89,9 ± 0,3	-	(0,59 ± 0,02) 10 ⁻³	177	1174	3,4
FAC_{MF}	73 ± 2	-	(1,5 ± 0,3) 10 ⁻³	70	462	1,3
FAC_{MAS}	79,7 ± 0,3	-	(1,3 ± 0,1) 10 ⁻³	81	533	1,5
FAM_{MF}	46,7 ± 0,4	-	(4,7 ± 0,3) 10 ⁻³	22	147	0,4
FAM_{MAS}	64 ± 1	-	(2,7 ± 0,3) 10 ⁻³	39	257	0,7

ESTUDIO DE ESTABILIDAD FÍSICA

La estabilidad física de los IFAs puede verse afectada por la luz, la temperatura y la humedad, ya que estos factores pueden promover la reorganización de las moléculas en el cristal durante el almacenamiento. Teniendo esto en cuenta, las muestras almacenadas en el gabinete de estabilidad fueron analizadas por RMNs y DRXP para evaluar su estabilidad física y las posibles recristalizaciones o transformaciones polimórficas.

La Figura 5.5 muestra los espectros ^{13}C CP-MAS y la Figura 5.6 los patrones DRXP de FUR y de las muestras sólidas al t_0 (cuando fueron preparadas) y a diferentes tiempos de almacenamiento (1, 3 y 6 meses).

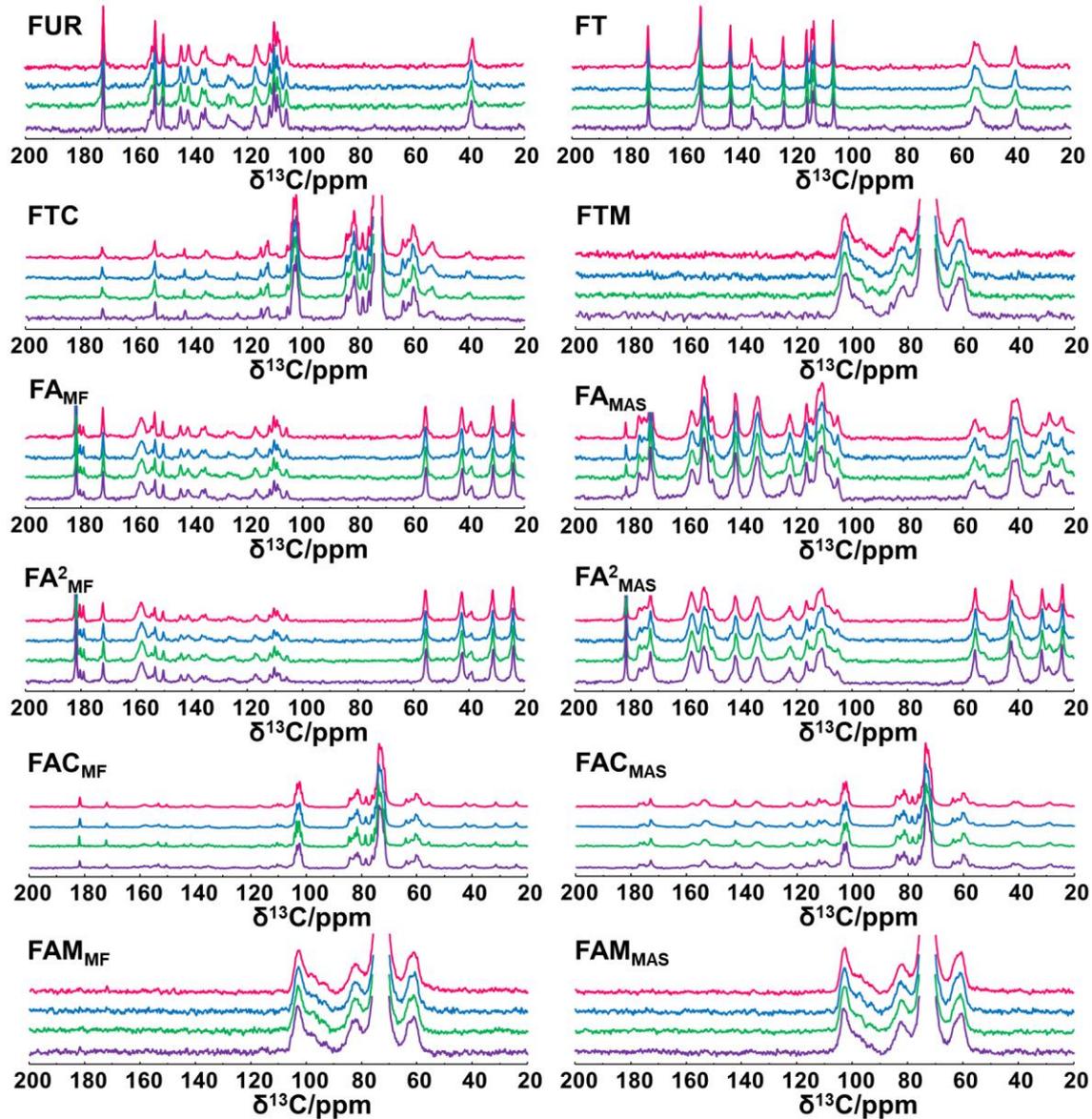


Figura 5.5. Espectros ^{13}C CP-MAS de los sólidos almacenados en el gabinete de estabilidad, a 40 °C, 75% de HR y expuestos a la luz, a t_0 (fucsia), t_1 (azul), t_3 (verde) y t_6 (violeta).

En la Figura 5.5 se evidencia que en los espectros de ^{13}C CP-MAS de las muestras sólidas evaluadas no existen modificaciones a los diferentes tiempos con respecto a t_0 .

