



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

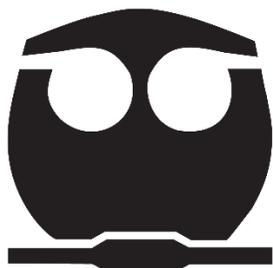
TESIS

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE SOLUBILIDAD  
DE LAS FORMAS SÓLIDAS BINARIAS: METFORMINA-  
ATORVASTATINA Y  
METFORMINA-ROSUVASTATINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

PRESENTA

DIANA LAURA ZERRANO VARGAS



CIUDAD DE MÉXICO, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

PRESIDENTE: FUENTES NORIEGA INÉS

VOCAL: GONZÁLEZ TEPALE MA. ROSA

SECRETARIO: GERMÁN ACACIO JUAN MANUEL

1er SUPLENTE: MORALES MORALES DAVID

2do SUPLENTE: DORAZCO GONZÁLEZ ALEJANDRO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: RED DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN. INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN. VASCO DE QUIROGA NO.15, COL. SECCIÓN XVI DELEGACIÓN TLALPAN, C.P. 14000, CIUDAD DE MÉXICO



**INCMNSZ**

ASESOR DEL TEMA:

DR. JUAN MANUEL GERMÁN ACACIO

ASESOR TÉCNICO:

DR. JOSÉ CARLOS PÁEZ FRANCO

SUSTENTANTE

DIANA LAURA ZERRANO VARGAS

## ÍNDICE

### 1. ANTECEDENTES

- 1.1 SÍNDROME METABÓLICO...página 4
- 1.2 TIPOS DE DIABETES MIELLITUS...página 6
- 1.3 DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES...página 8
- 1.4 COMPLICACIONES CRÓNICAS DE LA DIABETES... página 8
- 1.5 TRATAMIENTO DE LA DIABETES... página 9
- 1.6 SOLUBILIDAD DE LOS FÁRMACOS... página 12
- 1.7 CLASIFICACIÓN DE FÁRMACOS POR PROPIEDADES DE SOLUBILIDAD Y PERMEABILIDAD... página 13
- 1.8 TIPOS DE FASES SÓLIDAS OBTENIDAS DE LA COCRISTALIZACIÓN... página 14
- 1.9 DISOLUCIÓN DE LOS FÁRMACOS... página 16
- 1.10 CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACOS EN UNA FASE SÓLIDA... página 18
- 1.11 TÉCNICAS DE SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANALITOS... página 18
  - 1.11.1 FLUORESCENCIA... página 19
  - 1.11.2 ESPECTROMETRÍA... página 19
    - 1.11.2.1 FUNDAMENTO DE LA ESPECTROMETRÍA UV-VISIBLE (LEY DE LAMBERT-BEER) ... página 20
    - 1.11.3 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)... página 21
- 1.12 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS... página 22
- 1.13 CARACTERIZACIÓN DE LAS FASES SÓLIDAS... página 24

### 2. JUSTIFICACIÓN... página 26

### 3. OBJETIVOS ... página 27

### 4. HIPÓTESIS... página 27

### 5. REACTIVOS... página 27

### 6. METODOLOGÍA... página 28

- 6.1 FLUORESCENCIA... página 28
- 6.2 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) ... página 29
  - 6.2.1 PRUEBA DE INFLUENCIA DEL FILTRO... página 30
  - 6.2.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO... página 30
- 6.3 PREPARACIÓN DE MEZCLAS FÍSICAS METFORMINA-ATORVASTATINA Y METFORMINA- ROSUVASTATINA... página 33
- 6.4 PRUEBA DE SOLUBILIDAD... página 35

- 7. RESULTADOS... página 36
  - 7.1 FLUORESCENCIA... página 36
  - 7.2 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) ... página 38
    - 7.2.1 PRUEBA DE INFLUENCIA DEL FILTRO... página 39
    - 7.2.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO... página 39
  - 7.3 CARACTERIZACIÓN... página 44
    - 7.3.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO... página 44
    - 7.3.2 DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVOS (DRXP) ... página 47
  - 7.4 PRUEBA DE SOLUBILIDAD... página 52
- 8. CONCLUSIONES... página 56
- 9. REFERENCIAS... página 57

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 SÍNDROME METABÓLICO

El Síndrome Metabólico (SM), de acuerdo con su definición, es un conjunto de factores de riesgo que pueden ser categorizados en cinco grupos: dislipidemia aterogénica, presión arterial elevada, disglucemia, estado protrombótico y estado proinflamatorio. La suma de estos factores incrementa de 2 a 5 veces el riesgo de desarrollar diabetes y de 1 a 2 veces el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular además de otras comorbilidades como obesidad, hipertensión y dislipidemia por lo que su diagnóstico temprano brinda una gran oportunidad de establecer medidas terapéuticas que ayuden a prevenirlos. Los factores de riesgo con mayor contribución para desarrollar SM en adultos son el sedentarismo, la alimentación, el perímetro de circunferencia abdominal, el índice de masa corporal y la presencia de antecedentes familiares [1].

