



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN FARMACÉUTICA

**Evaluación de la resistencia de diferentes formas cristalinas de
glibenclamida ante el estrés térmico y químico**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

Gabriela Ramírez Vázquez

No. cuenta 308280757

Directora de Tesis

Dra. Elizabeth Guadalupe Sánchez González

Asesor de Tesis

Dr. Vicente Jesús Hernández Abad



Ciudad de México 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

1. Introducción	4
2. Marco Teórico	6
2.1 Glibenclamida	6
2.1.1 Propiedades físicas y químicas de la glibenclamida	6
2.1.2 Polimorfismo de la Glibenclamida	7
2.2 Sólidos amorfos y cristalinos	8
2.2.1 Sistemas Cristalinos	9
2.2.2 Polimorfismo	10
2.2.3 Termodinámica de los sistemas cristalinos	11
2.2.4 Consecuencias Farmacéuticas del polimorfismo	14
2.3 Pruebas de estrés	15
2.3.1 Rutas de degradación química	16
2.3.2 Estudios de estrés para polimorfos	18
3. Planteamiento del Problema	20
4. Objetivos	21
5. Hipótesis	22
6. Metodología	23
6.1. Diagrama de Flujo	23
6.2 Material y equipo	24
6.3 Obtención de polimorfos por recristalización	25
6.4 Pruebas de estrés térmico y químico de cristales de glibenclamida	26
6.4.1 Condiciones del estudio, duración y análisis	26
6.5 Análisis	27
6.5.1 Óptica	27
6.5.2 Valoración	27
6.5.3 Calorimetría diferencial de barrido. (CDB)	28
6.5.4 Espectroscopia de Infrarrojo (IR)	29
6.6 Pruebas de estrés térmico y químico de cristales de glibenclamida en solución durante.	29
6.6.1 Condiciones de estudio, duración y análisis.	29
6.6.2 Valoración por CLAR	29
7. Resultados y Análisis de Resultados	31
7.1 Obtención de polimorfos.	31
7.1.1 Análisis térmico	32
7.1.2 Análisis óptico	35
7.1.3 Determinación de los Sistemas cristalinos	37

7.1.4 Análisis de Espectroscopia de absorción de Infrarrojo	38
7.2 Degradación forzada en solución a 40°C durante 72 h.	42
7.3 Condiciones de estrés	49
7.3.1 Análisis óptico	49
7.3.2 Análisis Térmico	51
7.3.3 Análisis de Espectroscopia de absorción de Infrarrojo	57
7.3.4 Análisis Cromatográfico	62
8. Conclusiones.....	68
9. Referencias Bibliográficas	69

1. Introducción

El polimorfismo es una característica que se presenta en una gran variedad de compuestos en nuestro entorno; esta puede ser definida como la capacidad de un compuesto de existir en dos o más formas cristalinas, característica que a su vez le confiere a cada estructura cristalina propiedades físicas o químicas distintas. Un caso muy conocido de polimorfismo, es el que presenta el carbono, ya que este puede existir en forma de diamante y de grafito.

En la industria farmacéutica gran variedad de fármacos presentan polimorfismo, esta es una característica que ha ayudado al desarrollo de medicamentos, sin embargo, también representa un problema, ya que los polimorfos varían en sus características físicas o químicas a pesar de ser entidades químicamente iguales. Debido a esto, las características que llegan a presentar los polimorfos pueden ser deseables o indeseables para la elaboración industrial de los medicamentos, como son su solubilidad, densidad, reactividad, estabilidad, entre otras.

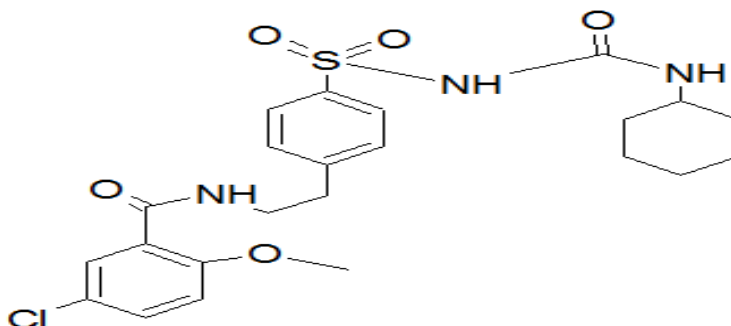
En el caso de la estabilidad, esto puede representar un riesgo toda vez que el número de polimorfos en los que un compuesto es capaz de cristalizar es variable, y el compuesto puede cristalizar dentro del mismo proceso de fabricación, obteniendo una mezcla de cristales al final de la producción, lo cual compromete la formulación y la efectividad del fármaco.

La glibenclamida es un hipoglucemiante indicado para el tratamiento de la diabetes *mellitus* tipo II, fármaco que presenta polimorfismo y para el que se ha demostrado que la materia prima comercial disponible es una mezcla de polimorfos, lo que no solo compromete su biodisponibilidad, sino también su estabilidad. Por ello, con el presente proyecto se busca caracterizar la resistencia al estrés térmico y químico de los polimorfos de glibenclamida en estudio, para abrir paso a estudios posteriores para la mejora de la producción industrial de dicho compuesto.

2. Marco Teórico

2.1 Glibenclamida

La glibenclamida (Figura 1) es un fármaco antidiabético oral que pertenece al grupo de las sulfonilureas y generalmente se administra como terapia antidiabética oral en pacientes con diabetes *mellitus* tipo II. La glibenclamida actúa para disminuir los niveles de glucosa en la sangre al estimular la liberación de insulina a partir de células β pancreáticas.¹



Creación propia.

Figura 1. Estructura molecular de glibenclamida

- ❖ Nombre IUPAC: 1-4-[2-(5-cloro-2-metoxibenzamida) etil] bencenosulfonil-3-cicloexilurea
- ❖ Peso Molecular: 494.00352 g/mol

2.1.1 Propiedades físicas y químicas de la glibenclamida^{2, 3}

- ❖ Aspecto: solido blanco
- ❖ Punto de fusión: 169 °C – 176°C
- ❖ Solubilidad en agua: 4 mg/L (a 27 °C)

2.1.2 Polimorfismo de la Glibenclamida

Recientemente, se ha informado que la cristalización de glibenclamida en diferentes disolventes dio lugar a dos formas polimórficas y pseudopolimórficas (solvatos), además de una forma vítrea obtenida por enfriamiento rápido⁴.

En la Tabla 1 se muestran las cuatro formas polimórficas típicas de la glibenclamida, donde los sistemas polimórficos pares IV-III y II-I presentan monotropismo y los sistemas polimórficos pares IV-II y III-II enantiotropismo.⁵

Tabla 1 .Patrones cristalinos de los polimorfos de glibenclamida ⁵				
Polimorfo	Forma cristalina	Dimensiones de celda		Volumen de celda
IV	Monoclínica centrada en la base	a= 13.944 Å b= 6.6016 Å c= 7.661 Å	$\alpha = 90.00^\circ$ $\beta = 99.43^\circ$ $\gamma = 90.00^\circ$	633.98 A ³
III	Monoclínica simple	a= 9.444 Å b= 17.706 Å c= 14.451Å	$\alpha = 90.00^\circ$ $\beta = 93.11^\circ$ $\gamma = 90.00^\circ$	2412.99 A ³
II	Ortorrómbica simple	a= 16.117 Å b= 12.696 Å c= 9.435 Å	$\alpha = 90.00^\circ$ $\beta = 90.00^\circ$ $\gamma = 90.00^\circ$	1930.58 A ³
I	Triclínica simple	a= 9.429160 Å b= 9.627872 Å c= 9.050986 Å	$\alpha = 116.90^\circ$ $\beta = 96.30^\circ$ $\gamma = 74.05^\circ$	704.44 A ³

2.2 Sólidos amorfos y cristalinos

De los varios estados de la materia en la que una sustancia puede residir, el estado sólido es el que se encuentra con más frecuencia y por lo tanto, es el estado más importante y relevante para el desarrollo farmacéutico.

El estado sólido, es un estado de la materia complejo, debido a que las fuerzas intermoleculares pueden acomodar las moléculas en diferentes formas, las cuales producen estados sólidos con distintas propiedades físicas^{6,7}. Debido a esto, los sólidos se pueden clasificar en sólidos cristalinos y sólidos amorfos, siendo los sólidos amorfos aquellos en los que la disposición de las moléculas es aleatoria, estos carecen del orden tridimensional de largo alcance, con el que sí cuentan los sólidos cristalinos, aunque el orden de corto alcance puede estar presente durante varias dimensiones moleculares.⁸

Los sólidos cristalinos tienen diferentes disposiciones y conformaciones de las moléculas en la red cristalina⁹, son partículas sólidas con forma regular y caras planas, la regularidad de la apariencia externa de los cristales es un reflejo de un alto grado de orden interno.¹⁰

2.2.1 Sistemas Cristalinos

La estructura cristalina se puede describir como una estructura tridimensional, construida por “ladrillos” (denominados celdas unitarias), las cuales son la porción más simple de la estructura cristalina que al repetirse reproduce todo el cristal.

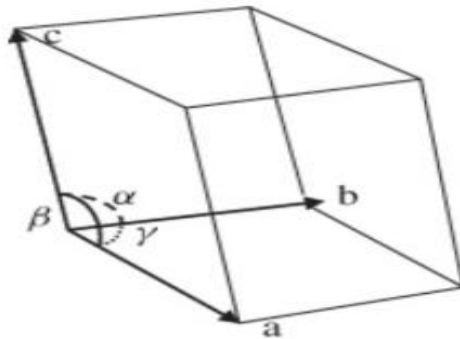


Figura 2. Celda unitaria, con sus tres ejes a , b y c y sus tres ángulos α , β y γ

Una celda unitaria (figura 2) tiene tres ejes a , b y c , y tres ángulos α , β , γ , entre estos ejes. La combinación de estos ejes y ángulos da lugar a siete sistemas cristalinos posibles (Tabla 2).¹¹

Tabla 2. Los siete sistemas cristalinos¹¹

Sistema cristalino	Ejes			Ángulos (°)		
	A	B	c	A	β	Γ
Triclínico	A	B	c	$\neq 90$	$\neq 90$	$\neq 90$
Monoclínico	A	B	c	90	$\neq 90$	90
Ortorrómbico	A	B	c	90	90	90
Tetragonal	A	B	a	90	90	90
Trigonal	A	A	a	$\neq 90$	$\neq 90$	$\neq 90$
Hexagonal	A	B	a	90	120	90
Cúbico	A	A	a	90	90	90

- En el sistema cristalino trigonal, los tres ángulos son los mismos; pero en el sistema triclínico todos los ángulos son diferentes

2.2.2 Polimorfismo

El polimorfismo se define como “una fase cristalina sólida de un compuesto dado que resulta de la posibilidad de al menos dos disposiciones diferentes de las moléculas de ese compuesto en el estado sólido”¹². Dicho de otra manera, es la capacidad de una sustancia de existir en dos o más fases cristalinas que tienen diferentes arreglos y/o conformación de las moléculas en el cristal¹³.

2.2.3 Termodinámica de los sistemas cristalinos

Se dice que los sistemas poseen energía, que al interactuar exhiben cambios simultáneos en las propiedades observables, que se acompañan de cambios en la energía, por tanto, la energía de un sistema implica el poder de interactuar, pero también es una descripción de los resultados de la interacción en términos de propiedades de cambio¹⁴. En el caso de un sistema polimórfico existen dos cuestiones importantes a conocer:

- ❖ ¿Cuál es su estabilidad termodinámica relativa, o en qué condiciones puede producirse una transformación?
- ❖ ¿Cuánto tiempo se necesita para que la transformación alcance el equilibrio?

La termodinámica proporciona información sobre la primera pregunta y la cinética de la segunda¹⁵, por esta razón la termodinámica es una de las propiedades más importantes a determinar en los sistemas polimórficos.

La estabilidad termodinámica relativa de dos polimorfos se puede determinar por la diferencia de sus energías libres de Gibbs ($\Delta G = G_1 - G_2$)¹⁶. ΔG está en función de la temperatura dado que:

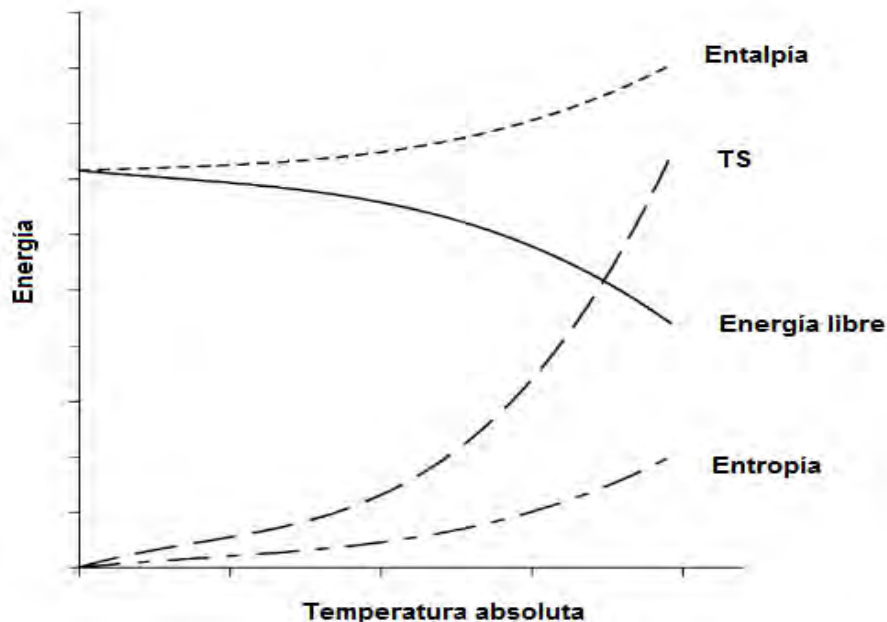
$$G = H + ST \quad \text{Ecuación (1)}$$

H Y S son entalpia y entropía respectivamente, las cuales son dependientes de la temperatura (T).¹⁶

Cuando el sistema sufre una transformación a una temperatura constante, la energía libre de dicha transición se puede representar por la siguiente ecuación¹⁴:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Ecuación (2)}$$

La Figura 3 muestra la relación de energía para un sistema hipotético, donde la entalpía y la entropía de un sistema incrementan, al incrementarse la temperatura¹⁴. De acuerdo con la tercera ley de la termodinámica, la entropía de un sólido cristalino perfecto es cero en la temperatura absoluta cero ($T=0$) y la energía libre de Gibbs por lo tanto es igual a la entropía en 0 Kelvin. El término TS aumentará más rápidamente con el aumento de la temperatura que la entalpía y la energía libre de Gibbs, en consecuencia, disminuirá con el aumento de la temperatura.¹⁷

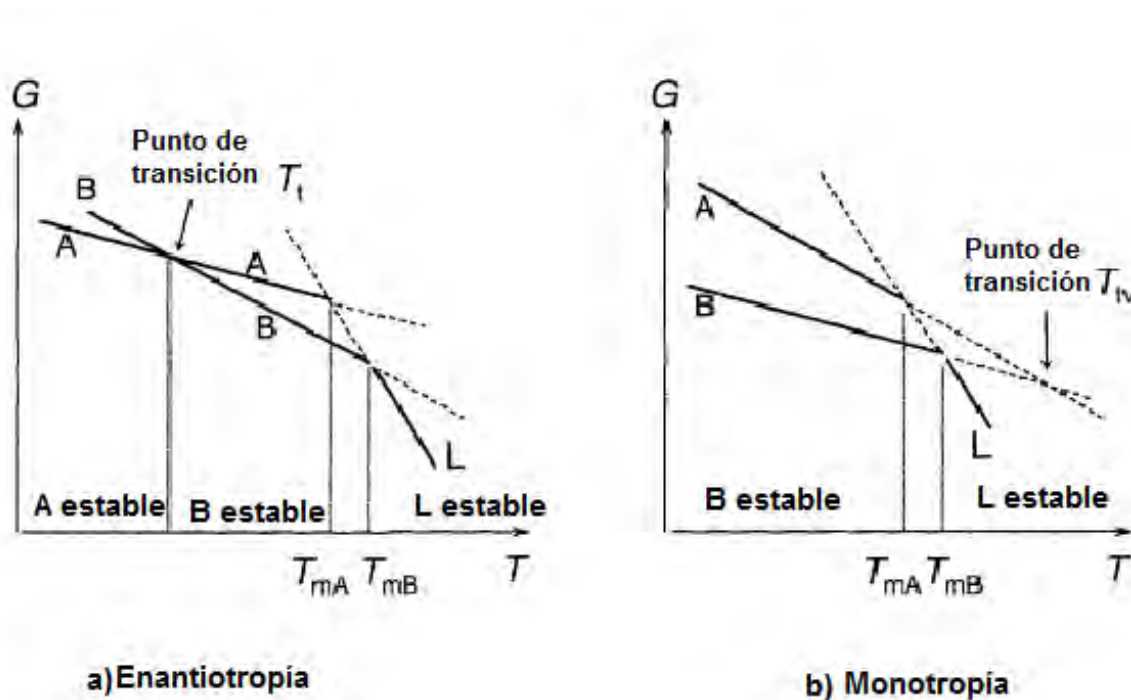


Adaptado de: Brittain¹⁴. Polymorphism in Pharmaceutical Solids

Figura 3. Dependencia de varias funciones termodinámicas a la temperatura

Existen dos tipos de polimorfismo que pueden ser distinguidas por su relación termodinámica entre dos formas: monotrópica (donde la transición exotérmica sólido-sólido de la forma metaestable a la estable sólo ocurre en una dirección y no es reversible) o enantiotrópica (donde dicha transición es reversible).⁵

Una representación de la relación entre monotropía y enantiotropía se puede obtener mediante el trazado de la energía libre de un sistema sólido- líquido, manteniendo la temperatura y la presión constante. (Figura 4)



Adaptado de: Huang¹⁶. Crystallization in Polymorphic Systems

Figura 4. Diagrama que muestra la relación de estabilidad entre dos polimorfos A y B, donde L: líquido de A y B; T_m punto de fusión, G: energía libre y T: temperatura

La temperatura en la que dos polimorfos tienen la misma estabilidad se define como temperatura de transición (T_t), si T_t se localiza por debajo de las temperatura de fusión de los dos polimorfos, se dice que los dos polimorfos son enantiotrópicos y el sistema exhibe enantiotropismo (figura 4a). En el caso de un sistema monotrópico (figura 4b), la T_t se localiza por arriba de las temperaturas de fusión de los dos polimorfos, y se dice que ambos polimorfos son monotrópicos.⁷

2.2.4 Consecuencias Farmacéuticas del polimorfismo

A pesar de que los polimorfos son entidades químicamente idénticas, pueden dar lugar a compuestos físicamente diferentes y consecuentemente las características que derivan de su estructura en estado sólido también difieren¹⁸. Algunas de las propiedades químicas y físicas que pueden variar en los polimorfos son el punto de fusión, la reactividad química, solubilidad aparente, la disolución, propiedades ópticas y mecánicas, presión de vapor, y la densidad. Estas propiedades pueden tener un impacto directo sobre la capacidad de procesar y en la fabricación de medicamentos, así como en la estabilidad del fármaco y en su biodisponibilidad, ya que una forma farmacéutica sólida metaestable puede cambiar la estructura cristalina en respuesta a cambios en condiciones ambientales, durante su procesamiento, o con el tiempo. Por lo tanto, el polimorfismo puede afectar a la calidad, seguridad y eficacia del medicamento⁹.