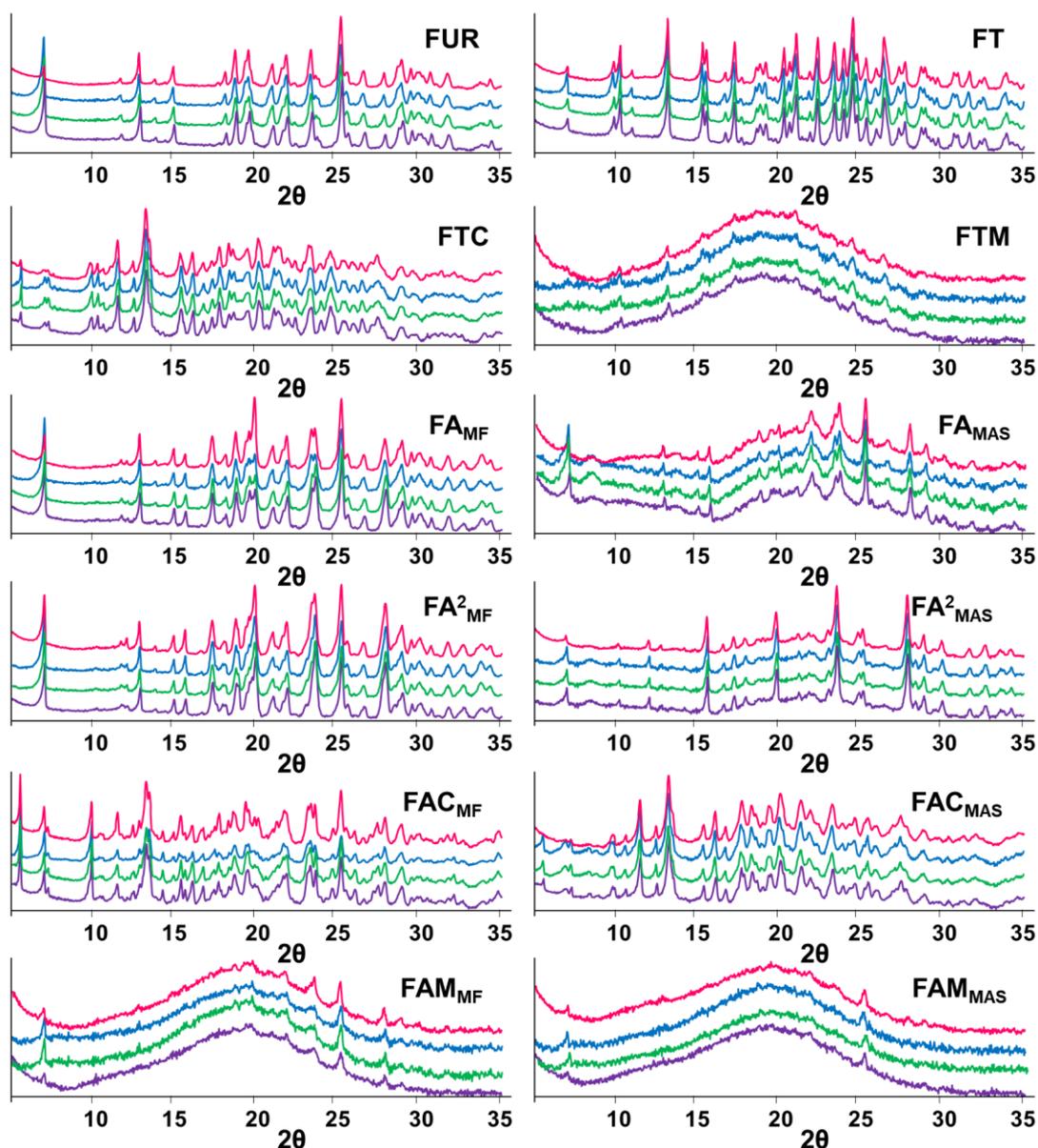


Figura 5.6. Patrones DRXP de los sólidos almacenados en el gabinete de estabilidad, a 40 °C, 75% de HR y expuestos a la luz, a t_0 (fucsia), t_1 (azul), t_3 (verde) y t_6 (violeta).

Por otra parte, los patrones de DRXP (Figura 5.6) registrados en el lapso de 6 meses de almacenamiento no difieren con respecto a t_0 , evidenciando ausencia de transformaciones de fase tanto para FUR como para las muestras de los distintos sistemas sólidos desarrollados.

Anteriormente, se sugirió que los oligosacáridos podrían ser utilizados para estabilizar a la sal parcialmente amorfa formada entre FUR y ARG dado que ésta podría cristalizar a un sólido cristalino con el correr del tiempo. Sin embargo, a partir de estos resultados, se puede concluir que las sales FUR:ARG, tanto de estequiometría 1:1 como 1:2, son físicamente estables y mantienen su estructura a las condiciones estudiadas.

Teniendo en cuenta que en el lapso de 6 meses de almacenamiento no se produjo transformación polimórfica en ningún sólido estudiado, ni recristalización de los sólidos amorfos, se sugiere que todas las muestras analizadas mantienen sus características y se puede concluir que son físicamente estables a las condiciones evaluadas y en el período de tiempo estudiado.

CONCLUSIONES PARCIALES

Los estudios de estabilidad demostraron que FUR difiere significativamente en sus propiedades químicas y físicas cuando se encuentra libre o formando sistemas supramoleculares con otros componentes.

Los resultados obtenidos en los estudios de higroscopicidad evidencian que FUR es un sólido moderadamente higroscópico y que mediante la interacción con otros componentes en estado sólido se produce una mejora en esta propiedad. Las combinaciones más favorables comprenden a los sistemas FAM_{MAS} , FTM, FA_{MAS} , FTC y FA^2_{MAS} que resultan en sólidos de **higroscopicidad leve**. Los estudios de estabilidad química confirman que los sistemas binarios FT, FA_{MAS} y FA^2_{MAS} y el sistema ternario FTC **reducen significativamente el proceso químico de fotodegradación** de FUR. Por otro lado, el sistema ternario FAC_{MAS} y las MF (FA_{MF} , FA^2_{MF} y FAC_{MF}) mejoran levemente la estabilidad química del IFA. Las muestras conteniendo MD muestran tasas de degradación más altas en comparación con FUR libre. Estos resultados evidencian que la higroscopicidad no se encuentra directamente relacionada con la degradación química de FUR, ya que tres de los sólidos que mostraron ser levemente higroscópicos (FTC, FA_{MAS} y FA^2_{MAS}) redujeron notablemente el proceso de degradación, sin embargo, los otros dos sólidos de baja higroscopicidad (FAM_{MAS} , FTM) potenciaron la degradación del fármaco. A partir del análisis de los espectros de RMNss y de los difractogramas de las muestras se confirma que FUR y los sólidos estudiados son **físicamente estables** en condiciones de almacenamiento acelerado dado que no evidencian cambios en su forma sólida.

En conclusión, tomando en cuenta la higroscopicidad y las características físicas y químicas, los sistemas FTC, FA^2_{MAS} y FA_{MAS} son los mejores candidatos en cuanto a optimización de la estabilidad de FUR en estado sólido.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El presente trabajo de tesis doctoral tuvo como objetivo principal el desarrollo de nuevos sistemas farmacéuticos que permitieran optimizar propiedades biofarmacéuticas desfavorables (solubilidad, disolución, permeabilidad y estabilidad) de IFAs de reconocida relevancia terapéutica como sulfametoxazol y furosemida para así mejorar su biodisponibilidad oral.