El conocer el SM desde sus bases moleculares hasta su presentación clínica permite un adecuado tratamiento, pero sobre todo prevención y así retrasar la aparición de otras comorbilidades y sus complicaciones secundarias, mejorando la calidad de vida del paciente.

Actualmente existen diversos intentos para homologar los criterios para el diagnóstico del síndrome metabólico. Uno de los más comunes es el que se presenta en la siguiente tabla [1].

*Tabla 1. Criterios para diagnóstico de Síndrome Metabólico en población latinoamericana. Adaptado de la referencia 1*

<b>Criterio diagnóstico</b>	<b>Obesidad (Abdominal)</b>	<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	<b>HDL (mg/dL)</b>	<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	<b>Glucosa (mg/dL)</b>
<b>≥3 componentes</b>	≥94 H ≥ 88 M	≥ 150 o Tratamiento para triglicéridos	<40 H <50 M	≥130/85 o Tratamiento antihipertensivo	≥100 o Diagnóstico de DM2 o Tratamiento DM2

*H= Hombres, M= Mujeres, HDL= High Density Lipoprotein o Lipoproteínas de alta densidad.*

Uno de los padecimientos más comunes dentro del SM es la diabetes mellitus (DM). Se trata de una enfermedad metabólica, que se caracteriza por presentar elevados niveles de glucosa en sangre, debido a la alteración absoluta o relativa de la secreción de insulina y/o a una alteración de la acción de dicha hormona en los tejidos insulino-dependientes [2]. Es la alteración metabólica más común entre los seres humanos, siendo una enfermedad extremadamente seria, causa de incapacidad y muerte. Los síntomas más característicos son polidipsia, polifagia, poliuria y visión borrosa, teniendo además una mayor predisposición para padecer infecciones. El mal control de la diabetes puede ocasionar daños vasculares (micro y macroangiopatía) y neurológicos importantes a largo plazo [3]; es la primera causa de ceguera, insuficiencia renal, amputaciones no debidas a traumas e incapacidad prematura y se encuentra entre las diez primeras causas de hospitalización y solicitud de atención médica en Latinoamérica [2].

Tabla 2. Prevalencia de diabetes tipo 2 en países de Latinoamérica. Adaptado de la referencia [2]

País	No. Casos (20-79 años)	Prevalencia de acuerdo con la IDF*	Muertes/año (20-79 años)	Personas no diagnosticadas
Argentina	1 757 500	6.2	15 545	620 800
Bolivia	391 000	6.2	4 403	108 600
Brasil	1 265 800	8.7	108 587	5 734 300
Chile	1 199 800	9.3	7 103	258 100
Colombia	2 671 400	8.1	17 037	957 300
Costa rica	319 100	9.5	1 711	114 400
Cuba	397 600	10.68	7 060	321 700
Ecuador	554 500	5.5	3 907	198 700
El Salvador	332 700	8.7	2 926	119 200
Guyana Francesa	13 100	8.1	-	4 700
Guatemala	752 700	8.4	7 709	269 700
Honduras	285 800	6.0	1 818	102 400
México	12 030 000	14.8	85 931	4 504 100
Nicaragua	373 400	10.0	2 925	133 800
Panamá	215 900	8.5	1 318	77 400
Paraguay	298 00	7.4	2 654	106 800
Perú	1 130 800	5.6	7 129	452 300
Puerto Rico	400 600	15.4	-	124 000
República Dominicana	520 800	8.1	6 541	186 600
Uruguay	152 800	6.6	1 095	47 300
Venezuela	1 311 400	6.6	10 241	469 900

\*IDF: International Diabetes Federation

La posibilidad de identificar la etapa en la que se encuentra la persona con DM, facilita las estrategias de manejo. Las dos etapas son:

A. Normoglucemia. Cuando los niveles de glucemia son normales pero los procesos fisiopatológicos que conducen a DM ya han comenzado.

B. Hiperglucemia. Cuando los niveles de glucemia superan el límite normal. Esta etapa se subdivide en:

1. Regulación alterada de la glucosa (incluye la glucemia de ayuno alterada y la intolerancia a la glucosa).



Tabla 4. Algunas causas de diabetes mellitus poco comunes. Adaptado de la referencia 1