2.3 Pruebas de estrés

Las pruebas de estrés de fármacos, permiten identificar los posibles productos de degradación de estos, y a su vez ayudan a establecer las vías de degradación y la estabilidad intrínseca de la molécula.¹⁹

En el caso de una forma polimórfica, a menudo se utiliza la más estable, ya que está posee el potencial energético más alto, lo cual disminuye la posibilidad de conversión de una forma polimórfica a otra, mientras que la forma metaestable, suele utilizarse para mejorar la biodisponibilidad.⁹

La energía libre de Gibbs, actividad termodinámica, y la solubilidad de un sistema polimórfico proporcionan las medidas definitivas de estabilidad relativa en condiciones definidas de temperatura y presión⁹. Sin embargo, la naturaleza de la prueba de estrés dependerá del fármaco o del tipo de medicamento en cuestión.

Estas pruebas deben incluir el efecto de la temperatura, humedad, y en algunos casos la oxidación y fotólisis del fármaco. También se debe evaluar la susceptibilidad del fármaco a hidrólisis en una amplia gama de valores de pH cuando está en solución o suspensión. Las pruebas de fotoestabilidad deben ser una parte integral de las pruebas de estrés.¹⁹

Una de las formas más sencillas de entender la inestabilidad de un fármaco, es a través de la pérdida de fármaco, por medio de una reacción química, dando como resultado la reducción de la potencia del mismo.

Entre las razones más importantes por las cuales se debe estudiar la degradación de los fármacos son:

- ❖ La identificación de los productos de degradación no solo otorga la información de la disminución de la potencia del fármaco, sino que también permite conocer si el fármaco se degrada a una sustancia tóxica. Por lo tanto, es importante determinar no sólo la cantidad de fármaco que se pierde con el tiempo, sino también sus productos de degradación.²⁰
- ❖ La degradación del fármaco puede formar productos estéticamente inaceptables, ya que pueden existir variaciones en el color u olor, y esto puede crear una idea errónea de que el producto se encuentre adulterado.²¹
- ❖ A pesar de que un fármaco puede estabilizarse en su formulación prevista, el formulador debe demostrar que el fármaco también es estable en las condiciones de pH, donde será su sitio de acción.²¹

2.3.1 Rutas de degradación química

La estabilidad química de las moléculas farmacéuticas es un asunto de gran preocupación, ya que afecta a la seguridad y eficacia del medicamento.²² La mayoría de las sustancias farmacéuticas cuentan con estructuras moleculares diversas y son, por lo tanto, susceptibles a diferentes rutas de degradación.²¹

Las posibles vías de degradación que puede presentar un fármaco, incluyen la hidrólisis, deshidratación, isomerización y racemización, la eliminación, la oxidación y las interacciones complejas con excipientes y otros fármacos.

El poder predecir la inestabilidad química de un fármaco en función de su estructura molecular, sería de gran ayuda en el diseño de los estudios de estabilidad ya que permitiría identificar formas en las que los fármacos problemáticos, podrían ser formulados para minimizar la degradación química

❖ Hidrólisis

La hidrólisis es una de las reacciones químicas de degradación más comunes en el ámbito farmacéutico. Este es un proceso químico que incluye la descomposición de un compuesto por reacción con agua. Un estudio hidrolítico en condiciones ácidas y básicas implica catálisis de grupos funcionales ionizables presentes en la molécula.²²

Las pruebas de estrés en ácido o base implican la degradación de una sustancia, que se ve obligada a su degradación, por la exposición a dichas condiciones generando los productos de degradación. Dado lo anterior, existen dos tipos de hidrólisis, la ácida y la básica, siendo los ésteres y amidas los grupos funcionales que más la presentan.¹⁹

❖ Fotólisis

En un ensayo de estabilidad, la fotólisis debe ser evaluada para demostrar que si el fármaco al presentar una exposición a la luz, ésta no dé lugar a un cambio inaceptable.²⁰

Los estudios de estabilidad con fotólisis se realizan para generar productos de degradación primaria por la exposición a los rayos UV o condiciones fluorescentes. Las condiciones de estrés de luz, pueden inducir a una oxidación por medio de un mecanismo de radicales libres.

Los grupos funcionales como carbonilos, aromáticos, alquenos, cloruros de arilo, sulfuros y polienos son propensos a presentar fotosensibilidad.²³

2.3.2 Estudios de estrés para polimorfos

El propósito principal de los estudios de estabilidad es proporcionar la evidencia acerca de cómo la calidad de una sustancia farmacéutica o producto farmacéutico varía con el tiempo bajo la influencia de una variedad de factores ambientales, como la temperatura, la humedad y la luz, y así poder establecer un período de conservación del producto farmacéutico y las condiciones de almacenamiento recomendadas.²⁴

Con frecuencia un polimorfo se transforma a otro termodinámicamente más estable; cuando dicha transformación se lleva a cabo, la industria farmacéutica se enfrenta, entre otros, a problemas relacionados con la biodisponibilidad del fármaco¹⁷, por ello la importancia de los estudios de caracterización y estabilidad de los polimorfos.

Los sistemas polimórficos, proporcionan una forma simplificada para estudiar las relaciones de estructura – estabilidad, porque, por definición, la diferencia similitud de la estabilidad de los polimorfos sólo proviene de la diferencia similitud entre sus estructuras, y no de sus diferencias químicas.¹⁶

Algunas de las técnicas comúnmente utilizadas para la determinación de estabilidad en polimorfos son las siguientes:

- ❖ **Análisis Térmico Diferencial:** en el análisis térmico diferencial la pérdida o ganancia de calor resultante de los cambios físicos o químicos que ocurren en una muestra, son registrados en función de la temperatura de la muestra en

estudio. Los cambios entálpicos, tanto exo y endotérmicos, son causados por las transiciones de fase. Por ejemplo la fusión, ebullición, sublimación, vaporización, estructura cristalina de inversión, sólido-sólido de transición, y la pérdida de agua por lo general producen efectos endotérmicos, mientras que la cristalización produce efectos exotérmicos.²⁵

- ❖ Espectroscopia de Infrarrojo: la técnica de IR es utilizada para la identificación de diferentes polimorfos ya que ésta, aparte de ser rápida, también, es cuantitativa y cualitativa.²⁵

3. Planteamiento del Problema

El polimorfismo se presenta en un gran número de fármacos, entre los que se encuentra la glibenclamida, y a pesar de que los polimorfos sean entidades químicamente idénticas su ordenamiento cristalino no lo es, confiriéndole a cada uno de ellos, en muchas ocasiones, propiedades físicas y químicas diferentes, comprometiendo su estabilidad, debido a que el arreglo molecular difiere entre ellos de modo tal que la susceptibilidad a la degradación de los polimorfos de un mismo compuesto será diferente.

La glibenclamida se expende en diversos países en diferentes formas del estado sólido; sin embargo, a la fecha no se cuenta con información suficiente acerca de la resistencia termodinámica de dichas formas sólidas estrés térmico y químico, la cual puede modificar sus atributos de calidad como ingrediente de uso farmacéutico. Es por ello, que es necesario contar con evidencia de los cambios en el estado sólido derivados de pruebas de resistencia térmica y química.

4. Objetivos

Objetivo General

Determinar la resistencia al estrés térmico y químico de los polimorfos de glibenclamida en estudio, para conocer cuál es el más estable y por lo tanto menos susceptible a degradación, de acuerdo con su acomodo molecular.

Objetivos particulares

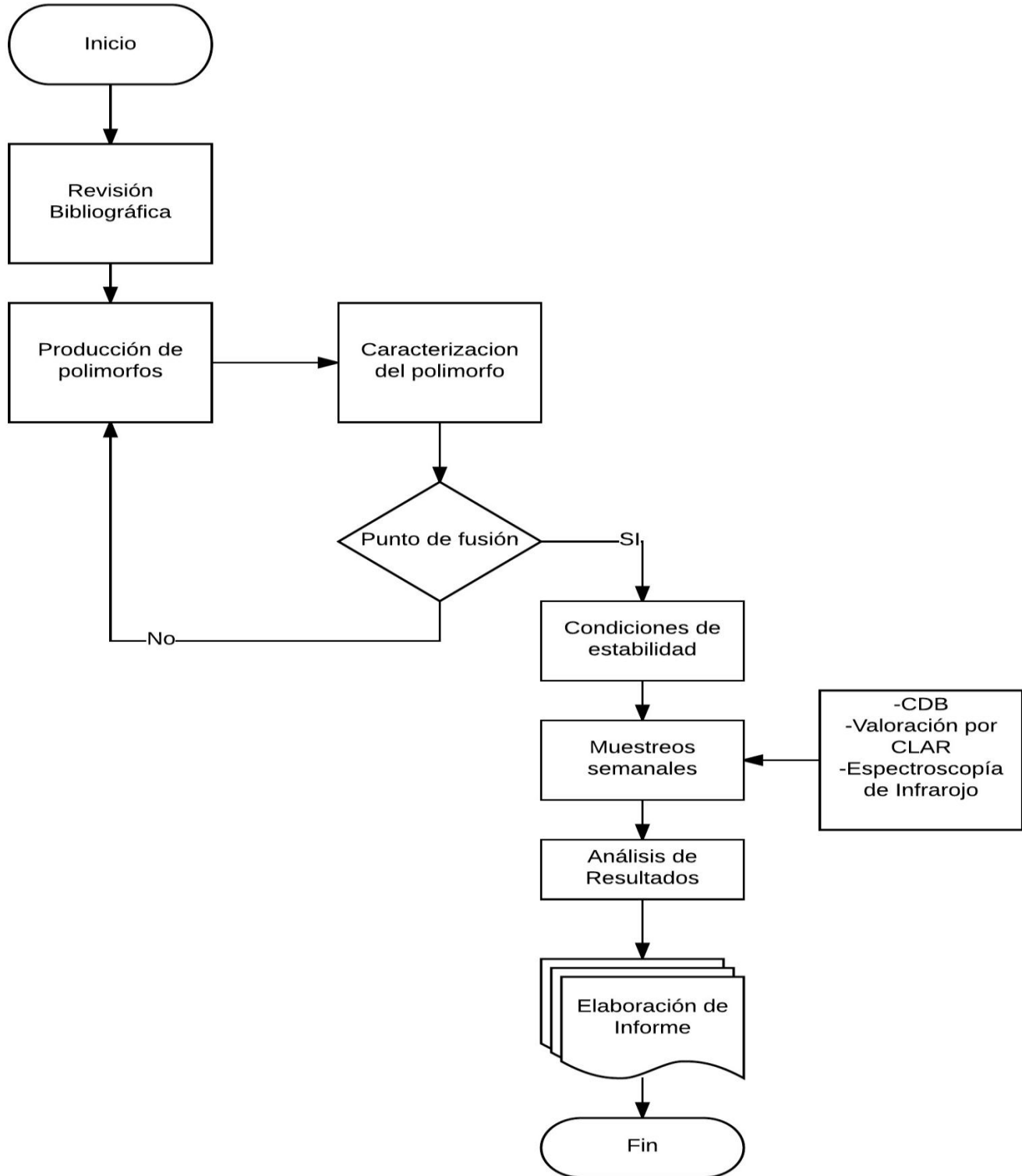
- ❖ Evaluar la resistencia al estrés térmico y químico de cristales de glibenclamida y de materia prima comercial.
- ❖ Comparar la resistencia al estrés térmico y químico de cristales de glibenclamida y de materia prima comercial de glibenclamida.

5. Hipótesis

El ordenamiento cristalino de cada uno de los polimorfos de glibenclamida en estudio le conferirá diferente resistencia al estrés térmico y químico.

6. Metodología

6.1. Diagrama de Flujo



6.2 Material y equipo

Reactivos

Reactivo	Fabricante	Lote
Glibenclamida	Química Alkano	EGAA-B-B0008
Cloroformo	J. T. Baker	9070-03
Acetona	J. T. Baker	9006-02
Metanol _{HPLC}	TSG Tecsiquim	Tec-042-NB-H
Acetonitrilo _{HPLC}	TSG Tecsiquim	Tec-316-NK-H
Nitrógeno industrial comprimido	Praxair	-----
Fosfato Monobásico de Potasio	J. T. Baker	B14C13
Ácido fosfórico	J. T. Baker	50639
Felodipino	Kener S. A. de C. V	E0059505
Hidróxido de sodio	Macron fine chemicals	0000022894
Ácido clorhídrico	Merck	209353 R
Peróxido de hidrógeno	Degasa, S.A. de C.V.	-----
Agua desionizada	Theissier	-----

Material

Material	Capacidad
Matraces volumétricos	10mL, 100 mL
Vasos de precipitados	100 mL, 600 mL
Probeta	500 mL
Viales de vidrio con tapa	2 mL
Parrilla de agitación y calentamiento	-----
Embudo de vidrio	-----
Reloj de vidrio	-----
Pipetas graduadas	10mL
Embudo Buchner	-----
Matraz Kitazato	500 mL

Equipos e instrumentos

Equipos e instrumentos	Marca	Modelo
Cromatógrafo de líquidos de alta resolución	Hitachi Primade	
Calorímetro	Perkin Elmer Differential Scanning Calorimeter	TAC 7/DX
Esteroscopio	Flash Chemicals	ES-24
Millipore	Milli-Q	QFARDOOR1
Micropipeta	Eppendorf	
Sonicador	Branson	3800
Bomba de Vacío		GAST
Balanza analítica Mettler Toledo	OHAUS Explorer Pro EP214	MT5
Microbalanza	Mettler Toledo	MT5
Potenciómetro	Cole Parmer	05996-60
Congelador	VWR	55700-386
Equipo de filtración para HPLC	Millipore	Holder 47MM
Estufa	Lab-line Instruments Inc	3620
Cámara de luz ultravioleta Y de luz blanca	-----	-----

6.3 Obtención de polimorfos por recristalización

Para cada producción de polimorfos se pesaron aproximadamente 5 g de glibenclamida, disolviéndolo bajo calentamiento y con agitación mecánica constante en el disolvente seleccionado (acetona o cloroformo), observando que la solución se volviera clara, una vez que no había turbidez el sistema fue retirado del calentamiento y el contenido de la solución se vertió inmediatamente a un matraz Erlenmeyer que se encontraba en una mezcla frigorífica, compuesta por H₂O₂/ CH₃ (CO) CH₃/ NaCl en una proporción 50:45:5, a temperatura constante de – 27 °C ± 2 °C, durante un periodo de veinticuatro horas.

Pasado este periodo de tiempo, el contenido del matraz se filtró en a través de una membrana de nylon, poro 0.45 μm , con vacío; el matraz recolector y el embudo de filtración se mantuvieron en congelación a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta el momento de ser empleados, el sólido retenido en la membrana se lavó con porciones del disolvente correspondiente a una temperatura de $-27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, separando las aguas de lavado.

Las recuperaciones de solido se colocaron en una estufa de convección a $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 h. Posteriormente se pasaron a un recipiente plástico, en un desecador.

6.4 Pruebas de estrés térmico y químico de cristales de glibenclamida

6.4.1 Condiciones del estudio, duración y análisis.

Condiciones de almacenamiento	Duración del estudio	Análisis a realizar
<ul style="list-style-type: none">• $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$• $25\text{ }^{\circ}\text{C}$• $75\% \pm 5\%$ HR• Luz blanca• Luz UV	<ul style="list-style-type: none">• 12 semanas• 12 semanas• 4 semanas• 4 semanas• 4 semanas	<ul style="list-style-type: none">• Ópticas• Valoración• Calorimetría diferencial de barrido• IR

6.5 Análisis

6.5.1 Óptica.

Se tomó una porción representativa de la muestra de estudio, y se observó en el estereoscopio Flash Chemicals, con un aumento de 4x, haciendo registro con fotografías

6.5.2 Valoración

Preparación de la muestra

Se realizaron pesadas independientes de 1 mg aproximadamente de las muestras en estudio por triplicado, las cuales se disolvieron en MeOH_{HPLC} llevándolos a un volumen de 10 mL, de esta disolución se tomó un 1 mL y se llevó a un volumen de 10 mL en MeOH_{HPLC}, posteriormente se colocó en un vial y se colocó en el muestreador del HPLC, para ser analizadas.