En el caso de **SMZ**, un antibiótico que presenta baja solubilidad y alta permeabilidad, pudo comprobarse que los sistemas binarios formados en solución del IFA con aminoácidos (HIS y ARG) incrementan su solubilidad tanto en agua como en PBS a partir de la formación de sales solubles de estequiometría 1:1 entre los componentes. Mediante diversas técnicas de caracterización se verificó que el fármaco es capaz de formar sales farmacéuticas con ambos AA en estado sólido las cuales pueden ser preparadas por métodos sencillos, económicos y de fácil escalado a nivel industrial, como lo son la molienda asistida por solvente y la liofilización. Se demostró que la **sal cristalina** formada entre SMZ e HIS y la **sal amorfa** formada entre SMZ y ARG incrementan tanto la velocidad de disolución como el porcentaje de fármaco disuelto en fluido gástrico simulado, resultando en nuevos sistemas supramoleculares promisorios para optimizar la biodisponibilidad oral de SMZ. Al realizar la comparación entre las dos sales farmacéuticas estudiadas, se pudo concluir que la sal SMZ:ARG resulta el mejor sistema desarrollado dado que, además de optimizar la velocidad y la cantidad de fármaco disuelta en fluido gástrico simulado, incrementa la solubilidad de SMZ 2,7 veces más que la sal SMZ:HIS en agua y 2,3 veces más en PBS. Este sistema supramolecular constituye una interesante estrategia para continuar con estudios a nivel microbiológico, pensando en realizar la transferencia a nivel industrial.

En el estudio de **FUR**, un diurético de baja solubilidad y baja permeabilidad, se logró incrementar la solubilidad del IFA, tanto en su forma ionizada (utilizando TEA y ARG) como en su forma neutra (al combinarlo con oligosacáridos). Además, el estudio del efecto de sistemas ternarios (combinando TEA o ARG con β -CD o MD) en la solubilidad de FUR demostró que estos poseen la capacidad de solubilizar al fármaco cuando éste se encuentra en su forma ionizada y neutra. A partir de esto, se diseñaron y desarrollaron sistemas en estado sólido utilizando una técnica de preparación de alto rendimiento y fácil reproducibilidad, como la molienda asistida por solvente y se realizó la caracterización de los sistemas obtenidos empleando diferentes técnicas. Como resultado se comprobó la formación de

nuevos sistemas supramoleculares: **complejos de inclusión binarios** de FUR con β -CD y con MD y **sales farmacéuticas** con TEA y con ARG. El sistema FUR: β -CD demostró ser cristalino y presentar interacciones entre el grupo sulfonamida de FUR y la CD. El sistema FUR:MD resultó ser un sólido amorfo, en el cual interactúan el grupo sulfonamida y el anillo aromático del IFA para formar el complejo. El sistema FUR:TEA evidenció interacciones iónicas formando una sal cristalina y los sistemas FUR:ARG (que se obtuvieron en relación equimolar 1:1 y 1:2) demostraron ser sales amorfas, donde las interacciones entre los componentes son del tipo iónicas. Se prepararon los **sistemas ternarios** combinando un ligando básico y un oligosacárido, obteniéndose los sistemas FUR:TEA: β -CD, FUR:TEA:MD, FUR:ARG: β -CD y FUR:ARG:MD, donde las interacciones entre FUR y los demás componentes resultaron similares a las interacciones en los sistemas binarios. Todos los sistemas desarrollados lograron incrementar la disolución del IFA en fluido gástrico simulado, dado que en todos los casos la velocidad de disolución y el porcentaje de fármaco disuelto son superiores a los de FUR libre. La sal binaria entre FUR y ARG (de estequiometría 1:2) es el sistema que evidenció los mejores resultados en cuanto a optimización del perfil de disolución de FUR, ya que incrementó el porcentaje del IFA disuelto 5,7 veces. Se demostró asimismo, que estos sistemas supramoleculares no modificaron la velocidad de permeación del fármaco ni la cantidad permeada. Los sistemas supramoleculares lograron mantener la estabilidad física del IFA y mejorar tanto la estabilidad química como la higroscopicidad de FUR, siendo las mejores combinaciones el sistema FUR:TEA: β -CD y la sal binaria entre FUR y ARG (de estequiometría 1:2), ya que resultaron ser sólidos de higroscopicidad leve y, además, redujeron significativamente el proceso químico de fotodegradación de FUR.

Estos resultados indican claramente que la formación de sistemas supramoleculares es una herramienta útil para mejorar la solubilidad, disolución y estabilidad de FUR, representando un gran avance hacia la optimización de su biodisponibilidad oral. Al comparar los resultados evidenciados por los diferentes sistemas supramoleculares binarios y ternarios estudiados, se puede concluir que la sal FUR:ARG (1:2) constituye el mejor sistema desarrollado, ya que es uno de los sistemas que evidencia los mejores resultados en cuanto a solubilidad en agua y PBS, reducción del proceso químico de fotodegradación de FUR y mejora en la higroscopicidad. Además, mantiene constante tanto la permeabilidad como la estabilidad física del fármaco puro y, principalmente, presenta el mejor perfil de disolución con una velocidad y un porcentaje de fármaco disuelto notablemente superior a los demás sistemas desarrollados y al IFA en su forma libre.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios realizados en la presente tesis doctoral, es posible concluir que los objetivos propuestos al inicio de este proyecto fueron concretados. Se obtuvo una amplia gama de sistemas supramoleculares nuevos entre los