<b>Causa</b>	<b>Enfermedades</b>
<b>Defectos genéticos de la función de las células beta</b>	<i>Mutaciones en diversos genes.</i>
<b>Defectos genéticos de la acción de la insulina</b>	<i>Resistencia a la insulina Tipo A, leuprechaunismo, síndrome de Rabson-Mendenhall, diabetes lipatrófica y otros</i>
<b>Enfermedades del páncreas exocrino</b>	<i>Pancreatitis, trauma del páncreas, pancreatectomía, neoplasia de páncreas, fibrosis quística, hemocromatosis, pancreopatía fibrocalculosa y otros</i>
<b>Endocrinopatías</b>	<i>Acromegalia, síndrome de Cushing, glaucoma, feocromocitoma, hipertiroidismo, somatostinoma, aldosteronoma y otros.</i>
<b>Inducida por fármacos o químicos</b>	<i>Glucocorticoides, hormonas tipoideas, diazóxido, agonistas beta-adrenérgicos, tiazidas, fenitoína, alfa-interferón, antirretrovirales, inmunosupresores, otros.</i>
<b>Infecciones</b>	<i>Rubeola congénita, citomegalovirus y otros</i>
<b>Formas poco comunes de diabetes mediada inmunológicamente</b>	<i>Síndrome del “hombre rígido” (“stiff-man syndrome”), anticuerpos contra el receptor de la insulina y otros.</i>
<b>Otros síndromes genéticos algunas veces asociados con diabetes</b>	<i>Síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, síndrome de Turner, síndrome de Wolfram, ataxia de Friderich, Huntington, síndrome de Lawrence Moon Bield, distrofia miotónica, porfiria, síndrome de Prader Willi y otros.</i>

En la DM1 las células beta se destruyen, lo que conduce a la deficiencia absoluta de insulina. Sus primeras manifestaciones clínicas suelen ocurrir alrededor de la pubertad, cuando ya la función se ha perdido en alto grado y la insulino terapia es necesaria para que el paciente sobreviva. Existe, también, una forma de presentación de lenta progresión que inicialmente puede no requerir insulina y tiende a manifestarse en etapas tempranas de la vida adulta y se denomina comúnmente como diabetes autoinmune latente del adulto (LADA).

La DM2 se presenta en personas con grados variables de resistencia a la insulina, pero se requiere también que exista una deficiencia en la producción de insulina que puede o no ser predominante. Algunos de estos casos son portadores de mutaciones en los genes causales de la diabetes tipo MODY (del inglés Maturity Onset Diabetes of the Young), la cual se presenta con mayor frecuencia en Latinoamérica que en otras regiones [2].

La diabetes mellitus gestacional (DMG), se define como una alteración del metabolismo de los carbohidratos, de severidad variable, que se inicia o se reconoce por primera vez durante el embarazo. Esta puede o no requerir insulina y no excluye la posibilidad de que la alteración metabólica haya estado presente antes de la gestación, por lo que puede o no persistir después del embarazo. La mayoría de los casos normalizan su glucemia después del embarazo, sin embargo, el riesgo de tener diabetes a mediano plazo es mucho mayor [2].

### 1.3 DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES

Para el diagnóstico de la DM se manejan comúnmente los siguientes criterios:

- Síntomas de diabetes (polifagia, polidipsia, poliuria y pérdida inexplicable de peso) más una glucemia casual medida en plasma venoso mayor o igual a 200 mg/dL (11.1 mmol/l). Casual se refiere a cualquier hora del día sin relación con el tiempo transcurrido desde la última comida.
- Glucemia en ayuno de por lo menos 8 horas, medida en plasma venoso mayor o igual a 126 mg/dL (7 mmol/l).
- Glucemia medida en plasma venoso que sea igual o mayor a 200 mg/dL (11.1 mmol/l) dos horas después de una carga de 75 g de glucosa durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG).
- Hemoglobina glicosilada mayor o igual a 6.5% [3].

Para el diagnóstico en la persona asintomática, es esencial tener al menos un resultado adicional de glucemia igual o mayor a las cifras que se describen en los numerales dos y tres. Si el nuevo resultado no logra confirmar la presencia de DM, es aconsejable hacer controles periódicos hasta que se aclare la situación. En estas circunstancias el clínico debe tener en consideración factores adicionales como edad, obesidad, historia familiar, comorbilidades, antes de tomar una decisión diagnóstica o terapéutica [2].

*Tabla 5. Criterios para el diagnóstico de DM o trastornos en la regulación de la glucosa.*

	Normal	Prediabetes		Diabetes Mellitus
		Glucemia de ayuno alterada (GAA)	Intolerancia a la glucosa (IGA)	
<b>Glucemia en ayuno</b>	< 100 mg/dL	100 – 125 mg/dL	NA	≥ 126 mg/dL
<b>Glucemia 2 horas poscarga</b>	< 140 mg/dL	NA	140 – 199 mg/dL	≥ 200 mg/dL
<b>Hemoglobina glucosilada A1c</b>	< 5-7 %	5.7 – 6.4 %		≥ 6.5 %

*Con excepción de los valores para A1c, todos representan puntos de corte para plasma o suero venoso.*

### 1.4 COMPLICACIONES CRÓNICAS DE LA DIABETES

Una de las comorbilidades más comunes entre las personas con diabetes es la hipertensión arterial presentándose en cerca de la mitad de los pacientes con DM2. El 86.7% de ellos tiene al menos una condición reconocida como un factor de riesgo cardiovascular y un 65% tiene una o más condiciones que podrían tratarse, a fin de reducir su riesgo cardiovascular como hipercolesterolemia, hipertensión arterial y tabaquismo.