Preparación de los controles de calidad

Se pesaron 10 mg de glibenclamida por triplicado, y se disolvió en MeOH_{HPLC} llevándolo a un volumen de 10 mL, posteriormente se tomaron 7 mL de la muestra y se llevo a un volumen de 100 mL, para posteriormente ser analizados junto con las muestras en estudio bajo las siguientes condiciones:

- ✓ Columna: C₈, (150 x 4.6mm de diámetro), 5µm de diámetro de partícula.
- ✓ Detector: lámpara UV.

- ✓ Longitud de onda: 254nm
- ✓ Fase móvil: acetonitrilo: solución amortiguadora de fosfatos pH 3.5, 0.05 M, octilsulfonato de sodio 10^{-5} M. (55:45)
- ✓ Velocidad de flujo: 2.2 mL/min
- ✓ Tiempo de corrida: 5 min
- ✓ Volumen de inyección de las muestras: 25 μ L
- ✓ Tiempo de retención: glibenclamida 2.5 ± 0.25 min

6.5.3 Calorimetría diferencial de barrido. (CDB)

Para este estudio se utilizó el calorímetro Perkin Elmer DSC7, siendo calibrado con un estándar de indio (In), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para cada determinación se colocaron en crisoles de aluminio para calorimetría de 3- 5 mg de muestra en estudio, y bajo una atmosfera de N₂, se realizaron las corridas en un intervalo de 50 – 230 °C a una velocidad de 10 °C/ min.

En el caso de la producción de los polimorfos, esta prueba se utilizó como un control de calidad para ser utilizados y colocarlos bajo las condiciones de estudio, posteriormente se realizó semanalmente para poder determinar cambios en el cristal.

6.5.4 Espectroscopia de Infrarrojo (IR)

Las muestras se leyeron directamente sobre un cristal de diamante, por la técnica de reflectancia total atenuada (ATR), en un espectrofotómetro Perkin Elmer FT- IR.

6.6 Pruebas de estrés térmico y químico de cristales de glibenclámda en solución durante.

6.6.1 Condiciones de estudio, duración y análisis.

Condiciones de estudio en solución	Duración del estudio	Análisis a realizar
<ul style="list-style-type: none">•HCl 0.1 M a 40°C•NaOH 0.1M a 40°C•H₂O₂ 3% a 40°C	<ul style="list-style-type: none">•72 h	<ul style="list-style-type: none">•Valoración por CLAR

6.6.2 Valoración por CLAR

Preparación de la muestra

Se realizaron pesadas independientes de 10 mg aproximadamente de las muestras en estudio, las cuales se disolvieron en MeOH_{HPLC} llevándolos a un volumen de 10 mL, de esta disolución se tomó un 1 mL, colocándolo en tubos de ensaye para posteriormente adicionales 10 mL de HCl 0.1 M, NaOH 0.1 M y H₂O₂ al 3%, respectivamente los cuales se colocaron en una estufa a 40°C durante 72 h, pasado este tiempo se tomó 1 mL de cada tuvo y se llevo a un volumen de 10 mL

en MeOH_{HPLC}, posteriormente se paso a un vial y se colocó en el muestreador del HPLC, para ser analizadas.

Preparación de los controles de calidad

Se pesaron 10 mg de glibenclamida por triplicado, y se disolvieron en MeOH_{HPLC} llevándolo a un volumen de 10 mL, posteriormente se tomaron 7 mL de la muestra y se llevo a un volumen de 100 mL, para posteriormente ser analizados junto con las muestras en estudio bajo las siguientes condiciones:

- ✓ Columna: C₈, (150 x 4.6mm de diámetro), 5µm de diámetro de partícula.
- ✓ Detector: lámpara UV.
- ✓ Longitud de onda: 254nm
- ✓ Fase móvil: acetonitrilo: solución amortiguadora de fosfatos pH 3.5, 0.05 M, octilsulfonato de sodio 10⁻⁵ M. (55:45)
- ✓ Velocidad de flujo: 2.2 mL/min
- ✓ Tiempo de corrida: 5 min
- ✓ Volumen de inyección de las muestras: 25 µL
- ✓ Tiempo de retención: glibenclamida 2.5 ± 0.25 min

7. Resultados y Análisis de Resultados

7.1 Obtención de polimorfos.

Se obtuvieron dos formas cristalinas por recristalización a partir de materia prima de glibenclamida (Gb_MP), identificándolas como se indica en la tabla 3.

Tabla 3. Identificación de los polimorfos utilizados en el estudio				
Polimorfo (nombre experimental)	Disolvente utilizado	Punto de fusión. (°C)	Descripción	Rendimiento experimental (%)
Gb_MP	-----	176.83	Cristales blancos	-----
Gb_CH ₃ (CO)CH ₃	Acetona	174.83	Cristales blancos con brillo	80.96
Gb_CHCl ₃	Cloroformo	173.50	Cristales blancos	85.89

Para los polimorfos Gb_CH₃(CO)CH₃ y Gb_CHCl₃, se utilizaron las formulas condensadas de los disolventes para su identificación experimental, en el caso del polimorfo Gb_MP se trata de la materia prima comercial.

7.1.1 Análisis térmico

Un análisis térmico aporta información sobre las transiciones de fases endotérmicas y exotérmicas y de reacciones químicas como función de la temperatura y la energía, lo que lo convierte en uno de las principales técnicas que se realizan en estudios de estado sólido, ya que otorgan una forma de caracterización a través de las señales características de eventos asociados a ganancia o pérdida de energía.²⁶

Polimorfo	Punto de fusión (°C)			ΔH (J/g)
	Inicio	Máximo	Termino	
Gb_MP	175.09	176.83	178.42	94.4784
Gb_CH₃(CO)CH₃	173.76	174.83	175.33	22.3859
Gb_CHCl₃	172.12	173.50	174.03	57.4007
Producto de degradación	205.45	209.33	211.67	63.4256

En la tabla 4 se muestran los datos obtenidos por CDB, donde se puede observar las diferencias de entalpía y punto de fusión de cada forma cristalina, dichas diferencias son observables en la figura 6, la cual muestra los termogramas de los diferentes cristales utilizados, donde en el caso del polimorfo Gb_CHCl₃ se puede observar una señal de desolvatación, indicando trazas del disolvente utilizado para su recristalización. De manera general se observan endotermas con picos largos y finos, lo cual indica la pureza del cristal; ya que un pico ancho, señala presencia de impurezas como es el caso de la figura 6D, que corresponde al producto de

degradación obtenido por fusión en arena en el laboratorio, donde el ancho del pico es mayor en comparación a los cristales, ya que el rango de fusión de dicho producto de degradación es de 6 °C, en comparación a los cristales, donde es de 3 °C para el polimorfo Gb_MP y de 2°C para los polimorfos Gb_CH₃(CO)CH₃ y Gb_CHCl₃ respectivamente. Dicho producto de degradación tiene un punto de fusión de 209.33°C, el cual corresponde con el producto de degradación reportado en la literatura que se muestra en la figura 5.²⁷

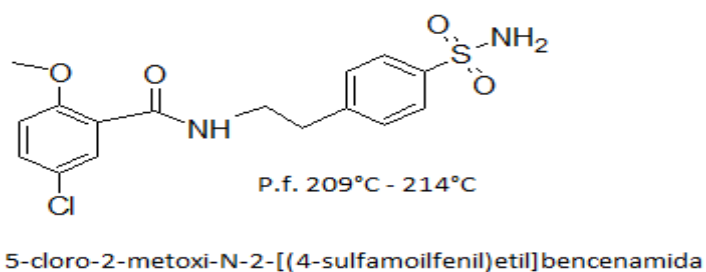


Figura 5. Producto de degradación de glibenclamida encontrado en la literatura²⁷

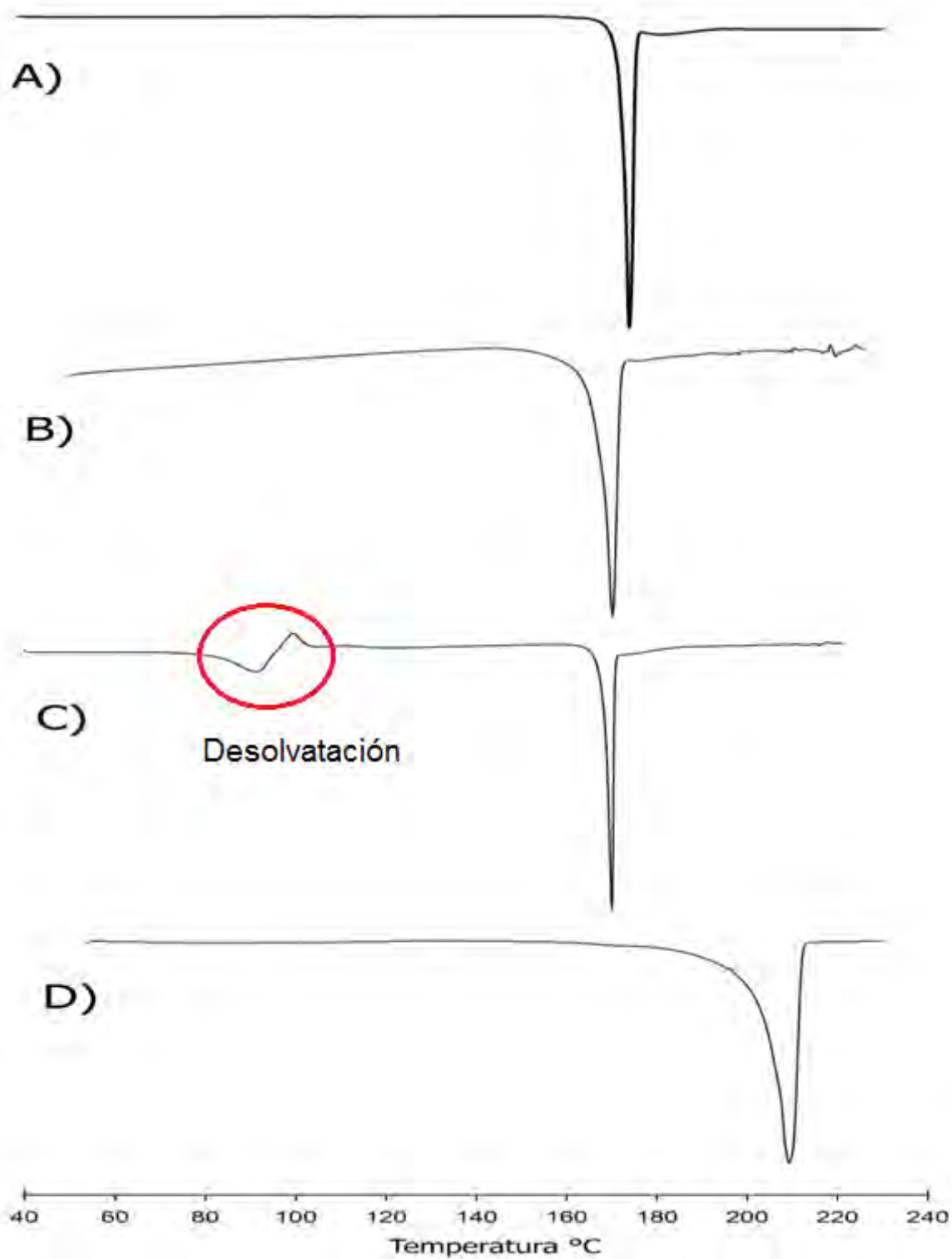


Figura 6. Termogramas obtenidos por CDB de los lotes del (A) polimorfo Gb_MP, (B) polimorfo Gb_CH₃(CO)CH₃, (C) polimorfo Gb_CHCl₃ y de un producto de degradación térmica (D).

7.1.2 Análisis óptico

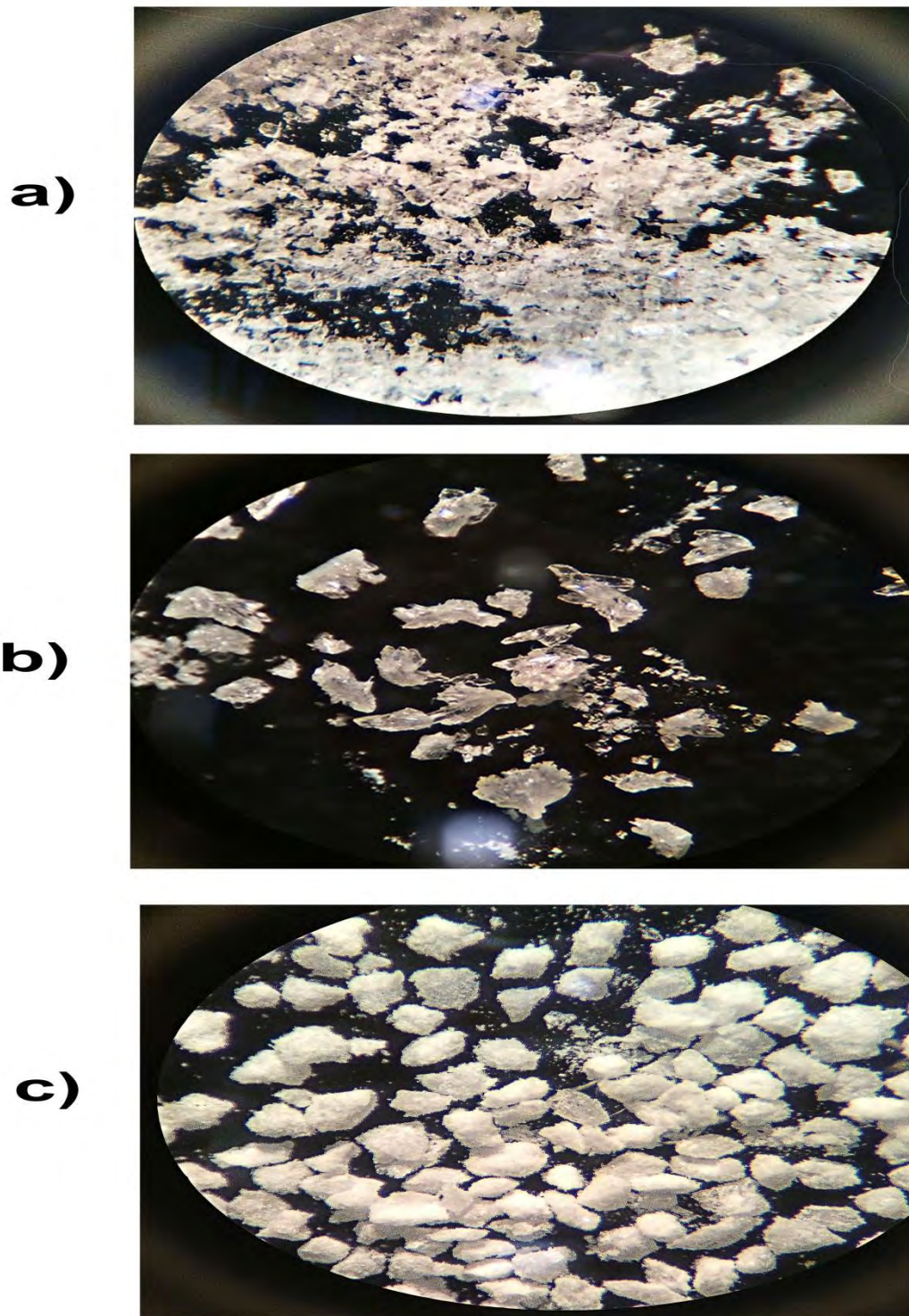


Figura 7. Ópticas obtenidas a partir del estereoscopio con aumento 4x, donde: a) Polimorfo Gb_MP, b) Polimorfo Gb_CH₃(CO)CH₃ y c) Polimorfo Gb_CHCl₃

Algunos cristales presentan una variación de morfología y de composición en el volumen del cristal, debida a los cambios en las condiciones de formación del cristal a lo largo de su crecimiento²⁸. En la figura 7 se muestran los diferentes cristales analizados, estableciendo a partir de su observación que tanto el polimorfo Gb_MP y Gb_CH₃(CO)CH₃ (figura 7a y 7b) presentan una morfología tabular, ya que su aspecto es plano a modo de tabla. Sin embargo, se debe destacar que en cuanto a apariencia a simple vista los cristales del polimorfo Gb_CH₃(CO)CH₃ presentaban brillo, a diferencia de los demás, en cuanto al polimorfo Gb_CHCl₃ (figura 7c), se observaron conglomerados de cristales, lo que permite inferir que dicho polimorfo, está constituido de pequeñas estructuras cristalinas que se conglomeran formando gránulos de mayor tamaño.

7.1.3 Determinación de los Sistemas cristalinos

Tabla 5. Relación termodinámica de los cristales						
Polimorfo	Señal: Endoterma			Interpretación	ΔH (J/g)	Análisis
	Inicio (°C)	Máximo (°C)	Termino (°C)			
Gb_MP	175.09	176.83	178.42	Fusión	94.4784	Monotrópico con respecto a polimorfo Gb_CH ₃ (CO)CH ₃ y Gb_CHCl ₃
Gb_CH ₃ (CO)CH ₃	173.76	174.83	175.33	Fusión	22.3859	Monotrópico respecto a polimorfo Gb_MP y Enantiotrópico con respecto al polimorfo Gb_CHCl ₃
Gb_CHCl ₃	172.12	173.50	174.03	Fusión	57.4007	Monotrópico respecto a polimorfo Gb_MP y Enantiotrópico con respecto al polimorfo Gb_CH ₃ (CO)CH ₃

En la tabla 5, se muestran los datos obtenidos a partir del método de CDB de los cristales de glibenclamida, para establecer la relación termodinámica a través de los datos de entalpía y el punto máximo en la endoterma de cada uno. Para el par Gb_MP - Gb_CH₃(CO)CH₃ y para el par Gb_MP - Gb_CHCl₃ existe una relación monotrópica, mientras que para el par Gb_CH₃(CO)CH₃ - Gb_CHCl₃ hay una relación enantiotrópica. Como ya se había mencionado anteriormente, un sistema enantiotrópico establece que una forma es estable por debajo de la temperatura de transición, y la otra forma es estable por encima de la temperatura de transición.²⁹ Dicho de otra manera, el polimorfo Gb_MP termodinámicamente es el más estable comparado con los otros dos cristales, ya que un cristal en el que existen interacciones

electrostáticas fuertes presentará un punto y un calor de fusión altos,³⁰ lo que le otorgara mayor resistencia al estrés, y por ende no sufrirá transición a ninguno de las otras dos formas polimórficas.