fármacos seleccionados y los diferentes ligandos, tanto en solución como en estado sólido, capaces de incrementar la solubilidad, la disolución y la estabilidad de los IFAs, resultando promisorios para mejorar su desempeño terapéutico. Las metodologías propuestas para la obtención de estos nuevos sistemas podrían ser de interés desde el punto de vista industrial, debido al impacto económico que puede generar su fácil preparación y su bajo costo de producción.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Farmacopea argentina. Séptima Edición. **Volumen II**, (2017).
2. Adeoye, O. & Cabral-Marques, H. Cyclodextrin nanosystems in oral drug delivery: A mini review. *Int. J. Pharm.* **531**, 521–531 (2017).
3. Zhang, Y. *et al.* Carboxymethyl chitosan/phospholipid bilayer-capped mesoporous carbon nanoparticles with pH-responsive and prolonged release properties for oral delivery of the antitumor drug, Docetaxel. *Int. J. Pharm.* **532**, 384–392 (2017).
4. Halebian, J. & McCrone, W. Pharmaceutical applications of polymorphism. *J. Pharm. Sci.* **58**, 911–929 (1969).
5. Talaczynska, A., Dzitko, J. & Cielecka-Piontek, J. Benefits and limitations of polymorphic and amorphous forms of active pharmaceutical ingredients. *Curr. Pharm. Des.* **22**, 4975–4980 (2016).
6. Steed, J. W. The role of co-crystals in pharmaceutical design. *Trends Pharmacol. Sci.* **34**, 185–193 (2013).
7. Sekhon, B. Pharmaceutical co-crystals-a review. *ARS Pharm.* **50**, 99–117 (2009).
8. Vishweshwar, P., McMahon, J. A., Bis, J. A. & Zaworotko, M. J. Pharmaceutical Co-Crystals. *Int. J. Drug Dev. Res.* **95**, 499–516 (2006).
9. Choonara, B. F. *et al.* A review of advanced oral drug delivery technologies facilitating the protection and absorption of protein and peptide molecules. *Biotechnol. Adv.* **32**, 1269–1282 (2014).
10. Sosnik, A. Alginate Particles as Platform for Drug Delivery by the Oral Route : State-of-the-Art. **2014**, (2014).
11. Sharma, D. & Joshi, S. Solubility enhancement strategies for poorly water soluble drugs in solid dispersion: a review. *Asian J. Pharm.* **1**, (2007).
12. Basanta Kumar Reddy, B. & Karunakar, A. Biopharmaceutics classification system: A regulatory approach. *Dissolution Technol.* **18**, 31–37 (2011).
13. Chavda, H. V, Patel, C. N. & Anand, I. S. Biopharmaceutics Classification System. *Syst. Rev. Pharm.* **1**, 62–69 (2010).
14. Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P. & Crison, J. R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product

Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists* **12**, 413–420 (1995).

15. Siya D. Sinai Kunde, S. B. Biopharmaceutical Classification System : A Brief Account. *Int. J. Res. Methodol.* **1**, 20–46 (2015).
16. Greenwood, D. *Sulfonamides. Antibiotic and Chemotherapy* (Elsevier Ltd., 2010). doi:10.1016/B978-0-7020-4064-1.00029-4
17. Dorn, J. M. & Volcheck, G. W. *Sulfonamide Drug Allergy. Drug Allergy Testing* (Elsevier Inc., 2018). doi:10.1016/B978-0-323-48551-7.00014-6
18. Raz, R. *et al.* Empiric use of trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) in the treatment of women with uncomplicated urinary tract infections, in a geographical area with a high prevalence of TMP-SMX resistant uropathogens. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 1165–1169 (2002).
19. DrugBank database. Sulfamethoxazole, DB01015. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01015>. (Accessed: 8th April 2018)
20. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5329. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5329>. (Accessed: 8th April 2018)
21. Yong, D. U., Yi, X. I. A., Wenjian, T. & Zhi, H. Characterization of Polymorphism in Sulfamethoxazole Pharmaceutical Molecule Using Terahertz Time-domain Spectroscopy. 4–5 (2012).
22. Chemical Book. Sulfamethoxazole | 723-46-6. Available at: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6473303.htm. (Accessed: 7th May 2018)
23. De Zordi, N. *et al.* Applications of supercritical fluids to enhance the dissolution behaviors of Furosemide by generation of microparticles and solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **81**, 131–141 (2012).
24. Harriss, B. I., Vella-Zarb, L., Wilson, C. & Evans, I. R. Furosemide cocrystals: Structures, hydrogen bonding, and implications for properties. *Cryst. Growth Des.* **14**, 783–791 (2014).
25. DrugBank database. Furosemide, DB00695. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00695>. (Accessed: 8th April 2018)
26. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=3440. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3440>. (Accessed:

8th April 2018)

27. Bundgaard, H., Nørgaard, T. & Nielsen, N. M. Photodegradation and hydrolysis of furosemide and furosemide esters in aqueous solutions. *Int. J. Pharm.* **42**, 217–224 (1988).
28. Chen, L. J. & Burka, L. T. Chemical and enzymatic oxidation of furosemide: Formation of pyridinium salts. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 1741–1744 (2007).
29. Kurmi, M., Kumar, S., Singh, B. & Singh, S. Implementation of design of experiments for optimization of forced degradation conditions and development of a stability-indicating method for furosemide. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **96**, 135–143 (2014).
30. Vargas, F. *et al.* Photodegradation and phototoxicity studies of furosemide. Involvement of singlet oxygen in the photoinduced hemolysis and lipid peroxidation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **42**, 219–225 (1998).
31. Jambhekar, S. S. & Breen, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: Structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. *Drug Discov. Today* **21**, 356–362 (2016).
32. Nechipadappu, S. K. & R. Trivedi, D. Pharmaceutical salts of ethionamide with GRAS counter ion donors to enhance the solubility. *Eur. J. Pharm. Sci.* **96**, 578–589 (2017).
33. Kuminek, G; Rodriguez-Hornedo, N.; Siedler, S.; Rocha H. V. A, Cuffini, S. L. ; Cardoso, S. G. How cocrystals of weakly basic drugs and acidic cofomers might modulate solubility and stability. *Chem. Commun.* **52**, 5832–5835 (2016).
34. Löbmann, K., Grohgan, H., Laitinen, R., Strachan, C. & Rades, T. Amino acids as co-amorphous stabilizers for poorly water soluble drugs - Part 1: Preparation, stability and dissolution enhancement. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **85**, 873–881 (2013).
35. Xu, W., Ling, P. & Zhang, T. Polymeric micelles, a promising drug delivery system to enhance bioavailability of poorly water-soluble drugs. *J. Drug Deliv.* **2013**, (2013).
36. Caban, S., Aytakin, E., Sahin, A. & Capan, Y. Nanosystems for drug delivery. *OA Drug Des. Deliv.* **2**, 1–7 (2014).
37. Campardelli, R., Oleandro, E., Scognamiglio, M., Della Porta, G. & Reverchon, E. Palmitoylethanolamide sub-micronization using fast precipitation followed by supercritical fluids extraction. *Powder Technol.* **305**, 217–225 (2017).
38. Censi, R. & Di Martino, P. Polymorph impact on the bioavailability and stability of poorly soluble drugs. *Molecules* **20**, 18759–18776 (2015).