Otra de las comorbilidades más comunes de la diabetes es la dislipidemia. El valor promedio de triglicéridos y colesterol no HDL (por sus siglas en inglés de High Density Lipoprotein o Lipoproteínas de alta densidad en español) es mayor en los pacientes con diabetes al compararlo con el resto de la población, presentándose valores de colesterol LDL (por sus siglas en inglés de Low Density Lipoprotein

o Lipoproteínas de baja densidad en español) mayores de 100 mg/dL en un 74.8% de esta población [2].

La alteración lipídica más frecuente en los pacientes con DM2 es una elevación de los triglicéridos y disminución del colesterol HDL, no existiendo diferencias significativas en el nivel de colesterol LDL frente a los pacientes no diabéticos [2]. La hipertrigliceridemia puede llegar a ser muy severa con un nivel sérico de triglicéridos de 2000 mg/dL, lo que puede ocasionar síntomas neurológicos, lesiones cutáneas o síntomas abdominales por pancreatitis [3].

Tanto los cambios de hábitos nutricionales como el ejercicio y un mejor control de la glucemia suelen disminuir los niveles lipídicos, disminuyendo así el riesgo aterogénico; si estas medidas no fueran suficientes sería necesaria la instauración de un tratamiento farmacológico, siendo las estatinas el grupo terapéutico de elección al ser el fármaco más seguro y eficaz [2].

### 1.5 TRATAMIENTO DE LA DIABETES

Los cambios en el estilo de vida son el pilar fundamental para la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles, como la diabetes, hipertensión y dislipidemias, sin embargo, con frecuencia se logran metas subóptimas en el manejo de la dieta, la actividad física, el uso del tabaco, la obesidad, ingesta de alcohol, entre otros [2]. Para la evaluación del paciente diabético se suelen emplear los siguientes criterios:

*Tabla 6. Criterios de control de diabetes según la European NIDDM Policy group. Adaptado de la referencia 1*

Parámetro	Bueno	Aceptable	Deficiente
Glucemia Basal (mg/dL)	80-110	<140	>140
Glucemia Postprandial mg/DI	80-144	<180	<180
Hb A1 total (%)	<8	<9.5	<9.5
Hb A1 c (%)	<6.5	<7.5	<7.5
Fructosamina (Umol/l)	<300	300-330	>300
Colesterol Total mg/DI	<200	<250	<250
Colesterol HDL	>40	>35	<35
Triglicéridos mg/dL	<150	<200	>200
IMC (kg/m <sup>2</sup> )			
Hombres	20-25	<27	>27
Mujeres	19-24	<26	>26
Tensión Arterial (mmHg)	<130/80	<135/85	>140/90
Supresión tabaco	Si	Si	Si

Los siguientes medicamentos han demostrado reducir significativamente la incidencia de diabetes tipo 2 en personas con intolerancia a la glucosa: metformina, acarbosa, orlistat, rosiglitazona, agonistas GLP-1, inhibidores de la DDPIV, antagonistas SGLT-2 e insulina glargina, y la pioglitazona en mujeres con

diabetes gestacional previa. Por consiguiente, todos ellos se pueden utilizar como parte de una estrategia de prevención de diabetes tipo 2, sin embargo, se recomienda la metformina como la primera opción en terapia farmacológica para prevenir o diferir el desarrollo de DM2, por ser segura, tolerable y económica [2].

El nivel de colesterol de LDL (cLDL) recomendado para las personas con diabetes sin enfermedad cardiovascular (ECV) es <100 mg/d, para los casos en prevención secundaria es <70 mg/dl y valores aún menores (<55 mg/dl) para casos con muy alto riesgo (CHD) o con complicaciones crónicas. (Valores normales de triglicéridos <150 mg/dl y colesterol HDL >40 mg/dl) [3].

En todo paciente con DM2 y enfermedad cardiovascular (ECV) previa o en pacientes que tengan un nivel de colesterol LDL elevado se debe iniciar la administración de una estatina. En pacientes en prevención primaria, la dosis de inicio debe ser aquella que permita alcanzar una reducción del 30% y que mantenga la concentración de colesterol LDL <100 mg/dl durante el tratamiento. Las dosis requeridas para alcanzarlo son: lovastatina 40 mg, pravastatina 40 mg, simvastatina 20 mg, fluvastatina 80 mg, atorvastatina 20 mg, rosuvastatina 10 mg. No deben usarse dosis menores en personas con diabetes [3].

En pacientes en prevención secundaria, la dosis de inicio debe ser aquella que permita alcanzar una reducción del 50% y que mantenga la concentración de colesterol LDL <70 mg/dL durante el tratamiento. Las dosis requeridas para alcanzarlo son rosuvastatina 20 o 40 mg/dL o atorvastatina 40 o 80 mg/dL. El tratamiento con estatinas se debe continuar indefinidamente una vez instaurado. La no adherencia al tratamiento aumenta la comorbilidad cardiovascular [2].