En el caso del sistema monotrópico (par Gb_CH₃(CO)CH₃ - Gb_CHCl₃) sólo un polimorfo es estable a todos los niveles razonables de temperaturas,⁵ siendo este el polimorfo Gb_CH₃(CO)CH₃, lo que implica que el polimorfo Gb_CHCl₃ sería el menos resistente al estrés térmico y químico; y al ser sometido a condiciones de estrés, este se reestructurará, desolvatándose para así tratar de formar una estructura cristalina más fuerte.

7.1.4 Análisis de Espectroscopia de absorción de Infrarrojo

La espectroscopia infrarroja ofrece información sobre la estructura y conformación molecular de un compuesto en el estado sólido mediante sondeo de vibraciones de átomos¹⁵, con lo que es posible elucidar una estructura tentativa de la molécula, razón por la cual esta técnica es fundamental para la determinación de polimorfismo, ya que una molécula que presenta polimorfos, muestra en sus espectros la misma huella dactilar (zona de identidad o desigualdad entre dos espectros), debido a que se trata de la misma molécula químicamente, sin embargo, en la parte de la región fundamental del espectro, donde se observan las señales características de los enlaces principales, éstas difieren debido a que su arreglo molecular en el espacio no es el mismo, y por ende el comportamiento de los enlaces presentes en la molécula será distinto en cada uno.

Para este estudio se identificaron los enlaces característicos de la molécula de glibenclámda dentro de sus espectros (figura 8), lo cual se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Datos obtenidos a través de los espectros de infrarrojo.						
cm⁻¹						
Polimorfo	N-H	C=O	C=O	N-H	S=O	
	Urea	urea	amida	amida		
Gb_MP	3312.97	1713.9	1615.72	1519.64	1340.88	1156.51
Gb_CH₃(CO)CH₃	3313.72	1713.90	1615.64	1519.82	1340.84	1156.35
Gb_CHCl₃	3314.4	1713.43	1622.37	1539.25	1338.59	1158.89

Sin embargo, se debe hacer énfasis en la intensidad y forma de las señales en el espectro, siendo las diferencia en estos dos rubros más notoria en el caso del polimorfo Gb_CHCl₃ (figura 8c) en el rango de 3500cm⁻¹ a los 2500 cm⁻¹ y de 2000 cm⁻¹ a los 700 cm⁻¹ aproximadamente, donde se puede observar, que dicho polimorfo presenta señales más anchas, cuya intensidad difiere, esto para las señales de los enlaces N-H a los 3314.4 cm⁻¹ y 1539.25 cm⁻¹, lo cual permite inferir que dicho polimorfo, presenta formación de puentes de hidrógeno^{31,32}, a diferencia de los otros dos. Lo anterior no solo afecta la solubilidad del compuesto, si no que también modifica su reactividad, aunado a que la forma de las señales muestra mayor rigidez de la molécula, lo que implicaría que al someterlo a condiciones de estrés esta sea más susceptible a degradación, que las otras dos.^{33,14}

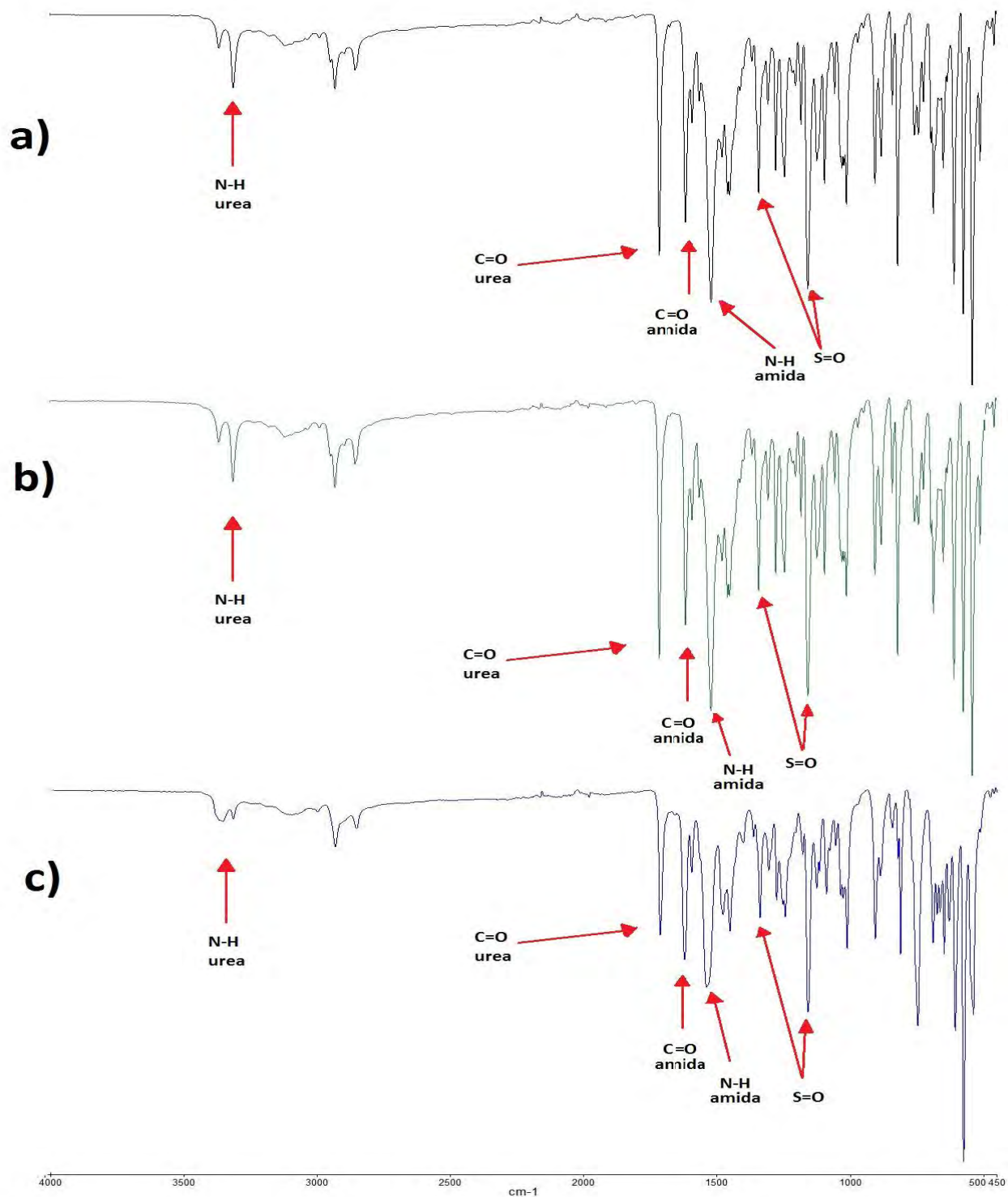


Figura 8. Espectros de IR de los cristales de glibenclámda, donde a,b y c, son el Polimorfo Gb_MP, Polimorfo Gb_CH₃(CO)CH₃ y Polimorfo Gb_CHCl₃ respectivamente.

La diferencia en las intensidades de las señales se debe a las diferentes vibraciones que puede presentar la molécula³⁴, dichas intensidad tienen relación directa con la magnitud del momento dipolar, de manera que cuanto mayor es el momento dipolar más intensa es la absorción³¹, lo cual indica que las diferencias en las intensidades de las señales reflejan que los enlaces vibran diferente de un polimorfo a otro.

En la tabla 7, se muestran los diferentes porcentajes de transmitancia (%T) de los principales enlaces de la molécula de glibenclamida, donde se observan que la intensidad de las señales no es muy diferente entre ellas, ya que todas se encuentran en el rango de señales débiles (70% - 95%). Sin embargo, estudios recientes muestran que si bien en los polimorfos las vibraciones de las moléculas son generalmente pequeñas, estas pueden ser lo suficientemente grandes como para afectar significativamente a la estabilidad relativa de los polimorfos.³⁵

Tabla 7. Porcentajes de transmitancia de los principales enlaces de glibenclamida en los polimorfos de estudio

Enlace	Polimorfo Gb_MP	Polimorfo Gb_CH ₃ (CO)CH ₃	Polimorfo Gb_CHCl ₃
	% Transmitancia		
NH (urea)	93.07	92.86	96
CO * (urea)	80.99	80.78	87.87
CO *(amida)	83.37	83.09	86.12
NH (amida)	77.58	77.2	84.2
SO *	85.46	85.43	89.08
	78.58	78.22	82.44
*Indica que entre los átomos existe la presencia de un doble enlace			

7.2 Degradación forzada en solución a 40°C durante 72 h.

Condición de estrés en solución de HCl a una concentración de 0.1M

En la literatura se reporta para la glibenclamida degradación por hidrólisis ácida, debido al ataque nucleofílico en la sulfonilurea que presenta en su estructura.³⁷ Para determinar las diferencias en hidrólisis debidas las diferencias de estado sólido, se realizó el análisis experimental de los diferentes cristales sometiendo a condiciones que favorecían la hidrólisis ácida durante un tiempo de 72 h. Las muestras tratadas fueron analizadas por cromatografías de líquidos de alta resolución, obteniendo los cromatogramas mostrados en la figura 9, donde se realiza la comparación de los cristales en esta condición contra el blanco (9a) y la muestra control (9b), misma que presentó un tiempo de retención de 2.78 min, el cual concuerda con las señales de los polimorfos Gb_MP y Gb_CH₃(CO)CH₃, que si bien las señales son bajas existía aun la presencia de glibenclamida, a diferencia del polimorfo Gb_CHCl₃ donde se obtuvo una señal a los 3.39 min, que haciendo la comparación con la muestra control, se puede inferir que ya no se trataba del compuesto de interés, sino de algún producto de degradación, y que por ende el polimorfo Gb_CHCl₃ fue más susceptible a sufrir hidrólisis ácida.

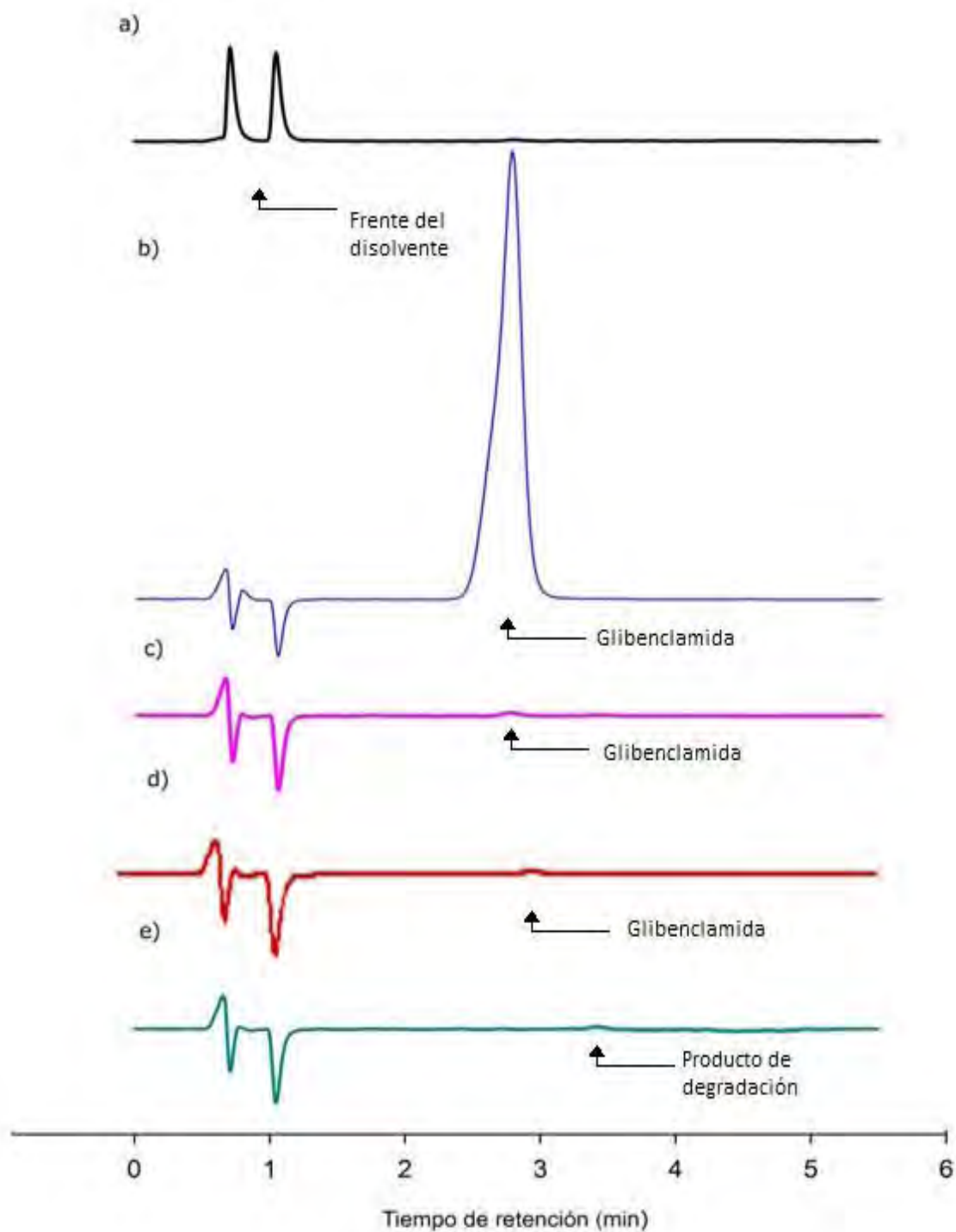


Figura 9. Cromatogramas de las muestras de cristales de glibenclamida en solución 0.1M de HCl, durante 72 h a 40 °C, donde: a) Blanco, b) Muestra control de glibenclamida, c) Polimorfo Gb_MP, d) Polimorfo Gb_CH₃(CO)CH₃ y e) Polimorfo Gb_CHCl₃

Condición de estrés en solución de NaOH a una concentración de 0.1 M

En el caso de la condición de hidrólisis básica (figura 10), el polimorfo Gb_CH₃(CO)CH₃ (figura 10d) presentó mayores porcentajes de contenido en su valoración, lo que nos indica una mayor resistencia a la hidrólisis básica de los tres cristales, mientras que de los polimorfos Gb_CHCl₃ y Gb_MP, este último exhibió una mayor susceptibilidad a hidrólisis básica, siendo éste el menos resistente al estrés en esta condición.

Sin embargo, los tres cristales, mostraron mayor degradación en la condición de hidrólisis ácida, que en base a resultados anteriores se puede observar que los cristales de glibenclamida siguen la ruta de degradación conocida de las sulfonilureas³⁶,³⁷ (figura 11 y 12), destacado que la glibenclamida es más susceptible a hidrólisis ácida que en medio básico, lo cual concuerda con lo establecido en la literatura, donde se marca que la tasa de hidrólisis de las sulfonilureas es 100 veces mayor en condiciones ácidas que en básicas.²⁷

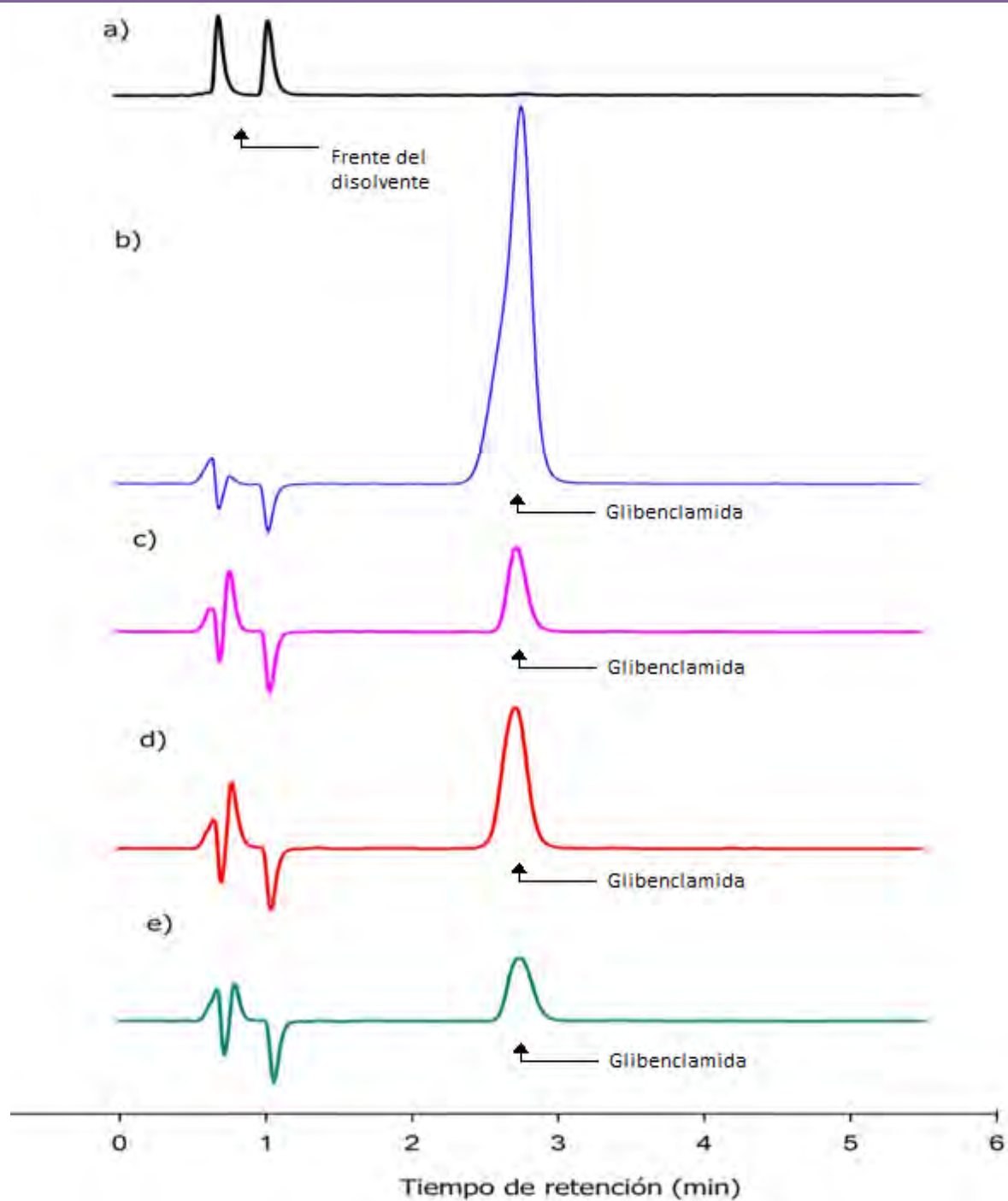


Figura 10. Cromatogramas de las muestras de cristales de glibenclamida en solución 0.1M de NaOH, durante 72 h a 40 °C, donde: a) Blanco, b) Muestra control de glibenclamida, c) Polimorfo Gb_MP, d) Polimorfo Gb_CH₃(CO)CH₃ y e) Polimorfo Gb_CHCl₃