39. Cragg, P. J. *A Practical Guide to Supramolecular Chemistry*. (John Wiley & Sons, 2005).
40. Ariga, K. & Kunitake, T. *Supramolecular Chemistry: Fundamentals and Applications*. (Springer, 2006).
41. Steed, J. W., Turner, D. R. & Wallace, K. J. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*. (John Wiley & Sons, 2007).
42. Albrecht, M. Supramolecular chemistry - General principles and selected examples from anion recognition and metallocsupramolecular chemistry. *Naturwissenschaften* **94**, 951–966 (2007).
43. de Silva, A. P., Moody, T. S. & Wright, G. D. Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors as potent analytical tools. *Analyst* **134**, 2385 (2009).
44. Laishram, R., Bhowmik, S. & Maitra, U. White light emitting soft materials from off-the-shelf ingredients. *J. Mater. Chem. C* **3**, 5885–5889 (2015).
45. de Bettencourt-Dias, A. Two-Photon Excitation for Bone Imaging: A New Application for Lanthanide Luminescence. *Chem* **1**, 342–343 (2016).
46. Bünzli, J. C. G. Lanthanide luminescence for biomedical analyses and imaging. *Chem. Rev.* **110**, 2729–2755 (2010).
47. Savyasachi, A. J. *et al.* Supramolecular Chemistry: A Toolkit for Soft Functional Materials and Organic Particles. *Chem* **3**, 764–811 (2017).
48. Song, L. X., Bai, L., Xu, X. M., He, J. & Pan, S. Z. Inclusion complexation, encapsulation interaction and inclusion number in cyclodextrin chemistry. *Coord. Chem. Rev.* **253**, 1276–1284 (2009).
49. Jansook, P., Ogawa, N. & Loftsson, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* (2017). doi:10.1016/j.ijpharm.2017.11.018
50. Saal, C. & Becker, A. Pharmaceutical salts: A summary on doses of salt formers from the Orange Book. *Eur. J. Pharm. Sci.* **49**, 614–623 (2013).
51. Chavan, R. B., Thipparaboina, R., Kumar, D. & Shastri, N. R. Co amorphous systems: A product development perspective. *Int. J. Pharm.* **515**, 403–415 (2016).
52. Dengale, S. J., Grohgan, H., Rades, T. & Löbmann, K. Recent advances in co-amorphous drug formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **100**, 116–125 (2016).
53. Pindelska, E., Sokal, A. & Kolodziejcki, W. Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **117**, 111–

- 146 (2017).
54. Del Valle, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochem.* **39**, 1033–1046 (2004).
 55. Kurkov, S. V. & Loftsson, T. Cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **453**, 167–180 (2013).
 56. Crini, G. Review: A history of cyclodextrins. *Chem. Rev.* **114**, 10940–10975 (2014).
 57. Challa, R., Ahuja, A., Ali, J. & Khar, R. K. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *AAPS PharmSciTech* **6**, E329–E357 (2005).
 58. Park, G. B., Brown, D. M. & Schuh, M. D. Binary and ternary complexes containing alpha-cyclodextrin and bromonaphthalene derivatives: A note of caution in interpreting UV absorption spectral data. *J. Phys. Chem. B* **110**, 22510–22516 (2006).
 59. Dhekale, P., Kulkarni, A. & Sanodiya, M. *A c a d e m i c S c i e n c e s*. **5**, 7–11 (2013).
 60. Piletti, R. *et al.* Microencapsulation of eugenol molecules by β -cyclodextrine as a thermal protection method of antibacterial action. *Mater. Sci. Eng. C* **75**, 259–271 (2017).
 61. Brewster, M. E. & Loftsson, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 645–666 (2007).
 62. Parikh, A., Agarwal, S. & Raut, K. a Review on Applications of Maltodextrin in Pharmaceutical Industry. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* **4**, 67–74 (2014).
 63. Kumar, B. P., Rao, S., Murthy, K. V. R. & Sahu, R. K. Formulation, in vitro- evaluation and solid state characterization of solid dispersion of Efavirenz. *J. Chem. Pharm. Sci.* **5**, 35–41 (2012).
 64. Gurrapu, A., Jukanti, R., Bobbala, S. R., Kanuganti, S. & Jeevana, J. B. Improved oral delivery of valsartan from maltodextrin based proniosome powders. *Adv. Powder Technol.* **23**, 583–590 (2012).
 65. Michael K. Reddy. Amino acid | Definition, Structure & Facts | Britannica.com. Available at: <https://www.britannica.com/science/amino-acid#ref277271>. (Accessed: 8th April 2018)
 66. Tilborg, A., Norberg, B. & Wouters, J. Pharmaceutical salts and cocrystals involving amino acids: A brief structural overview of the state-of-art. *Eur. J. Med. Chem.* **74**, 411–426 (2014).
 67. Laitinen, R., Löbmann, K., Grohganz, H., Strachan, C. & Rades, T. Amino acids as Co-amorphous excipients for simvastatin and glibenclamide: Physical properties and

- stability. *Mol. Pharm.* **11**, 2381–2389 (2014).
68. Mesallati, H., Conroy, D., Hudson, S. & Tajber, L. Preparation and characterization of amorphous ciprofloxacin-amino acid salts. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **121**, 73–89 (2017).
 69. Cirri, M., Maestrelli, F., Mennini, N. & Mura, P. Combined use of bile acids and aminoacids to improve permeation properties of acyclovir. *Int. J. Pharm.* **490**, 351–359 (2015).
 70. Kamei, N., Khafagy, E.-S., Hirose, J. & Takeda-Morishita, M. Potential of Single Cationic Amino Acid Molecule “Arginine” for Stimulating Oral Absorption of Insulin. *Int. J. Pharm.* **521**, 176–183 (2017).
 71. Mura, P., Maestrelli, F. & Cirri, M. Ternary systems of naproxen with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and aminoacids. *Int. J. Pharm.* **260**, 293–302 (2003).
 72. Aiassa, V., Zoppi, A., Albesa, I. & Longhi, M. R. Inclusion complexes of chloramphenicol with β -cyclodextrin and aminoacids as a way to increase drug solubility and modulate ROS production. *Carbohydr. Polym.* **121**, 320–327 (2015).
 73. Cosmetic Ingredient Review. Final Amended Report On the Safety Assessment of Ethanolamine and Ethanolamine Salts as Used in Cosmetics. **25**, 1–9 (2012).
 74. Brain, K. R. *et al.* Percutaneous penetration of diethanolamine through human skin in vitro: Application from cosmetic vehicles. *Food Chem. Toxicol.* **43**, 681–690 (2005).
 75. Aalto-Korte, K., Pesonen, M., Kuuliala, O. & Suuronen, K. Occupational allergic contact dermatitis caused by coconut fatty acids diethanolamide. *Contact Dermatitis* **70**, 169–174 (2014).
 76. Ki, H.-M. & Choi, H.-K. The effect of meloxicam/ethanolamine salt formation on percutaneous absorption of meloxicam. *Arch. Pharm. Res.* **30**, 215–221 (2007).
 77. Han, H. K. & Choi, H. K. Improved absorption of meloxicam via salt formation with ethanolamines. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **65**, 99–103 (2007).
 78. Maitre, M. M., Longhi, M. R. & Granero, G. G. Ternary complexes of flurbiprofen with HP- β -CD and ethanolamines characterization and transdermal delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **33**, 311–326 (2007).
 79. Mora, M. J., Longhi, M. R. & Granero, G. E. Synthesis and characterization of binary and ternary complexes of diclofenac with a methyl- β -CD and monoethanolamine and in vitro transdermal evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 4079–4088 (2010).
 80. Granero, G., Garnero, C. & Longhi, M. The effect of pH and triethanolamine on