A continuación, se presentan algunas de las características de los fármacos más empleados en el tratamiento de primera línea del Síndrome Metabólico.

*Tabla 7. Propiedades de la metformina y las estatinas. [13], [14], [15], [16] y [17]*

Parámetro	Rosuvastatina [13]	Atorvastatina [14]	Pravastatina [15]	Fluvastatina [16]	Metformina [17]
Solubilidad (mg/ml)	0.0886	0.00063	0.242	0.00441	1.38
T max	5 h	1-2 h	2-3 h	6 h	35 min
Biodisponibilidad (%)	20 - 50	14	17	24 - 29	50 - 60
Unión a proteínas	88%	98%	43-48%	98%	Casi nula

Estas propiedades, están ligadas a la estructura y composición de cada uno de los fármacos, de los cuales se presenta su estructura molecular a continuación:

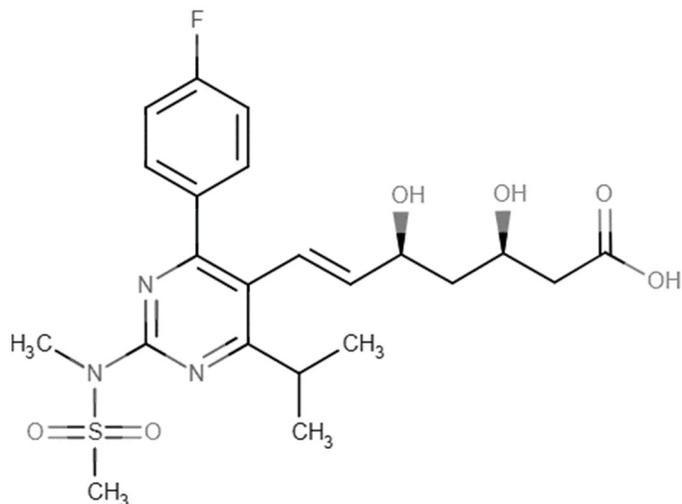


Ilustración 1. Estructura molecular de la rosuvastatina [13]

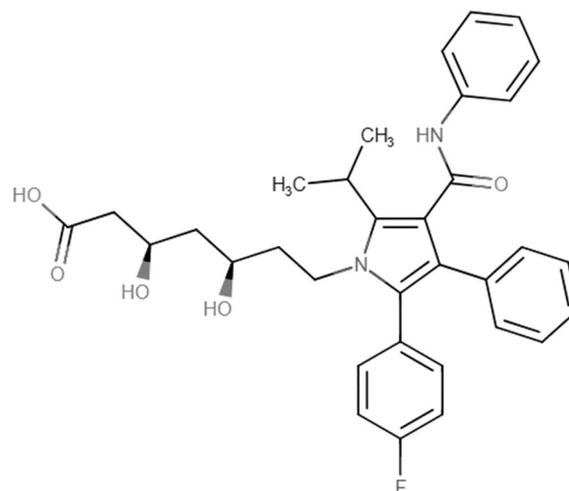


Ilustración 2. Estructura molecular de la atorvastatina [14]

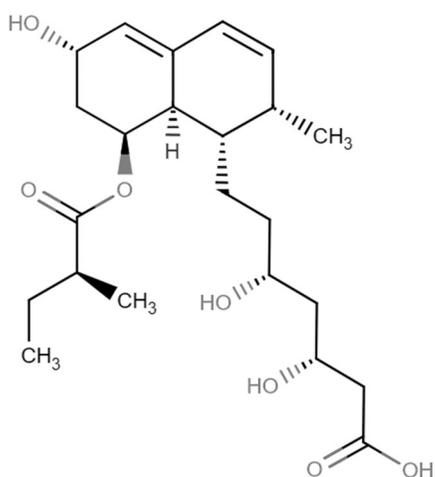


Ilustración 3. Estructura molecular de la pravastatina [15]

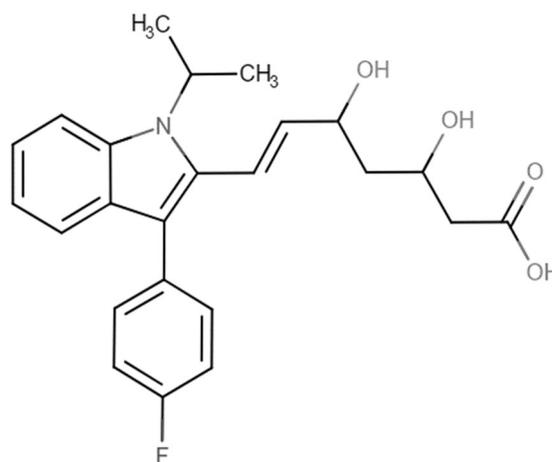


Ilustración 4. Estructura molecular de la fluvastatina [16]