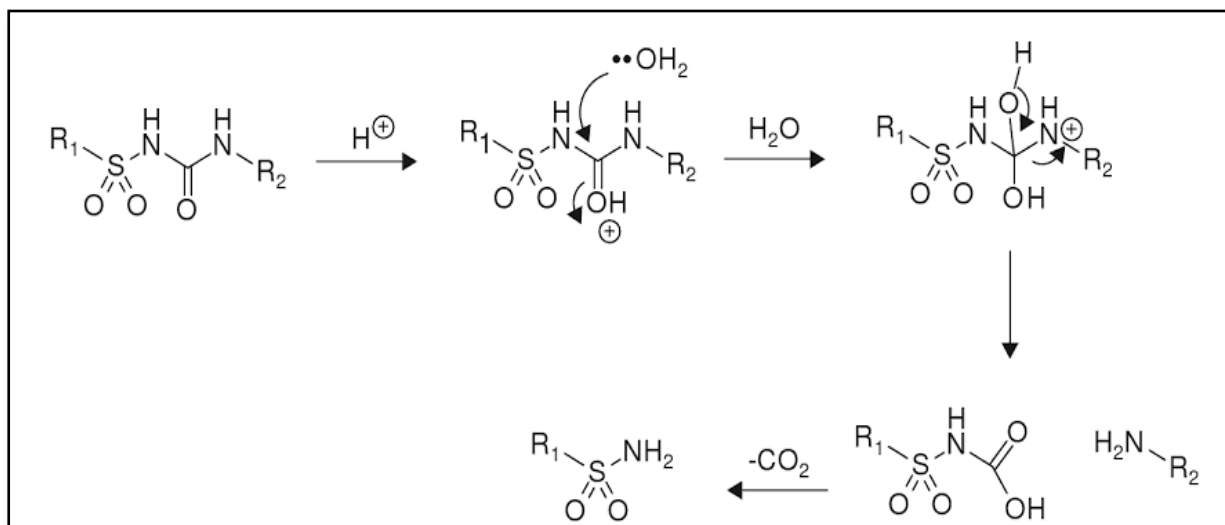


Figura 11. Ruta de degradación de las sulfonilureas por hidrólisis

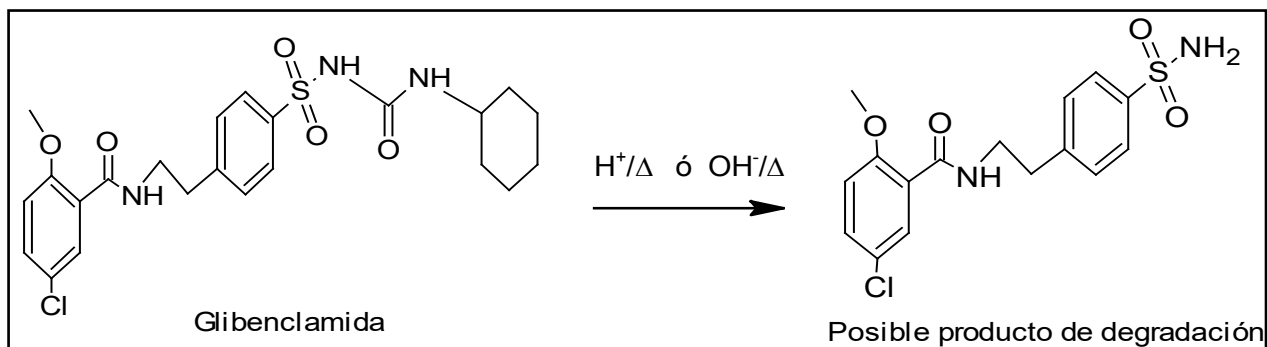


Figura 12. Ruta de degradación de la glibenclamida por hidrólisis

Condición de estrés en solución de H_2O_2 a una concentración del 3%

El peróxido de hidrógeno se utiliza ampliamente para la oxidación de sustancias en estudios de degradación forzada ya que la degradación oxidativa de la sustancia o fármaco, en este caso, implica un mecanismo de transferencia de electrones para formar aniones reactivos y cationes³⁶.

En las muestras en estudio se obtuvieron diferente susceptibilidad a la degradación por oxidación, siendo el polimorfo Gb_ $CHCl_3$ y Gb_ $CH_3(CO)CH_3$ más susceptibles que el polimorfo Gb_MP (figura 13), lo cual se puede justificar debido a que los sulfuros y fenoles son susceptibles a la oxidación²², grupos funcionales que están presente en la molécula de glibenclamida.

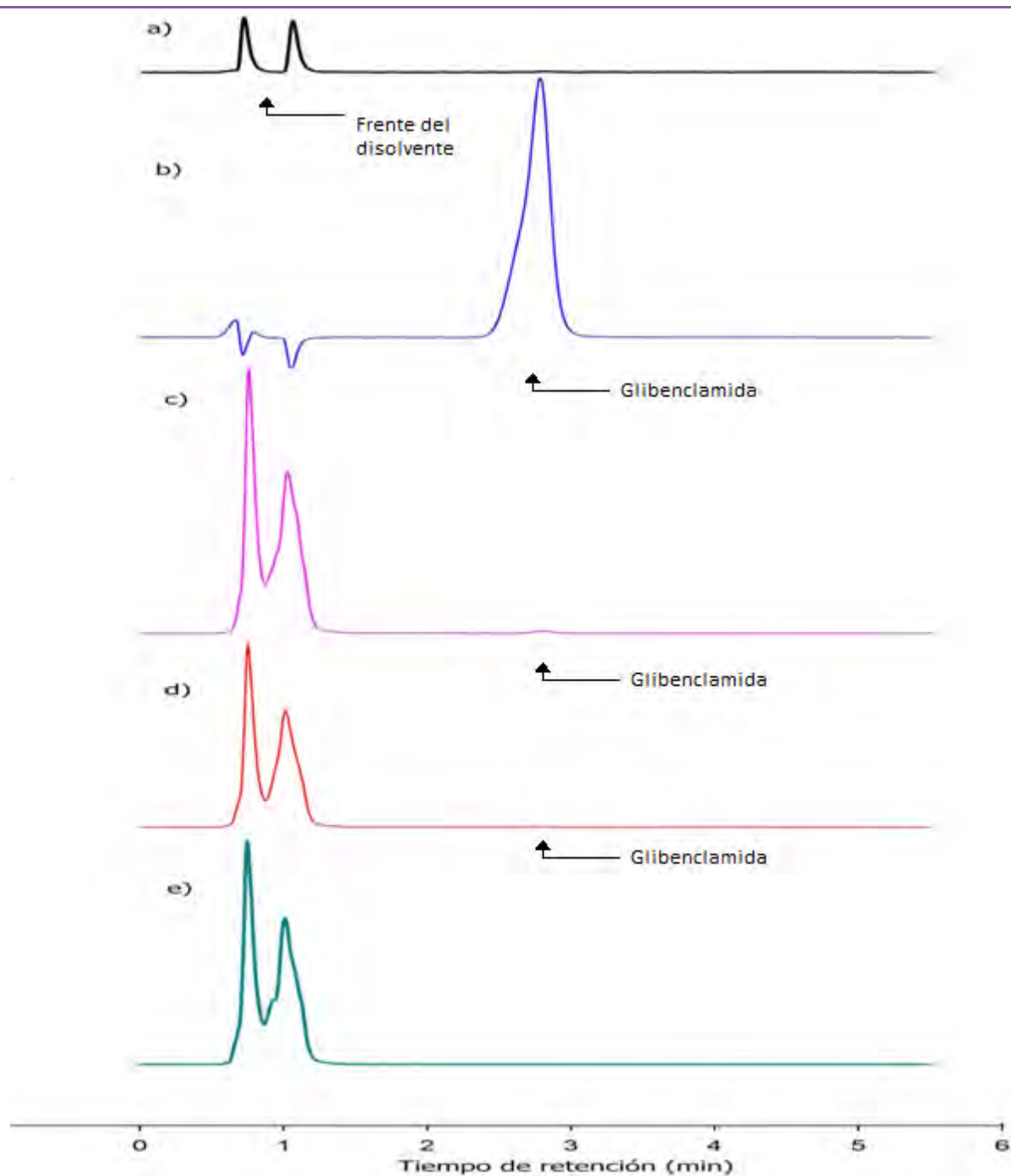


Figura 13. Cromatogramas de las muestras de cristales de glibenclamida en solución de H_2O_2 al 3%, durante 72 h a $40\text{ }^\circ\text{C}$, donde: a) Blanco, b) Muestra control de glibenclamida, c) Polimorfo Gb_MP, d) Polimorfo Gb_ $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ y e) Polimorfo Gb_ CHCl_3

7.3 Condiciones de estrés

7.3.1 Análisis óptico

En la figura 14 se muestran las ópticas de los polimorfos utilizados en el estudio, bajo condiciones de estrés, siendo A, B, C, D y E, las condiciones de 25°C, 40°C, 75% HR, luz blanca y luz ultravioleta, respectivamente, en donde se puede observar que los cristales no presentaron cambios muy marcados en su aspecto, ya que en ningún momento se observaron cambios de coloración. Sin embargo, en el caso del polimorfo Gb-CH₃(CO)CH₃, en la condición de humedad relativa se observaron estructuras tabulares de mayor tamaño.

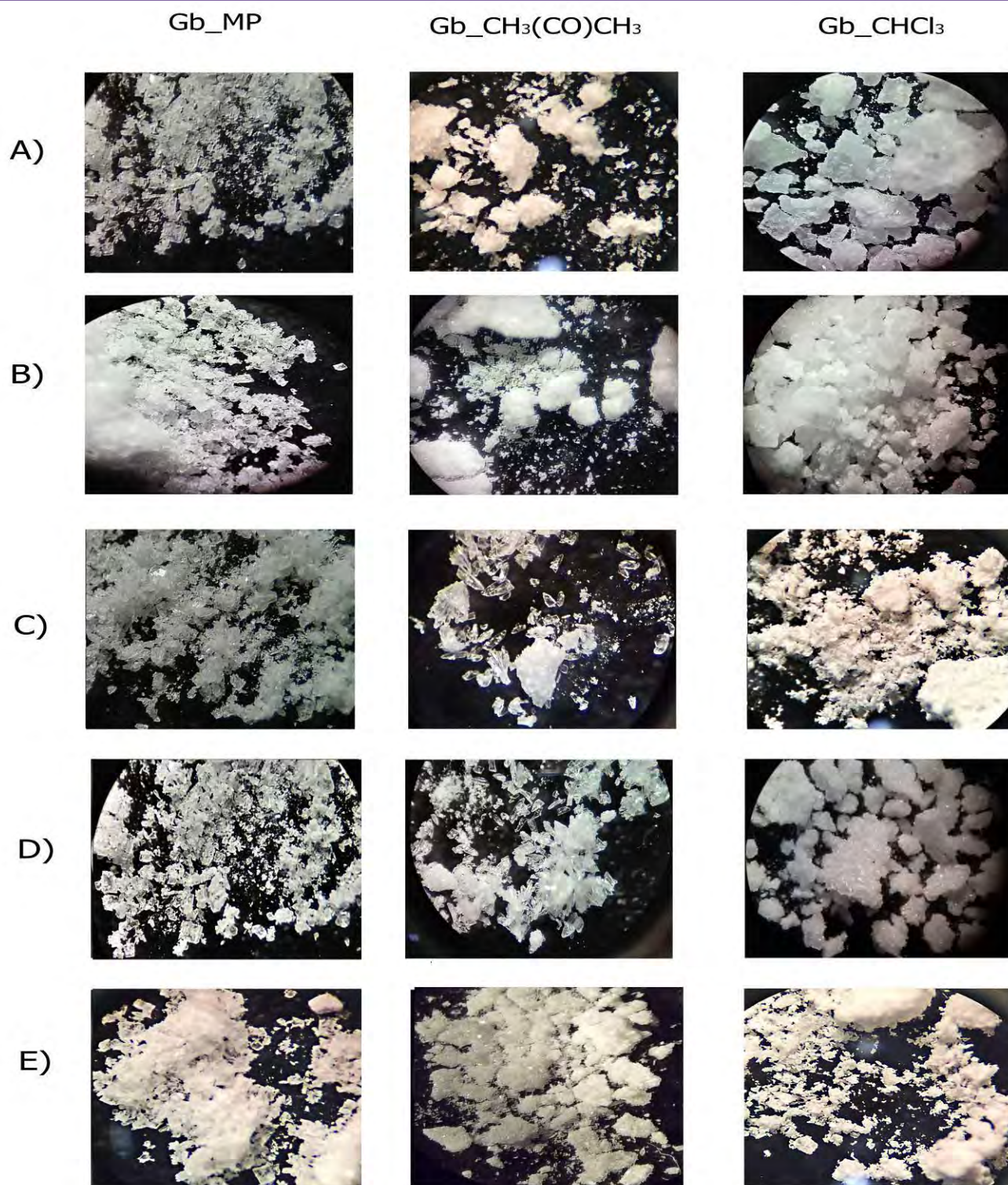


Figura 14. Ópticas de los cristales en condiciones de estrés donde Gb_MP, Gb_CH₃(CO)CH₃ y Gb_CHCl₃, corresponde al número de polimorfo, y A, B, C, D y E a las condiciones de 25°C, 40°C, 75% HR, -Luz blanca y Luz Ultravioleta, respectivamente.

7.3.2 Análisis Térmico

La técnica de calorimetría diferencia de barrido es utilizada para analizar las transiciones térmicas de un compuesto, en donde pueden ser observables señales de fusión, cristalización, desolvatación, descomposición, entre otras, por tal motivo se realizó el análisis térmico de los cristales semanalmente, en las figuras 16,18 y 19 se muestra la comparación de los termogramas obtenidos por CDB, de los lotes contra los termogramas de estos mismos bajo condiciones de estudio.

En el caso del polimorfo GB_MP (figura 16) se puede observar que después de los 200°C se presentan señales de degradación en todas las condiciones, donde, para la condición de 25°C se puede observar una endoterma bien definida, con un máximo de 217°C, punto de fusión que coincide con el de un producto de degradación térmica reportado en estudios recientes³⁸ (figura 15A). Sin embargo, en la condición de 75% de HR, se presentaron señales a los 120°C y 148°C (figura 15B), mismas, que ya no corresponden al punto de fusión de dicho cristal, el cual es de 176.83°C. Lo cual permite inferir la formación de otros posibles productos de degradación.

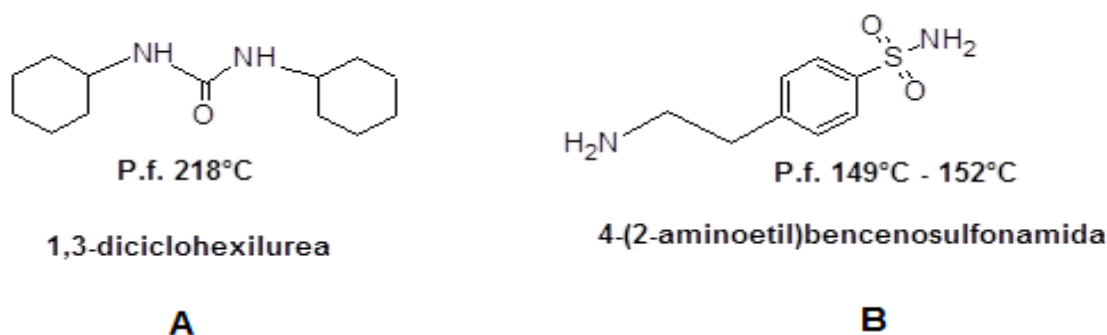


Figura 15. Productos de degradación de glibenclámda marcados en la literatura.