- sulfisoxazole complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **20**, 285–293 (2003).
81. Barbosa, J. A. A. *et al.* Triethanolamine stabilization of methotrexate- β -cyclodextrin interactions in ternary complexes. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 17077–17099 (2014).
 82. Granero, G., Maitre, M., Garnero, C. & Longhi, M. Synthesis, characterization and in vitro release studies of a new acetazolamide-HP- β -CD-TEA inclusion complex. *Eur. J. Med. Chem.* **43**, 464–470 (2008).
 83. Palma, S. *et al.* An efficient ternary complex of acetazolamide with HP- β -CD and TEA for topical ocular administration. *J. Control. Release* **138**, 24–31 (2009).
 84. Mora, M. J. *et al.* Characterization, dissolution and in vivo evaluation of solid acetazolamide complexes. *Carbohydr. Polym.* **98**, 380–390 (2013).
 85. Kalepu, S. & Nekkanti, V. Insoluble drug delivery strategies: Review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 442–453 (2015).
 86. Imchalee, R. & Charoenchaitrakool, M. Gas anti-solvent processing of a new sulfamethoxazole-l-malic acid cocrystal. *J. Ind. Eng. Chem.* **25**, 12–15 (2015).
 87. Garnero, C., Aiassa, V. & Longhi, M. Sulfamethoxazole:hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex: preparation and characterization. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **63**, 74–79 (2012).
 88. Mørk, N., Bundgaard, H., Shalmi, M. & Christensen, S. Furosemide prodrugs: synthesis, enzymatic hydrolysis and solubility of various furosemide esters. *Int. J. Pharm.* **60**, 163–169 (1990).
 89. Devarakonda, B., Otto, D. P., Judefeind, A., Hill, R. A. & de Villiers, M. M. Effect of pH on the solubility and release of furosemide from polyamidoamine (PAMAM) dendrimer complexes. *Int. J. Pharm.* **345**, 142–153 (2007).
 90. De Zordi, N. *et al.* Applications of supercritical fluids to enhance the dissolution behaviors of Furosemide by generation of microparticles and solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **81**, 131–141 (2012).
 91. Goud, N. R. *et al.* Novel Furosemide Cocrystals and Selection of High Solubility Drug Forms. *J. Pharm. Sci.* **101**, 664–680 (2012).
 92. Radwan, S. E. S., Sokar, M. S., Abdelmonsif, D. A. & El-Kamel, A. H. Mucopenetrating nanoparticles for enhancement of oral bioavailability of furosemide: In vitro and in vivo evaluation/sub-acute toxicity study. *Int. J. Pharm.* **526**, 366–379 (2017).
 93. Garnero, C., Chattah, A. K. & Longhi, M. Supramolecular complexes of maltodextrin

and furosemide polymorphs: A new approach for delivery systems. *Carbohydr. Polym.* **94**, 292–300 (2013).

94. Garnero, C., Chattah, A. K. & Longhi, M. Improving furosemide polymorphs properties through supramolecular complexes of β -cyclodextrin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **95**, 139–145 (2014).
95. Garnero, C., Chattah, A. K. & Longhi, M. Stability of furosemide polymorphs and the effects of complex formation with β -cyclodextrin and maltodextrin. *Carbohydr. Polym.* **152**, 598–604 (2016).
96. Vemula, V. R., Lagishetty, V. & Lingala, S. Solubility enhancement techniques. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **5**, 41–51 (2010).
97. Higuchi, T. & Connors, K. A. Phase-Solubility Techniques in Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation. *Interscience: New York* Vol. 4, pp 117-212. (1965).
98. Loftsson, T. Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs in aqueous solutions. *Drug Stab.* **1**, 22–33 (1995).
99. Connors, K. A. & Mollica, J. A. Theoretical analysis of comparative studies of complex formation: Solubility, spectral, and kinetic techniques. *J. Pharm. Sci.* **55**, 772–780 (1966).
100. Connors, K. *Binding Constants. The measurement of molecular complex stability.* (1987).
101. Loftsson, T., Hreinsdóttir, D. & Másson, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int. J. Pharm.* **302**, 18–28 (2005).
102. Fromming, K. & Szejtli, J. *Cyclodextrins in Pharmacy.* (1994).
103. Constable, P. D. Acid-Base Assessment: When and how to apply the henderson-hasselbalch equation and strong ion difference theory. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* **30**, 295–316 (2014).
104. United States Pharmacopeia XXX. *Rockville, USA.* (2007).
105. Cerreia Vioglio, P., Chierotti, M. R. & Gobetto, R. Pharmaceutical aspects of salt and cocrystal forms of APIs and characterization challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **117**, 86–110 (2017).
106. Savjani, K. T., Gajjar, A. K. & Savjani, J. K. Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN Pharm.* **2012**, 195727 (2012).
107. Weyna, D. R., Shattock, T., Vishweshwar, P. & Zaworotko, M. J. Synthesis and