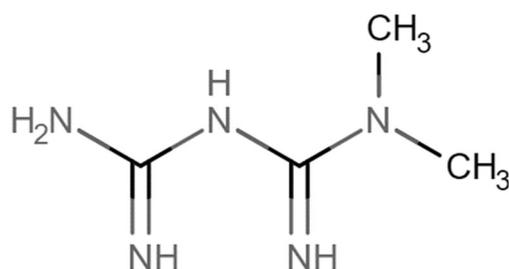


Ilustración 5. Estructura molecular de la metformina [17]

El mecanismo de acción de las estatinas es mediante la inhibición competitiva de la enzima hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, la cual cataliza la conversión de HMG-CoA en ácido mevalónico. Este mecanismo de acción inhibitorio produce una reducción en la síntesis de colesterol, lo cual estimula la regulación positiva de receptores de LDL (por sus siglas en inglés de Low Density Lipoprotein o Lipoproteínas de alta densidad en español) en las superficies celulares, aumentando la captación hepática de colesterol LDL. Por otro lado, la inhibición de la producción de LDL inhibe la síntesis hepática de VLDL (por sus siglas en inglés de Very low-density lipoprotein o lipoproteínas de muy baja densidad), ya que el LDL es el precursor de estas moléculas. Al inhibir la producción endógena de colesterol en el hígado, las estatinas reducen los niveles anormales de colesterol total y lípidos y, en última instancia, reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares [13], [14], [15] y [16].

El mecanismo de acción de la metformina se da por a la inhibición de la actividad del complejo I mitocondrial, lo cual conduce a la disminución de la producción hepática de glucosa (también llamada gluconeogénesis), la disminución de la absorción intestinal de glucosa y el aumento de la sensibilidad a la insulina al aumentar su absorción y utilización periférica. Todos estos procesos conducen a una disminución de la glucosa en sangre, controlando la diabetes tipo II y ejerciendo efectos positivos en el control glucémico [17].

## 1.6 SOLUBILIDAD DE FÁRMACOS

De acuerdo con lo indicado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 13.0 Edición, la solubilidad es el grado de disolución de un polvo dentro de 30 minutos en un disolvente a 25°C con agitación vigorosa durante 30 segundos en intervalos de 5 minutos. Esta propiedad se expresa en los siguientes términos [4]:

*Tabla 8. Términos de solubilidad. Adaptado de la referencia 4*

<b>Términos</b>	<b>Partes de disolvente en volumen requeridas para 1 parte de soluto</b>
<b>Muy soluble</b>	Menos de 1 parte
<b>Fácilmente Soluble</b>	De 1 a 10 partes
<b>Soluble</b>	De 11 a 30 partes
<b>Ligeramente soluble</b>	De 31 a 100 partes
<b>Poco soluble</b>	De 101 a 1 000 partes
<b>Muy Poco soluble</b>	De 1 001 a 10 000 partes
<b>Casi Insoluble</b>	Más de 10 00 partes

## 1.7 CLASIFICACIÓN DE FÁRMACOS POR PROPIEDADES DE SOLUBILIDAD Y PERMEABILIDAD

El Sistema de Clasificación de Biofarmacéutica (Biopharmaceutics Classification System, siglas en inglés BCS), clasifica los fármacos en cuatro categorías principales en función de su solubilidad y permeabilidad (ilustración 6). Los medicamentos clasificados como Clase II y Clase IV son de baja solubilidad acuosa. La baja solubilidad acuosa de los fármacos hidrofóbicos puede dar como resultado una baja absorción, baja biodisponibilidad y plantea desafíos para el proceso de desarrollo de fármacos. Por esta razón, es necesario el planteamiento de diversas estrategias que ayuden a mejorar la biodisponibilidad y con esto mejorar la eficacia del fármaco [5].

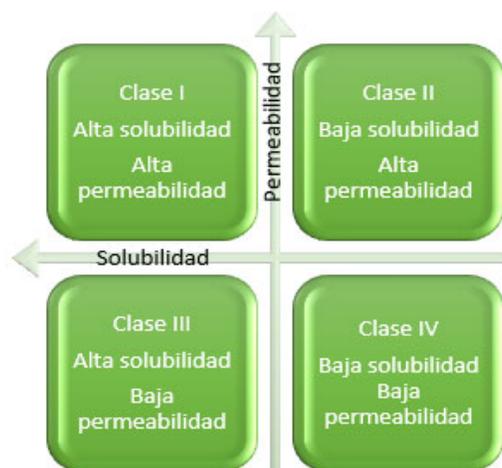
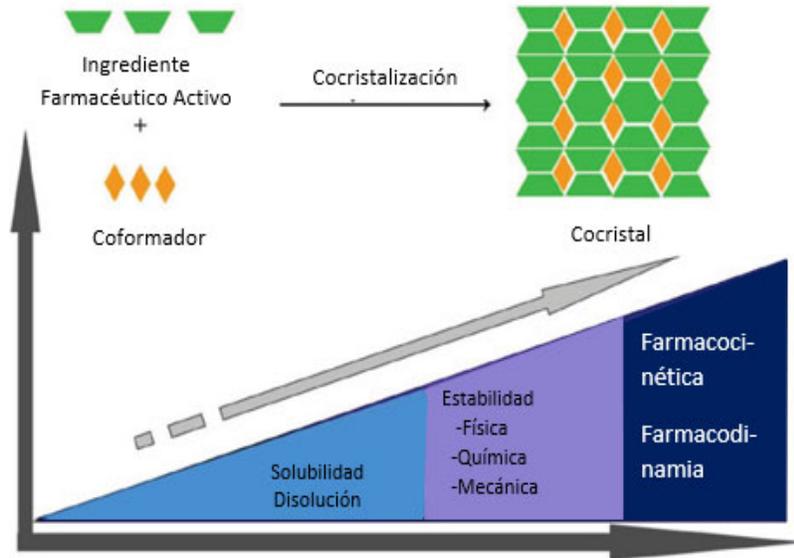