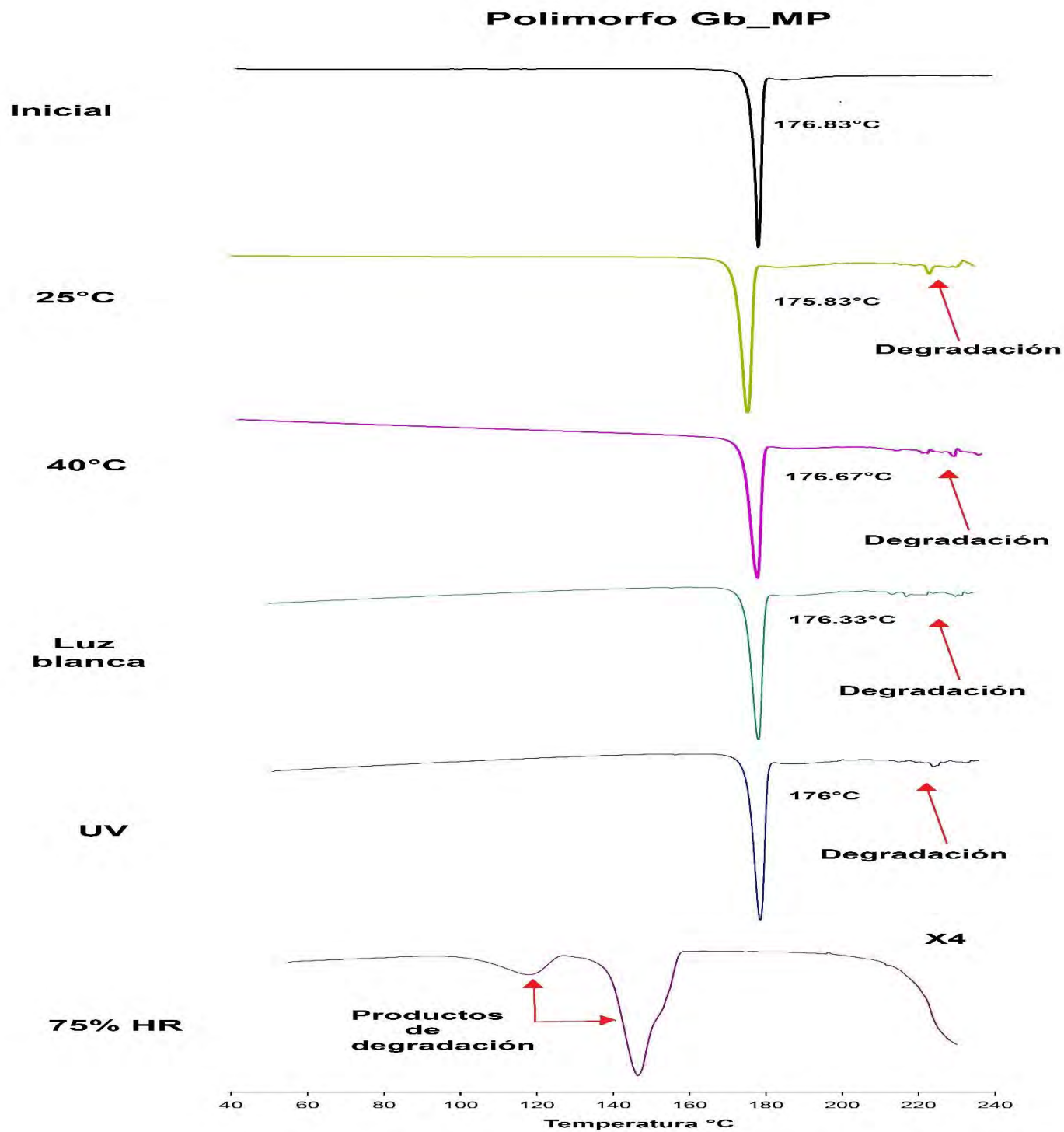
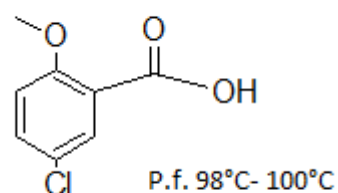


Figura 16. Comparación de los termogramas obtenidos por CDB del polimorfo Gb_MP, bajo diferentes condiciones de estrés.

En cuanto al polimorfo Gb-CH₃(CO)CH₃ (figura 18) se presentaron señales de degradación en todas las condiciones después de los 200°C, las cuales son más notorias en las condiciones térmicas, como son 25°C y 40°C, donde en esta última, se observa una señal con un máximo a los 103.17°C, señal que se podría confundir, con una desolvatación, misma que se descarta, debido a que el cristal inicial no presenta dicha señal. Lo que permite inferir la presencia de algún posible producto de degradación térmico de la glibenclamida (figura 17).



Ácido 5-cloro-2-metoxibenzoico

Figura 17. Posible producto de degradación de glibenclamida descrito en la literatura.

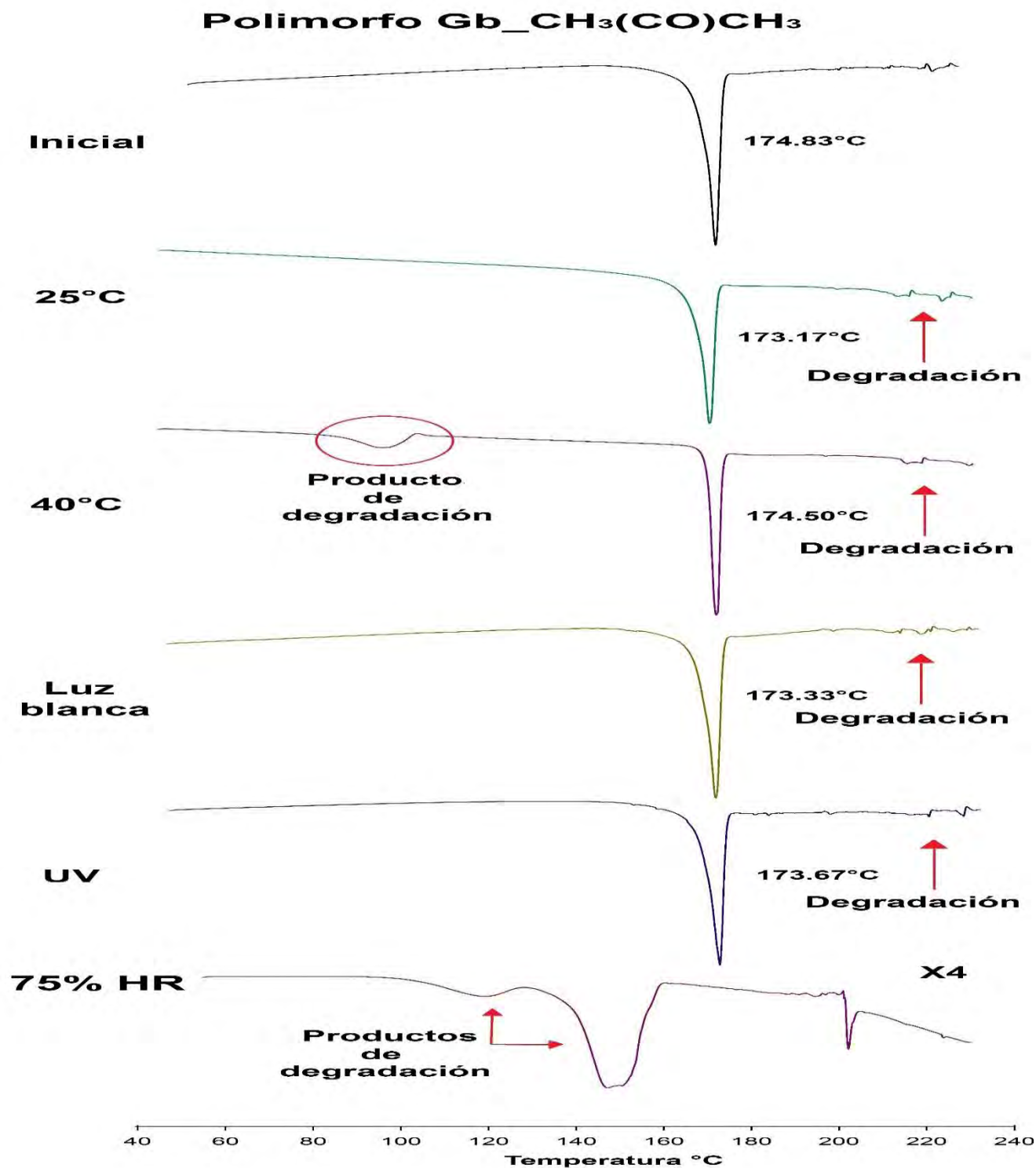


Figura 18. Comparación de los termogramas obtenidos por CDB del polimorfo Gb_CH₃(CO)CH₃, bajo diferentes condiciones de estrés.

En el caso del polimorfo Gb_CHCl₃ (figura 19), son observables señales de degradación en las condiciones de luz ultravioleta, 25°C y 40°C, donde, para estas dos últimas se pierde la señal de desolvatación que presentaba inicialmente, corroborando lo dicho anteriormente, que al ser sometido a condiciones de estrés, éste se reestructuraría, desolvatándose para así tratar de formar una estructura cristalina termodinámicamente más estable. Sin embargo, en el caso de las condiciones de luz dicha señal es observable, pero la forma inicial ya no corresponde, debido a que en el caso de luz ultravioleta la señal se alarga y ensancha, esto último también pasa en el termograma de la condición de luz blanca, dichas señales presentan máximos a los 101.67°C y 100.50 °C, máximos que concuerdan con lo indicado en la literatura, respecto a los productos de degradación de glibenclamida²⁷, lo que permite inferir la formación del mismo producto de degradación que presenta el polimorfo Gb_CH₃(CO)CH₃ a 40°C (figura 17). Mientras que en la condición de 75% de HR, la endoterma característica de dicho polimorfo desaparece, al igual que en el caso de los otros dos polimorfos.

Sin embargo, se debe destacar que en las condiciones de temperatura y luz, donde si bien se presentaron señales de degradación, la endoterma característica de los tres polimorfos se mantuvo con variaciones menores al 1% de su punto de fusión original. Lo cual no ocurrió en el caso de la condición de humedad relativa, donde la endoterma característica de los tres cristales ya no fue observable. Sin embargo, se presentaron señales en un rango de 120°C a 150°C, atribuibles a la formación de productos de degradación²⁷ (Figura 15B), siendo la hidrólisis la condición que más afecta a la molécula de glibenclamida.

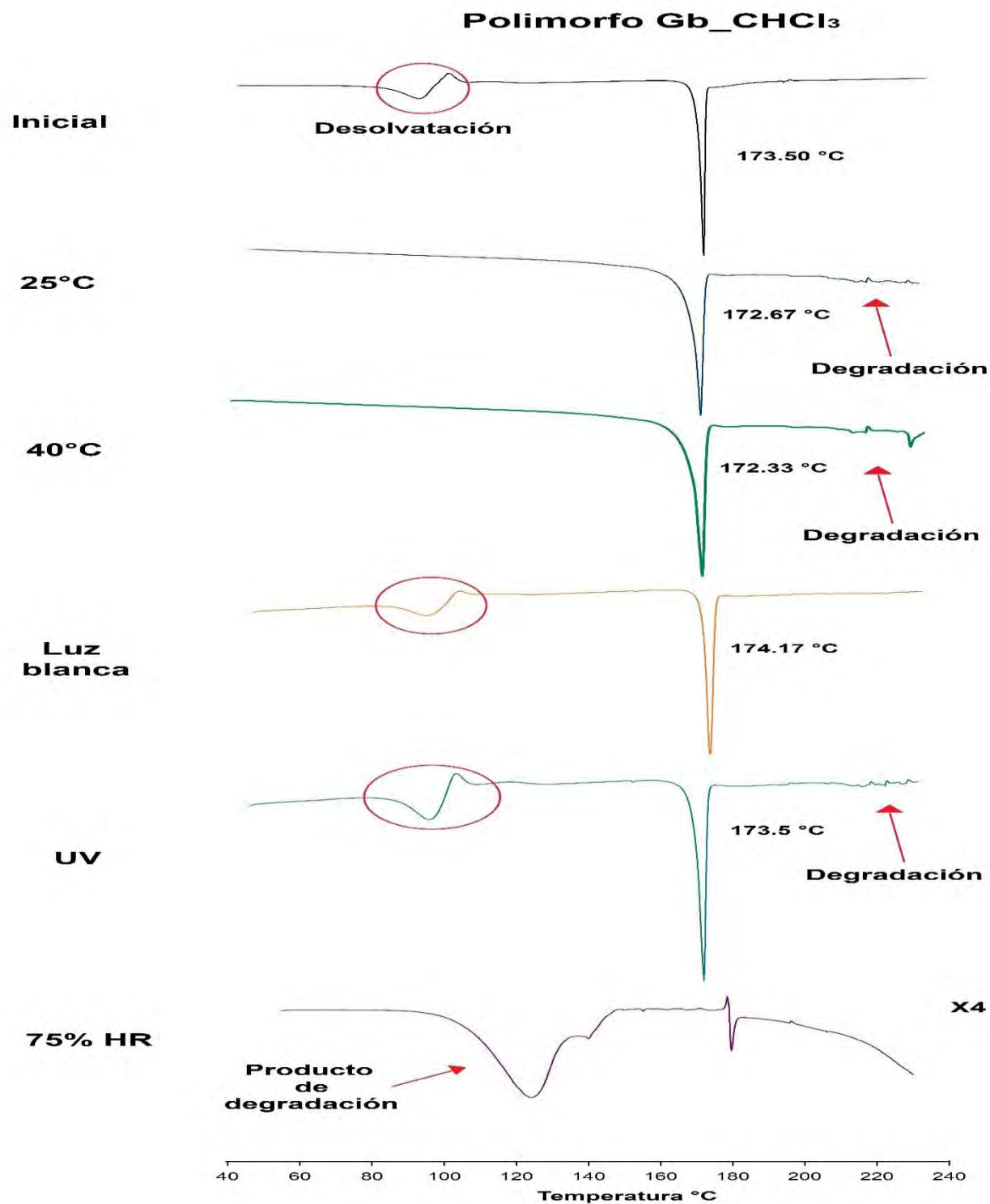


Figura 19. Comparación de los termogramas obtenidos por CDB del polimorfo Gb₃CHCl₃, bajo diferentes condiciones de estrés.

7.3.3 Análisis de Espectroscopia de absorción de Infrarrojo

En las figuras 20, 21 y 22 se muestran los espectros obtenidos de los cristales en las diferentes condiciones de estrés, donde se puede observar cambios en cuanto a la forma e intensidad de los picos, siendo la señal con mayor cambio las marcadas entre los 3500 cm^{-1} y 2000 cm^{-1} , intervalo donde se encuentra identificado el enlace N-H perteneciente a la sulfonilurea. En el caso del polimorfo Gb_MP y Gb_CH₃(CO)CH₃ en la condición de 40°C (figura 20b y 21b) las señales representativas de este enlace empieza a perder su forma característica indicando principios de degradación, en el caso del polimorfo Gb_CHCl₃ dicha señal sufre cambios en las condiciones de 25°C, luz blanca y luz ultravioleta(figura 22c, 22d y 22e).

De todas las condiciones de estrés manejadas en el estudio, la que dio mayores cambios en los análisis fue 75 % de humedad relativa, en el caso de espectroscopia de infrarrojo se puede observar que los tres cristales en esta condición sufrieron la ruptura del enlace N-H de la sulfonilurea. Sin embargo, en la región de la huella dactilar, que es la zona de identidad o desigualdad entre dos espectros, existieron cambios en los tres cristales, mostrando que lo obtenido en esa condición ya no se trataba del fármaco de interés (glibenclamida), si no de algún producto de degradación, obtenido por hidrólisis. Con lo plasmado en los espectros de infrarrojo, se observa que la parte de la molécula, con mayor riesgo de sufrir cambios, es la sulfonilurea, dado a que este es el enlace más débil de la molécula, debido a que el grupo sulfonilo es fuertemente atrayente de electrones, lo que provoca que el carbonilo de la urea sea mayormente reactivo, y como resultado el resto de la urea se vuelve más débil, a comparación de la amida también presente en la molécula³⁹.

Estos datos se corroboran con los termogramas de humedad relativa, donde se observa la pérdida de la endoterma característica de los polimorfos y con las valoraciones de los cristales, ya que al existir presencia de productos de degradación, la concentración del fármaco se vería disminuida.

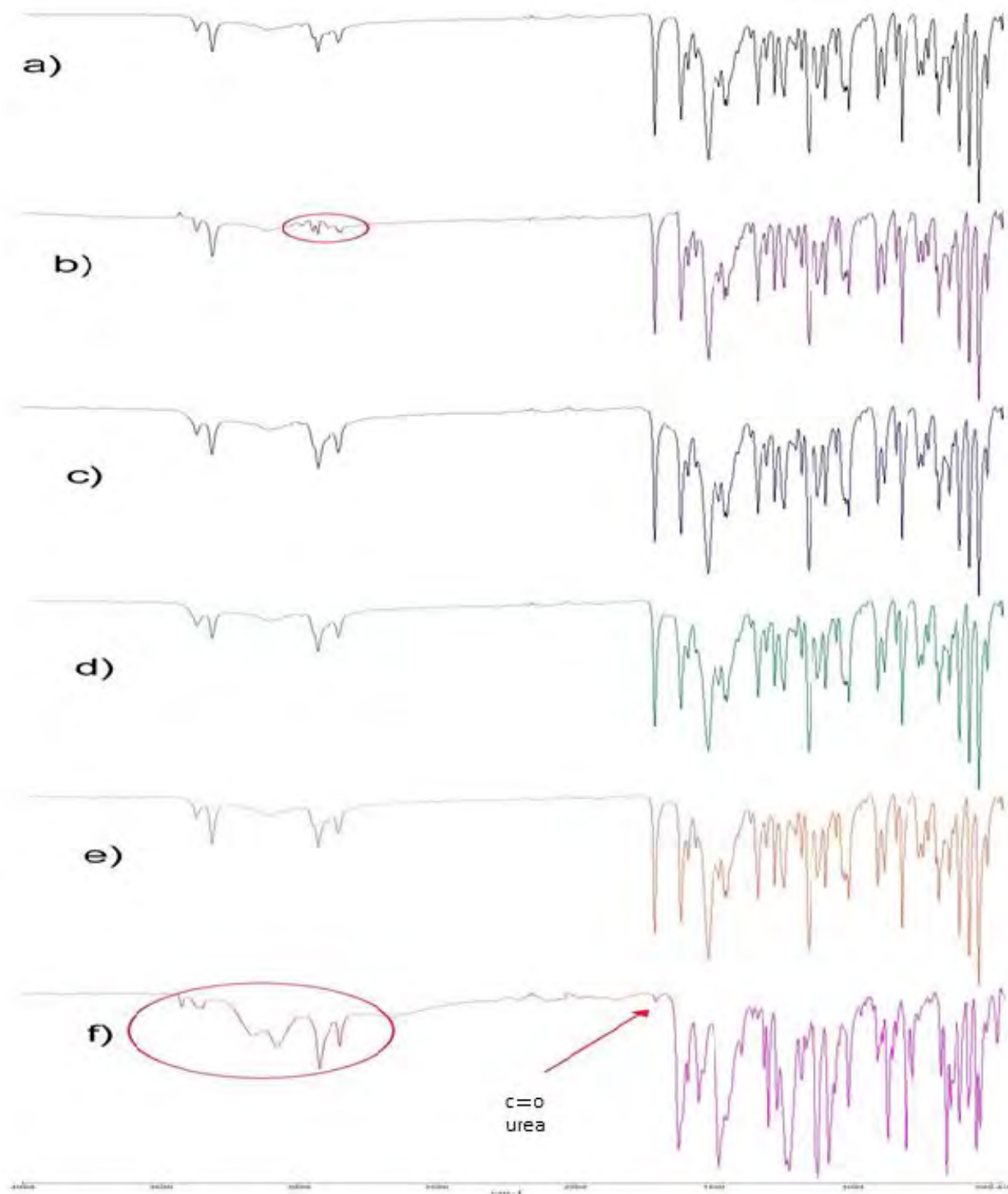


Figura 20 Espectro de Infrarrojo del polimorfo Gb_MP (a), bajo condiciones de temperatura siendo (b) 40°C, (c) 25°C, condiciones de luz blanca (d), luz ultravioleta (e) y 75% humedad relativa (f).