- Structural Characterization of Cocrystals and Pharmaceutical Cocrystals: Mechanochemistry vs Slow Evaporation from Solution. *Cryst. Growth Des.* **9**, 1106–1123 (2009).
108. Braga, D., Maini, L. & Grepioni, F. Mechanochemical preparation of co-crystals. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 7638–7648 (2013).
 109. Alvarado, K. Uso de cocrisales para mejorar la solubilidad y velocidad de disolución de los fármacos. *Rev. Pensam. Actual* **15**, 207–215 (2015).
 110. Nireesha, G. *et al.* Lyophilization/Freeze Drying -An Review. *Ijntps* **3**, 87–98 (2013).
 111. Brittain, H. G. in *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis* (eds. Ahuja, S. & Scypinski, S.) (Academic Press, 2001).
 112. Stuart, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. Methods* **8**, (2004).
 113. Smith, E. & Dent, G. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach. Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach* (2005). doi:10.1002/0470011831
 114. Laws, D. D., Bitter, H.-M. L. & Jerschow, A. Solid-State NMR Spectroscopic Methods in Chemistry. *Angew. Chemie Int. Ed.* **41**, 3096–3129 (2002).
 115. Carter, M. & Shieh, J. Microscopy. *Guid. to Res. Tech. Neurosci.* 117–144 (2015). doi:10.1016/B978-0-12-800511-8.00005-8
 116. Wunderlich, B. Thermal Analysis. *Encycl. Mater. Sci. Technol.* 9134–9141 (2001). doi:10.1016/B0-08-043152-6/01648-X
 117. Lau, E. *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis: Preformulation studies. Separation Science and Technology* **3**, (2001).
 118. Dwivedi, C. *et al.* *Electrospun Nanofibrous Scaffold as a Potential Carrier of Antimicrobial Therapeutics for Diabetic Wound Healing and Tissue Regeneration. Nano- and Microscale Drug Delivery Systems: Design and Fabrication* (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-323-52727-9.00009-1
 119. Garnero, C., Aiassa, V. & Longhi, M. Sulfamethoxazole: Hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex: Preparation and characterization. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **63**, 74–79 (2012).
 120. Ge, M., Liu, G., Ma, S. & Wang, W. Polymorphic forms of furosemide characterized by THz time domain spectroscopy. *Bull. Korean Chem. Soc.* **30**, 2265–2268 (2009).
 121. Matsuda, Y. & Tatsumi, E. Physicochemical characterization of furosemide modifications. *Int. J. Pharm.* **60**, 11–26 (1990).

122. Doherty, C. & York, P. Furosemide Crystal Forms - Solid-State and Physicochemical Analyses. *Int. J. Pharm.* **47**, 141–155 (1988).
123. Ueto, T. *et al.* Polymorphs and a hydrate of furosemide-nicotinamide 1:1 cocrystal. *Cryst. Growth Des.* **12**, 485–494 (2012).
124. Babu, N. J., Cherukuvada, S., Thakuria, R. & Nangia, A. Conformational and synthon polymorphism in furosemide (Lasix). *Cryst. Growth Des.* **10**, 1979–1989 (2010).
125. Aloisio, C. & Longhi, M. Diloxanide furoate binary complexes with β -, methyl- β -, and hydroxypropyl- β -cyclodextrins: inclusion mode, characterization in solution and in solid state and *in vitro* dissolution studies. *Pharm. Dev. Technol.* **0**, 1–9 (2017).
126. Bongioanni, A. *et al.* Improving Properties of Albendazole Desmotropes by Supramolecular Systems with Maltodextrin and Glutamic Acid. *AAPS PharmSciTech* (2018). doi:10.1208/s12249-018-0952-0
127. Pereira, C. C. L. *et al.* A combined theoretical-experimental study of the inclusion of niobocene dichloride in native and permethylated β -cyclodextrins. *Organometallics* **26**, 4220–4228 (2007).
128. Abraham Miranda, J. *et al.* Characterization of systems with amino-acids and oligosaccharides as modifiers of biopharmaceutical properties of furosemide. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **149**, 143–150 (2018).
129. Jensen, K. T., Larsen, F. H., Löbmann, K., Rades, T. & Grohgan, H. Influence of variation in molar ratio on co-amorphous drug-amino acid systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **107**, 32–39 (2016).
130. Loftsson, T. & Brewster, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Drug solubilisation and stabilization. *J. Pharm. Sci.* **85**, 1017–1025 (1996).
131. Center for Drug Evaluation and Research. Guidances (Drugs) - Guía para la Industria: Pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata. (1997). Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm200707.htm>. (Accessed: 4th April 2018)
132. Moore, W. J. & Flanner, H. H. Mathematical comparison of dissolution profiles. *Pharm. Technol.* **20**, 64–74 (1996).
133. Costa, P. An alternative method to the evaluation of similarity factor in dissolution testing. *Int J Pharm* **220**, 77–83 (2001).
134. Yuksel, N., Kanik, A. E. & Baykara, T. Comparison of *in vitro* dissolution profiles by

- ANOVA-based, model-dependent and -independent methods. *Int. J. Pharm.* **209**, 57–67 (2000).
135. Membranas: funciones. Available at: <http://biomodel.uah.es/model2/lip/membranas-func.htm>. (Accessed: 8th April 2018)
 136. Giorno, L., Mazzei, R. & Drioli, E. Biological Membranes and Biomimetic Artificial Membranes. *Compr. Membr. Sci. Eng.* **1**, 1–12 (2010).
 137. Másson, M., Loftsson, T., Másson, G. & Stefánsson, E. Cyclodextrins as permeation enhancers: Some theoretical evaluations and in vitro testing. *J. Control. Release* **59**, 107–118 (1999).
 138. Dahan, A., Lennernäs, H. & Amidon, G. L. The fraction dose absorbed, in humans, and high jejunal human permeability relationship. *Mol. Pharm.* **9**, 1847–1851 (2012).
 139. Klose, D., Delplace, C. & Siepmann, J. Unintended potential impact of perfect sink conditions on PLGA degradation in microparticles. *Int. J. Pharm.* **404**, 75–82 (2011).
 140. Corti, G., Maestrelli, F., Cirri, M., Zerrouk, N. & Mura, P. Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption: II. Demonstration of the method suitability. *Eur. J. Pharm. Sci.* **27**, 354–362 (2006).
 141. Fujikawa, M., Ano, R., Nakao, K., Shimizu, R. & Akamatsu, M. Relationships between structure and high-throughput screening permeability of diverse drugs with artificial membranes: Application to prediction of Caco-2 cell permeability. *Bioorganic Med. Chem.* **13**, 4721–4732 (2005).
 142. Sinkó, B. *et al.* Skin-PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration. *Eur. J. Pharm. Sci.* **45**, 698–707 (2012).
 143. Alves, A. C. *et al.* On-line automated evaluation of lipid nanoparticles transdermal permeation using Franz diffusion cell and low-pressure chromatography. *Talanta* **146**, 369–374 (2016).
 144. Aloisio, C., Ponce-ponte, M., Granero, G. E. & Longhi, M. R. Effect of Complexes and Microemulsions on the Permeability of Drugs : Determination Using a New Biomimetic Artificial Membrane. (2018). doi:10.1208/s12249-018-1096-y
 145. Grignard, E., Taylor, R., McAllister, M., Box, K. & Fotaki, N. Considerations for the development of in vitro dissolution tests to reduce or replace preclinical oral absorption studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* **99**, 193–201 (2017).
 146. Sugano, K., Nabuchi, Y., Machida, M. & Aso, Y. Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability. *Int. J. Pharm.* **257**, 245–251 (2003).