Ilustración 6. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BSC) de fármacos. Tomado de la referencia 5

Uno de los principales desafíos que se enfrentan el descubrimiento y desarrollo de fármacos es mejorar su solubilidad acuosa sin comprometer su estabilidad [5].

La “Ingeniería de cristales” es una rama de la química supramolecular empleada para mejorar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los fármacos, tales como punto de fusión, velocidad de disolución, solubilidad, índice de refracción, actividad superficial, densidad, propiedades electrostáticas, mecánicas, ópticas y principalmente su biodisponibilidad [5], [10].

Uno de los enfoques de la “ingeniería de cristales” es la cocrystalización. Este método permite mejorar la solubilidad de los fármacos que presentan baja solubilidad en medios acuosos, sin afectar sus propiedades intrínsecas (Ilustración 7) [5].



*Ilustración 7. Representación de la cocrystalización y modificación de características adaptado de la referencia 5*

La cocrystalización es considerada como una técnica avanzada para la mejora de productos farmacéuticos, en la cual se modifican las conformaciones e interacciones intermoleculares [5]. Otra ventaja que brinda la técnica de cocrystalización es la terapia farmacológica combinada, en donde se administran dos fármacos en una sola forma farmacéutica [5], lo que puede traer como consecuencia un mejor desempeño farmacológico en el apego al tratamiento.

Por estas razones, el desarrollo de nuevos cocrystalales es de gran importancia y pueden considerarse como productos finales patentables.

### **1.8 TIPOS DE FASES SÓLIDAS OBTENIDAS DE LA COCRYSTALIZACIÓN**

Si bien la formación de cocrystalales es el principal producto final deseado, un evento de cocrystalización fallido podría dar lugar a la formación de diferentes formas sólidas como: sólidos eutécticos, sólidos coamorfos, polimorfos farmacéuticos, mezclas físicas, sales multicomponentes, solvatos, hidratos y soluciones sólidas. Estas formas sólidas pueden conformarse de un solo componente o múltiples componentes.

Los sólidos formados por un solo componente pueden generar amorfos y polimorfos, mientras que los sólidos multicomponentes pueden formar cocrystalales, sales, coamorfos, cocrystalales de polimorfos/solvatos/hidratos, soluciones sólidas continuas o soluciones sólidas discontinuas/eutécticas (Ilustración 8) [5].