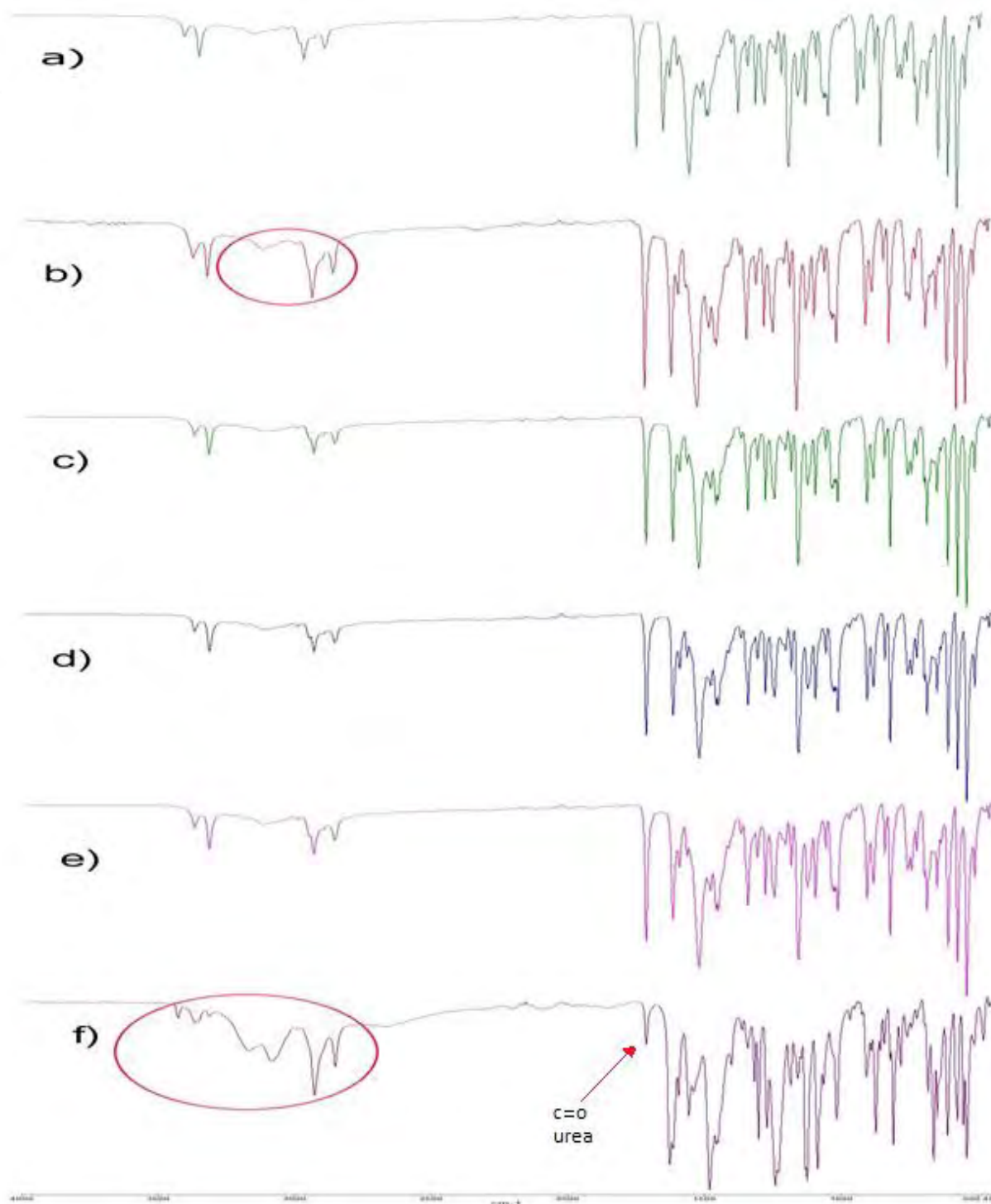


Figura 21. Espectro de Infrarrojo del polimorfo Gb-CH₃(CO)CH₃ (a), bajo condiciones de temperatura siendo (b) 40°C, (c) 25°C, condiciones de luz blanca (d), luz ultravioleta (e) y 75% humedad relativa (f).

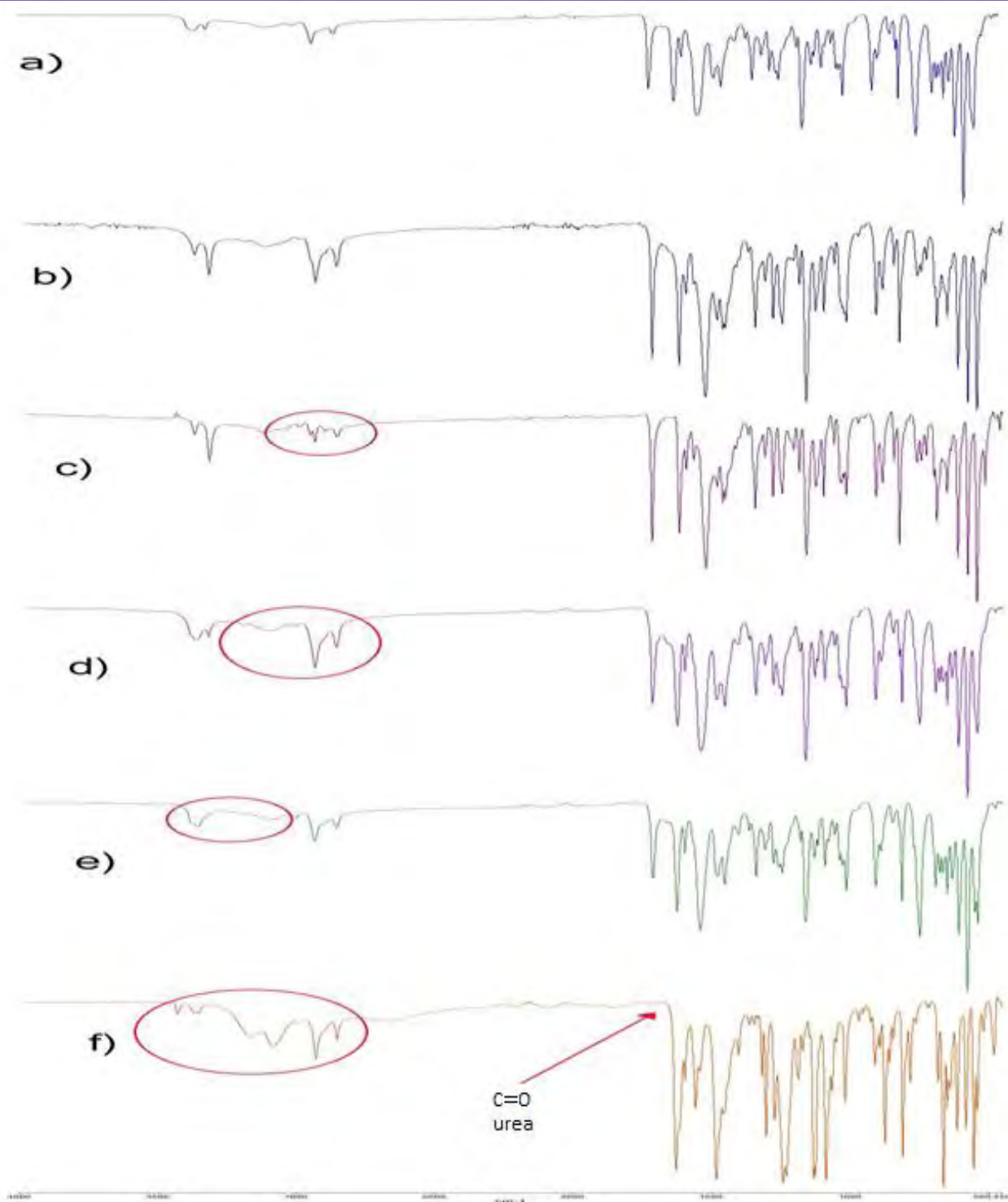


Figura 22. Espectro de Infrarrojo del polimorfo Gb₂·CHCl₃ (a), bajo condiciones de temperatura siendo (b) 40°C, (c) 25°C, (d) condiciones de luz blanca, (e) luz ultravioleta y 75% humedad relativa (f).

7.3.4 Análisis Cromatográfico

Las valoraciones se realizaron semanalmente como un control que permitiera verificar que lo mostrado en los otros análisis era correcto, ya que al existir señales de productos de degradación, debería existir una disminución en la concentración de glibenclamida, conociendo que el método utilizado se encuentra validado, se puede corroborar que lo mostrado en los demás análisis coincide con las valoraciones, ya que en el caso de los tres cristales utilizados, conforme pasaba el tiempo la concentración obtenida era menor, como se muestra en las graficas de las páginas 64 a la 66.

En el caso del polimorfo Gb_CHCl₃, presentó la menor resistencia al estrés térmico y químico, mostrando ser más susceptible a la degradación en comparación a los otros dos, esto para las condiciones de luz blanca, UV, humedad y 25°C, donde se obtuvieron pérdidas de contenido mayor. Sin embargo, en el caso de 40°C fue el que menos degradación tuvo, esto puede deberse a que este cristal presenta puentes de hidrógeno intramoleculares, lo que lo hace más susceptible a hidrolizarse; al estar a una temperatura mayor, el ambiente en el que se encuentra presentaría menor humedad que en el caso de las demás condiciones, provocando que este cristal sea menos susceptible a degradarse.

El polimorfo Gb_CH₃(CO)CH₃ mostro ser susceptible a degradación térmica como se puede observar en la grafica de la condición de 40 °C (figura 25), mostrando una pérdida de contenido mayor en comparación con las demás condiciones, exceptuando humedad, resultados que coinciden con lo obtenido en los espectros de infrarrojo.

Y por último el polimorfo Gb_MP, fue el que mostro mayor resistencia al estrés de los tres cristales, exceptuando la condición de 40°C y luz ultravioleta (figura 25 y 26), donde mostro ser más susceptible a degradación, que en las demás condiciones.

Sin embargo, la condición de estrés en la cual los tres cristales presentaron mayor degradación, fue en 75 % de humedad relativa (figura 23), donde desde la primer semana de estudio ya se había disminuido casi el 50% de su contenido inicial, lo cual concuerda con lo mostrado en la estabilidad en solución acida y en lo marcado en la literatura, donde se menciona que la glibenclamida presenta grupos funcionales susceptibles a hidrolizarse²⁷, dando paso a productos de degradación como se puede corroborar en los espectros de infrarrojo y en los termogramas mostrados anteriormente.

Algo que se debe destacar es el comportamiento de los polimorfos Gb_MP y Gb_CH₃(CO)CH₃, en la condición de luz ultravioleta, donde como se puede observar en la grafica (figura 26), que el polimorfo Gb_MP, llega a tener un comportamiento como el polimorfo Gb_CH₃(CO)CH₃, lo cual contradice lo ya establecido, en cuanto a las relaciones termodinámicas, donde dichos cristales presentan una relación monotrópica, lo cual significa que solo una de las formas polimórficas es estable, en este caso el polimorfo Gb_MP, y que cualquier otro polimorfo que se forme acabará convirtiéndose en la forma estable³⁰, siendo este el polimorfo Gb_CH₃(CO)CH₃, esto en condiciones de temperatura a una presión constante, como se ve plasmado en la figura 26, el polimorfo Gb_MP llega a comportarse como un polimorfo menos estable, lo cual permite inferir que las reglas en cuanto a las relaciones termodinámicas, podrían no aplicar en condiciones de luz.

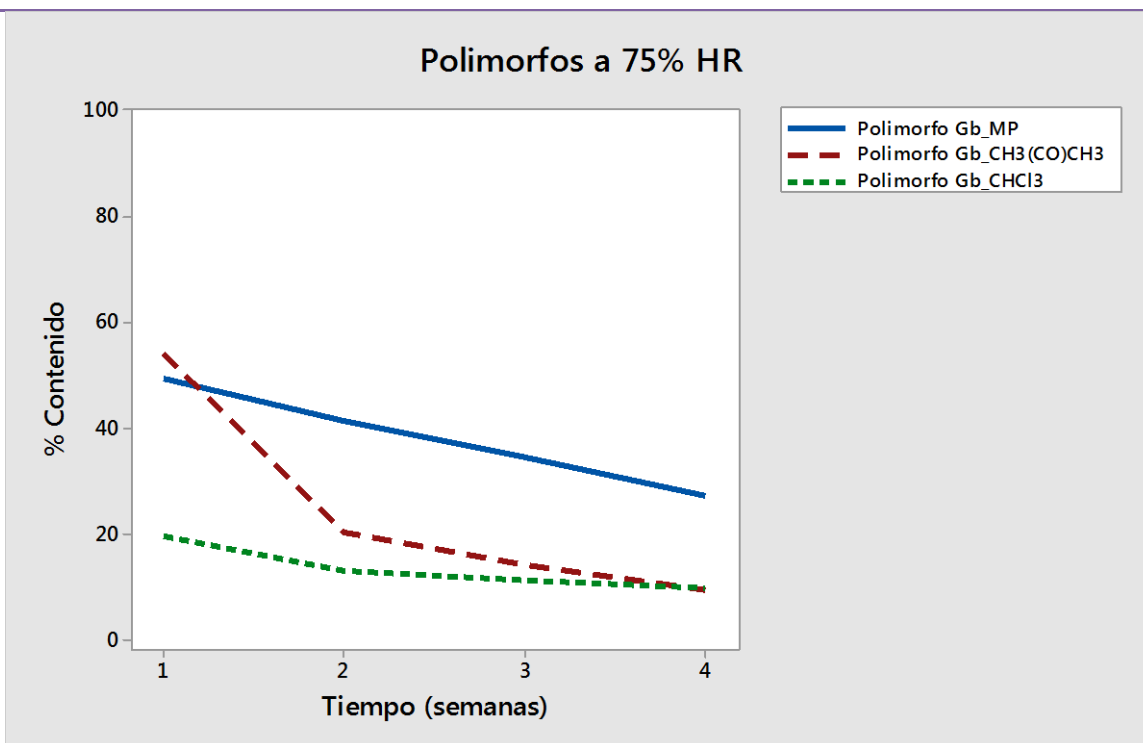


Figura 23. Valoraciones de los tres polimorfos en estudio en la condición de 75% de HR, durante 4 semanas

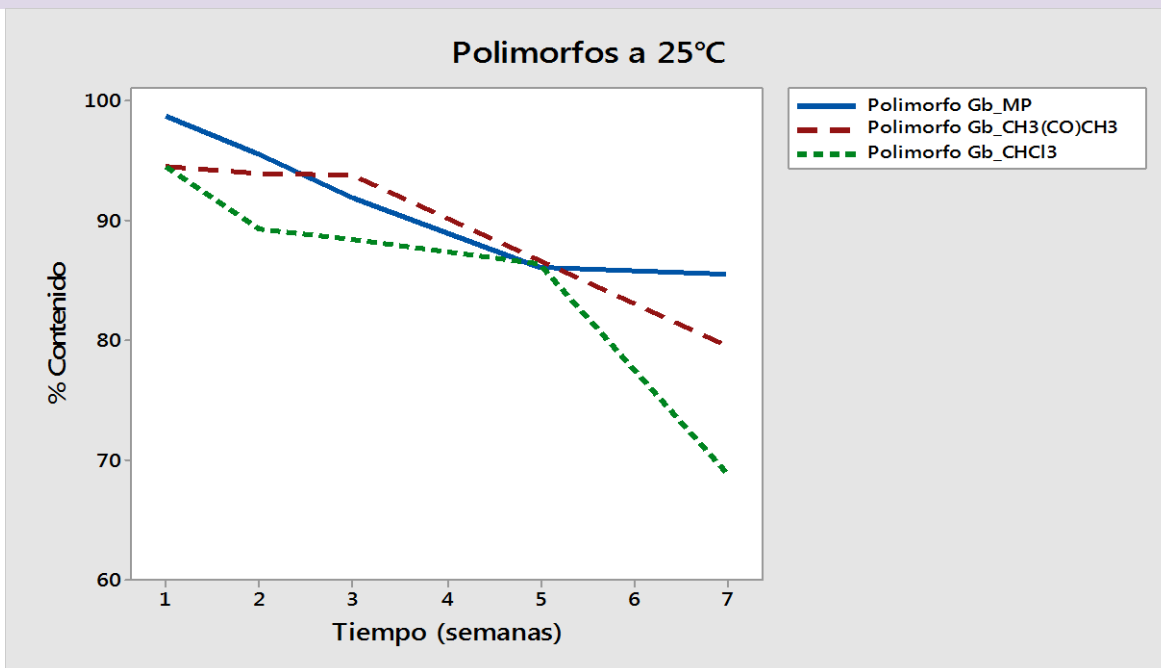


Figura 24. Valoraciones de los tres polimorfos en estudio en la condición de 25°C, durante 7 semanas