147. Gennaro, A. *Remington: Farmacia. 20ª Edición, Tomo 1.* (Lippincott Williams & Wilkins, USA. Traducción de Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires., 2000).
148. Carstensen, J. & Rhodes, C. *Drug Stability. Principles and Practices. 3ª Edition.* (New York, Marcel Dekker., 2000).
149. Farmacopea argentina. Séptima Edición. **Volumen I**, (2017).
150. FDA. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. *Guid. Ind.* 1–15 (2015).
doi:http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf
151. International Conference on Harmonization. Text on validation of Analytical Procedures. (1995).
152. Allada, R., Maruthapillai, A., Palanisamy, K. & Chappa, P. Hygroscopicity Categorization of Pharmaceutical Solids by Gravimetric Sorption Analysis: A Systematic Approach. *Asian J. Pharm.* **10**, 279–286 (2016).
153. Newman, A. W., Reutzel-Edens, S. M. & Zografi, G. Characterization of the 'Hygroscopic' Properties of Active Pharmaceutical Ingredients. *J. Pharm. Sci.* **97**, 1047–1059 (2008).

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

EN REVISTAS CIENTÍFICAS INTERNACIONALES

1. “Structural and dynamic characterization of solid furosemide polymorphs by NQR and NMR methods”. A. Wolfenson, S.C. Pérez, Mariano J. Zuriaga, C. Garnero, **J. Abraham Miranda**, M. Longhi and S.N. Faudone. *Chem. Phys. Lett.* **641**, 163–168 (2015); DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2015.10.066>
2. “Characterization of systems with amino-acids and oligosaccharides as modifiers of biopharmaceutical properties of furosemide”. **J. Abraham Miranda**, C. Garnero, A. Zoppi, V. Sterren, A.P. Ayala and M.R. Longhi. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **149**, 143–150 (2018); DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.10.038>

EN REVISTAS CIENTÍFICAS NACIONALES

1. “Estudio de las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas del sistema supramolecular furosemida/arginina”. **J. Abraham Miranda**, A. Zoppi, V.B. Sterren, C. Garnero, M.R. Longhi, *Journal of the Argentine Chemical Society*, (2014), 101 (1-2).

TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN PRESENTADOS EN CONGRESOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

EN REUNIONES CIENTÍFICAS INTERNACIONALES

1. “Preparation and characterization of coamorphous glibenclamide system”. V. Sterren, A. Zoppi, **J. Abraham Miranda**, M.R. Longhi. 3a Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa). Córdoba, Argentina. Septiembre 2014.
2. “Evaluación de estrategias para aumentar la velocidad de disolución de furosemida”. **J. Abraham Miranda**, A. Zoppi, V. Sterren, C. Garnero, M.R. Longhi. VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas. Córdoba, Argentina. Noviembre 2015.
3. “Sistema supramolecular glibenclamida:arginina. Estudio de las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas”. V. Sterren, A. Zoppi, **J. Abraham Miranda**,

- M.R. Longhi. VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas. Córdoba, Argentina. Noviembre 2015.
4. "Impacto de la reestructuración de la asignatura practicanato preparatorio de la carrera de farmacia de la Universidad Nacional de Córdoba". M. García, **J. Abraham Miranda**, C. Garnero. VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas. Córdoba, Argentina. Noviembre 2015.
 5. "Implementación de innovaciones metodológicas en la asignatura practicanato de la carrera de farmacia de la Universidad Nacional de Córdoba". **J. Abraham Miranda**, M. García, C. Garnero. VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas. Córdoba, Argentina. Noviembre 2015.
 6. "Improving the solubility of furosemide". **J. Abraham Miranda**, A. Zoppi, V. Sterren, C. Garnero, M.R. Longhi. 4ta. Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Rosario, Argentina. Octubre 2016.
 7. "Evaluation of binary and ternary systems on biopharmaceutical properties of furosemide". **J. Abraham Miranda**, C. Garnero, V. Sterren, A. Zoppi, M.R. Longhi. 4ta. Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Rosario, Argentina. Octubre 2016.
 8. "Preparation and characterization of glibenclamide serine combination". V. Sterren, A. Zoppi, **J. Abraham Miranda**, M.R. Longhi. 4ta. Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Rosario, Argentina. Octubre 2016.
 9. "Evaluation of methodological innovations applied in the pharmacy degree at the National University of Córdoba based on survey results". M. García, **J. Abraham Miranda**, C. Aloisio, A. Zoppi, C. Garnero. 4ta. Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Rosario, Argentina. Octubre 2016.
 10. "Caracterización de sistemas binarios: sulfametoxazol:aminoácidos". **J. Abraham Miranda**, C. Garnero, M.R. Longhi. Primer Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencias de Materiales. Montevideo, Uruguay. Abril 2018.

EN REUNIONES CIENTÍFICAS NACIONALES

1. "Estudio de las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas del sistema supramolecular furosemida/arginina". **J. Abraham Miranda**, A. Zoppi, V. Sterren, C. Garnero, M.R. Longhi. 30° Congreso Argentino de Química. Buenos Aires, Argentina. Octubre 2014.
2. "Caracterización dinámica y estructural de la furosemida (diurético) por medio de RMN y RCN". A. Wolfenson, S. Pérez, M. Zuriaga, C. Garnero, **J. Abraham Miranda**, M. Longhi, S. Faudone. 100a Reunión Nacional de la Asociación Física Argentina. Villa de Merlo, San Luis, Argentina. Septiembre 2015.

3. "Estudios de caracterización de sistemas binarios furosemida:trietanolamina". J. Abraham Miranda, C. Garnero, Y. Santiago de Oliveira, A. Ayala, M. Longhi. XIII Reunión Anual - Asociación Argentina de Cristalografía. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina. Noviembre 2017.
4. "Síntesis y caracterización de albendazol clorhidrato: una nueva sal soluble". A. Bongioanni, **J. Abraham Miranda**, K. Chattah, A. Ayala, M. Longhi, C. Garnero. XIII Reunión Anual - Asociación Argentina de Cristalografía. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina. Noviembre 2017.
5. "Obtención y caracterización de una nueva forma sólida de efavirenz". V. Sterren, A. Zoppi, **J. Abraham Miranda**, M.R. Longhi. XIII Reunión Anual - Asociación Argentina de Cristalografía. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina. Noviembre 2017.
6. "Microscopia electrónica de barrido como herramienta para estudiar la morfología de fármacos polimórficos". S. Bueno, A. Bongioanni, **J. Abraham Miranda**, M.R. Longhi, C. Garnero. 5to. Congreso Argentino de Microscopía. La Falda, Córdoba, Argentina. Mayo 2018.