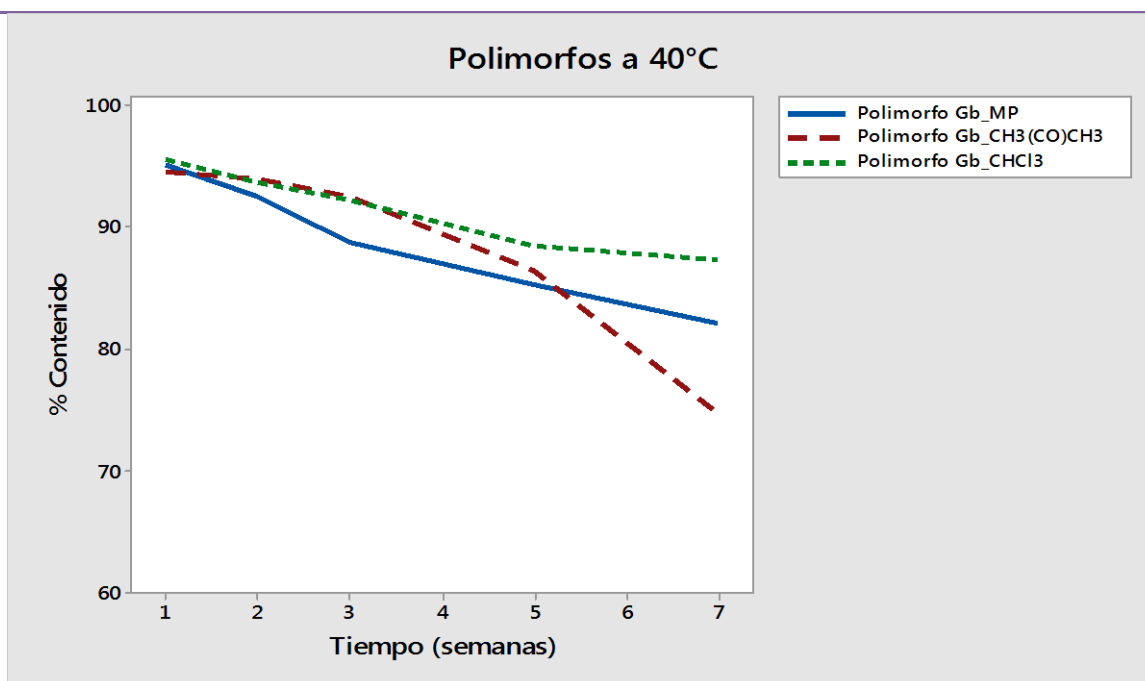


Figura 25. Valoraciones de los tres polimorfos en estudio en la condición de 40°C, durante 7 semanas

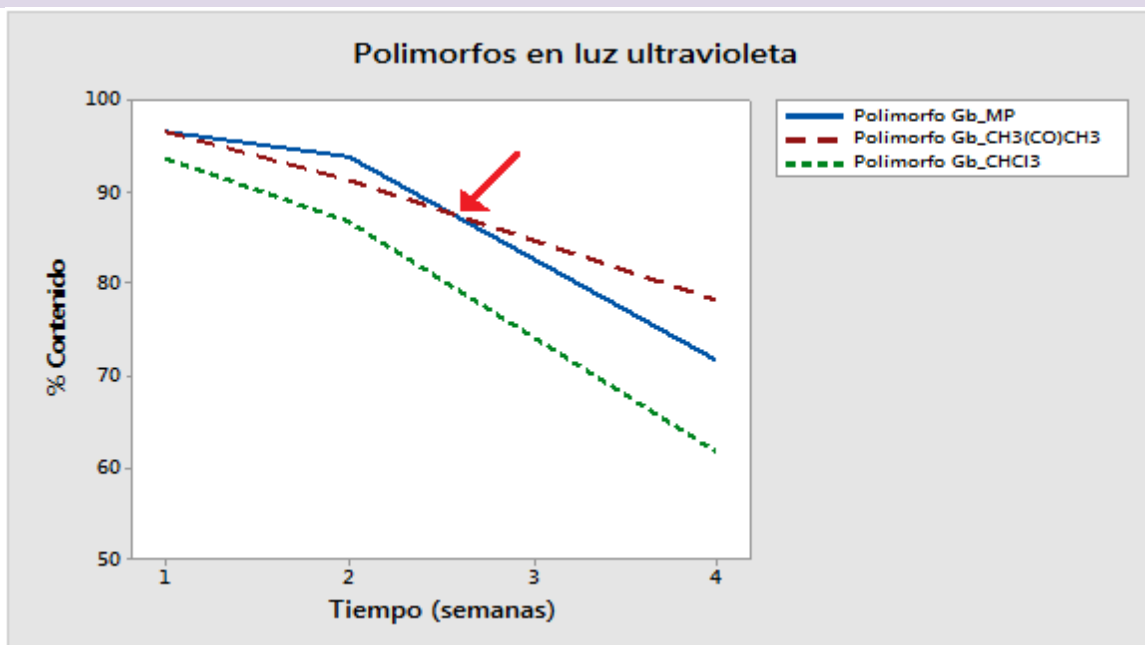


Figura 26. Valoraciones de los tres polimorfos en estudio en la condición de Luz UV, durante 4 semanas

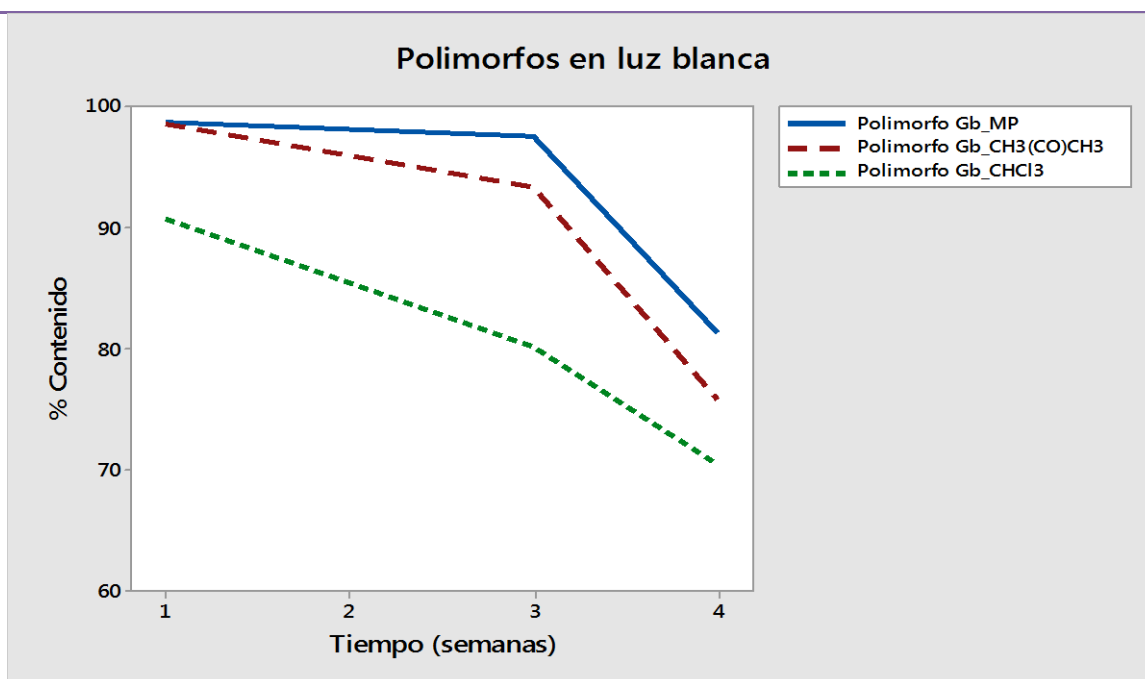


Figura 27. Valoraciones de los tres polimorfos en estudio en la condición de Luz blanca, durante 4 semanas

En la tabla 8 se muestra un resumen de la resistencia al estrés térmico y químico de los cristales de glibenclamida, donde se puede observar que el polimorfo Gb_CHCl₃ obtenido a través de cloroformo, fue más susceptible a la degradación, convirtiéndolo en el que presenta menor resistencia al estrés térmico y químico, seguido del polimorfo Gb_CH₃(CO)CH₃ obtenido a través de acetona y por último el polimorfo Gb_MP encontrado en la materia prima comercial. Lo cual se debe a que la estructura de cada uno difiere entre ellos, permitiéndonos inferir que el polimorfo Gb_CHCl₃ al presentar formación de puentes de hidrógeno es más susceptible a la degradación, aunado a que contiene cantidades de disolventes atrapado en su estructura cristalina, lo que lo vuelve menos estable.

Sin embargo, dicho polimorfo presenta una mayor solubilidad y tiene una mayor capacidad de incorporación en matrices sol- gel, como se ha visto en estudios recientes en el laboratorio⁴⁰ convirtiéndolo en una buena opción, para ser formulado en un medicamento a pesar de su baja resistencia al estrés térmico y químico, ya que mejora su solubilidad y podría ayudar a disminuir la biodisponibilidad errática que presenta la glibenclámda, siempre y cuando se tengan las condiciones de temperatura, luz y humedad apropiadas dentro de su línea de producción, ya que como se mostro anteriormente, la condición en la cual los cristales sufrieron mayores cambios, fue la de humedad relativa, donde si no se toman las medidas necesarias el fármaco podría degradarse a más del 50% de su concentración,

Tabla 8. Resumen de los resultados obtenidos de los tres cristales bajo condiciones de estrés.

Condición	Polimorfo		
	Gb_MP	Gb_CH ₃ (CO)CH ₃	Gb_CHCl ₃
40 °C	*	+	-
25 °C	-	*	+
Luz Ultravioleta	*	-	+
Luz Blanca	-	*	+
75 % de HR	-	+	*

• Donde + representa mayor degradación , * degradación intermedia entre los cristales y – menor degradación

8. Conclusiones

Se determinó la resistencia al estrés térmico y químico de los polimorfos de glibenclamida, mostrando ser más susceptible a hidrólisis, donde el grado de degradación de cada polimorfo, se vio modificado de acuerdo a su acomodo molecular, mostrando ser más resistente al estrés térmico y químico el polimorfo Gb_MP, seguido del polimorfo Gb_CH₃(CO)CH₃ y por último el polimorfo Gb_CHCl₃. Estableciendo también la relación termodinámica entre los polimorfos, mostrando ser sistemas monotrópicos los pares Gb_MP - Gb_CH₃(CO)CH₃ y Gb_MP - Gb_CHCl₃ y enantiotrópico el par Gb_CH₃(CO)CH₃ - Gb_CHCl₃.

Concluyendo así que las diferencias que existen entre los polimorfos, si afectan sus atributos de calidad, como es el caso del polimorfo Gb_CHCl₃, que a pesar de contar con menor resistencia al estrés térmico y químico, presenta mejores características para uso farmacéutico.

9. Referencias Bibliográficas

1. Vademecum. Iqb.es: Gliburida. [En línea]; 2016. [Acceso 2016 Feb 12]. Disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/g006.htm>
2. National Institutes of Health. PubChem: Glyburide [Online]. 2016 [cited 2016 Feb 12] Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3488#section=Drug-and-Medication-Information>
3. Royal Society of Chemistry. ChemSpider: Glibenclamide. [Online]; 2016. [cited 2016 Feb 12]. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3368.html?rid=8edf5595-e0cf-46f1-95a5-efdd5d367e75>
4. Panagopoulou-Kaplain A, Malamataris S. Preparation and Characterization of a New Insoluble Polymorphic Form of Glibenclamide. *Int. J. Pharm.* 2000; 195(1): 239-246.
5. Rodríguez MS, Luna J, Carlucci A, Bregni C. Relación de Estabilidad Termodinámica Relativa entre Polimorfos de Glibenclamida. *Acta Farm Bonaerense.* 2004; 23(2); 169-175.
6. Genaro R. Alfonso. Remington Farmacia. 20^a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2003.
7. Zhang G, Zhou D. Crystalline and Amorphous Solids. In Qiu Y, Chen Y, Zhang G, Liu L, Porter W, editors. *Developing Solid Oral Dosage Forms.* United States: Elsevier American Press; 2009.
8. Lori H, Kenneth M. Physics of Amorphous Solid. *Indian J Med Res Pharm Sci.* 2004; 93, 3–12.

9. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Guidance for Industry ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism. United States: 2007.
10. Grases F, Costa A, Sohnel O, *Cristalización en Disolución conceptos básicos*. España: Reverte S.A; 2000.
11. Ymén I. *Introduction to the Solid State – Physical Properties and Processes*. In Storey RA, Ymén I, editors. *Solid State Characterization of Pharmaceuticals*. United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2011
12. Bernstein J. *Polymorphism in Molecular Crystals*. United State; Oxford University Press; 2002.
13. Sánchez E, Jung H, Yépez M, Hernández V. Relevancia del polimorfismo en el área farmacéutica. *Rev.MexCienc Farm*. 2007; 38; (2): 57-76.
14. Brittain G. Harry. *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*. 2nded. New York: Informa healthcare; 2009.
15. Rodríguez-Spong B.et al. *General Principles of Pharmaceutical Solid Polymorphism: a Supramolecular Perspective*. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004. 56, 241-251.
16. Huang J. *Crystallization in Polymorphic Systems*. UMI Microform; 2008
17. Georgia Manika C. *Aripiprazole Polymorphism and Methods of Identification and Quantification in Tablets*. [Thesis Master of Science]. Patras. University of Patras School of Health Sciences, Department of Pharmacy; 2014.
18. Martín A, Molina E. Polimorfismo farmacéutico repercusiones industriales y farmacocinéticas. *OFFARM*. 2006; 25 (8): 94 -100.

19. González M., Hernández J., Martínez K., Meza E. Síntesis y Caracterización de Catalizadores Sol Gel. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Programa De Química, VII Semestre
20. Guidance for Industry Q1A (R2), Stability Testing of Drug Substances and Products. 2 Revisions. November 2003
21. Yoshioka S, Estella J. V. Stability of Drugs and Dosage Forms. New York: Kluwer Academic Publishers; 2002.
22. Blessy M, Ruchi D.P, Prajesh N.P, Agrawal Y.K. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review. J Pharm Anal. 2013 Jan 24; 4(3): 159-165.
23. Ahuja S., Scypinski S. Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. 3 vols. United States of America: Academic Press; 2001.
24. Huynh- Ba K. Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development. New York: Springer; 2009.
25. Haleblan J., McCrone W. Pharmaceutical Applications of Polymorphism. J PharmSci. Ago 1969. 58 (8); 911-929.
26. Gill P, Moghadom T, Ranjabar B. Differential Scanning Calorimetry Techniques Applications in Biology and Nanoscience. J Biomol Tech. 2010 21(4):167-193.
27. Bansal G, Singh M, Chand K, Singh S, Ultraviolet-Photodiode Array and High-Performance Liquid Chromatographic/Mass Spectrometric Studies on Forced Degradation Behavior of Glibenclamide and Development of a Validated Stability-Indicating Method. J AOAC Int. 2008 Jul., 91 (4); 709-719.
28. Cortes F, Martínez P, Albeiro H. Fundamentos de Cristalografía. Colombia. Elizcom; 2006.

29. Lee Eun. A practical guide to pharmaceutical polymorph screening & selection. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2014 Aug. 9 (4); 163-175.
30. Aulton M., Farmacia, la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. 2^{da} ed. Elsevier España, S.A. 2003.
31. Fundamentos de Química Orgánica. Tema 9. Determinación de estructuras mediante métodos físicos. [En línea]. [Acceso 2017 Mar 29]. Disponible en: <http://www.sinorg.uji.es/Docencia/FUNDQO/TEMA9FQO.pdf>.
32. WebSpectra [homepage en Internet]. Cambridge Isotope Laboratories: UCLA Department of Chemistry and Biochemistry; [Actualizada en Jun de 2000; acceso 30 Mar 2017]. Disponible en: <https://webspectra.chem.ucla.edu/index.html>
33. Serrano J. Curso. Instrumentación y métodos de análisis químico. Espectroscopia Infrarroja Fundamentos. [En línea]; 2017. Disponible en: https://www.upct.es/~minaeees/espectroscopia_infrarroja.pdf.
34. Chemistry. LibreTexts. [homepage online]. Infrared: Interpretation. [Last update 7 Jun 2015; cited 29 Mar 2017]. Available from: https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/Infrared%3A_Interpretation.
35. Nyman J, Graeme M, Static and lattice vibrational energy differences between polymorphs. Royal Society Chemistry. 2015, 17: 5154-5165.
36. Alsante K, Ando A, Brown R, Ensing J, Hatajik T, Kong W, Tsuda Yoshiko. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. Adv Drug Deliv Rev. 2007 Jan 10, 59 (1): 29-37.

37. Baertschi S, Alsante K, Reed R. Pharmaceutical Stress Testing Predicting Drug Degradation. 2da ed. New York, Informa Healthcare; 2011
38. Rehder S., Sakmann A., Rades T., Leopold C. Thermal degradation of amorphous glibenclamida. Eur J Pharm Biopharm. 2011 Sept 2; 80(2012): 203-208.
39. Li M., Organic Chemistry of Drug Degradation. United Kingdom, The Royal Society of Chemistry; 2102.
40. Vázquez J. Ignacio. Evaluación del efecto de la solubilidad de polimorfos de glibenclamida en su capacidad de incorporación en implantes fabricados por la técnica Sol-Gel.[tesis]. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. 2016