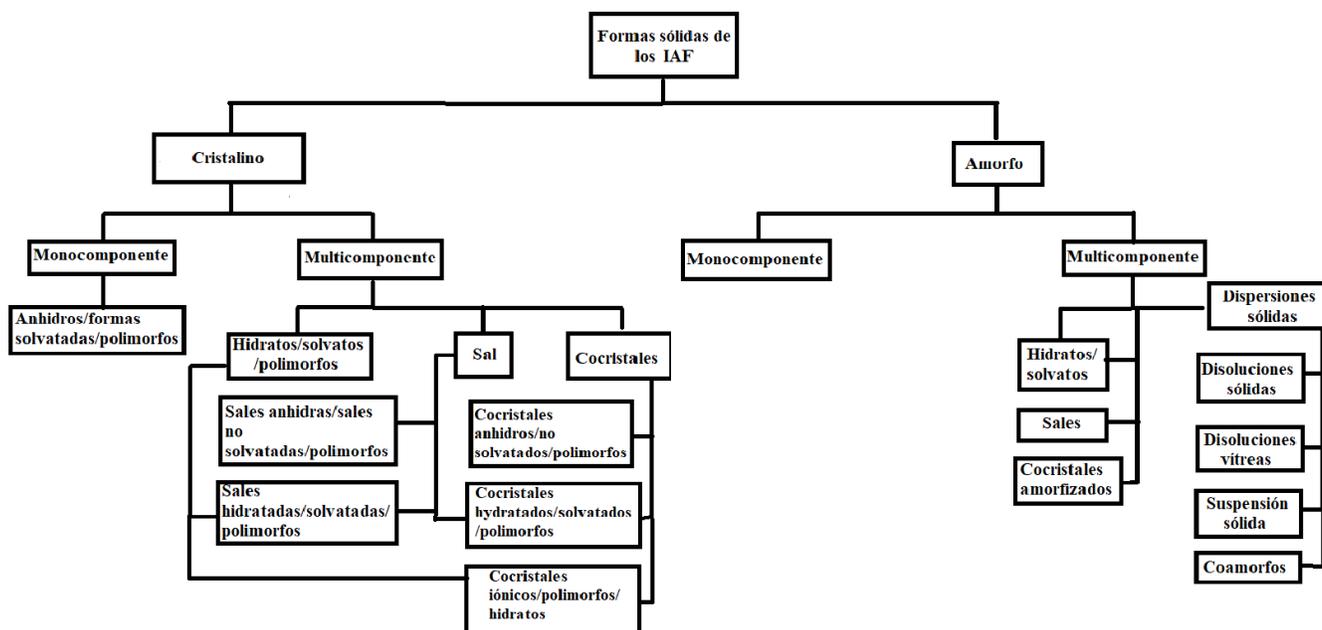


Ilustración 8. Clasificación de fases sólidas dependiendo su ordenamiento molecular. Tomado de la referencia 5

Entre las formas sólidas más importantes se encuentran las siguientes:

1. Los cocrisiales farmacéuticos se pueden definir como fases sólidas continuas y homogéneas (monofásicas) formadas de dos o más componentes en una relación estequiométrica definida y cuya disposición en forma de red cristalina se estabiliza principalmente por fuertes interacciones adhesivas, no covalentes de orden de corto alcance entre el fármaco y el coformador [5]. Se destaca que el coformador se define como el agente cocrystalizante. Es el componente que se incorporará a la red cristalina del IAF (Ingrediente Activo Farmacéutico) problema.
2. Los sólidos eutécticos son materiales cristalinos en donde los componentes originales se encuentran separados físicamente, formando una mezcla binaria heterogénea y discontinua. Estos se estabilizan principalmente mediante la interacción cohesiva entre moléculas congéneres e interacciones adhesivas más débiles entre los componentes, por esta razón su naturaleza cristalina se asemeja a la de los componentes puros y suelen poseer un punto de fusión menor [5].
3. Una solución sólida es una fase homogénea formada a partir de una reacción en estado sólido entre el fármaco y el coformador que poseen similitudes en su estructura molecular (isomorfo e isoestructural) y son estabilizadas mediante fuertes interacciones cohesivas [5].

4. Los sólidos coamorfos presentan el mayor nivel de solubilidad aparente durante los estudios de disolución *in vitro*, así como mejoras en la biodisponibilidad en estudios *in vivo* [5]. Los coamorfos son formas sólidas amorfas monofásicas homogéneas.
5. La formación de sales es otro de los métodos tradicionales empleados para mejorar la solubilidad de fármacos. Más de la mitad de los medicamentos en el mercado existen en forma de sales. La presencia de enlaces de hidrógeno asistidos por cargas permite que las moléculas coformadoras se disocien fácilmente [5].
6. La fase sal-cocrystal es otro subconjunto interesante de sólidos farmacéuticos multicomponentes. Cuando una forma sólida multicomponente contiene estados de ionización mixtos (el grado de transferencia de protones de una molécula a la otra no es predecible), es difícil entender si la forma sólida resultante es una sal o un cristal. Esto ocurre principalmente cuando la diferencia en el valor de pKa del fármaco y el coformador se encuentra entre 0 y 3 [5].



Ilustración 9. Representación del sistema de clasificación de fases multicomponentes. Tomado de la referencia 6

## 1.9 DISOLUCIÓN DE LOS FÁRMACOS

El proceso de disolución comienza en la superficie y continúa hasta que se alcanza la saturación de la solución, en donde el número de moléculas liberadas del sólido en la solución y las que se vuelven a unir se igualan, generando un estado de equilibrio dinámico. Esta cantidad de soluto disuelta en el estado de equilibrio es la solubilidad de la sustancia, mientras que la rapidez con la que se alcanza este estado es la velocidad de disolución. Ambos factores son importantes para los sólidos farmacéuticos, ya que un fármaco llevará a cabo su efecto terapéutico sólo si una cantidad suficiente de la dosis efectiva se absorbe lo suficientemente rápido.

La solubilidad al equilibrio es la que se alcanza en el tiempo infinito y se puede determinar para aquellos fármacos que no experimentan transformación en el medio biológico (que es acuoso y en el rango de pH 1-7) durante un tiempo suficientemente largo (entre 24 y 48 h). La solubilidad aparente ( $C_m$ ) se refiere a la concentración del fármaco en el equilibrio aparente o sobresaturación y no puede medirse directamente como la solubilidad al equilibrio ( $C_s$ ), sino que se calcula mediante modelos matemáticos. Para formas estables de fármacos cristalinos,  $C_m$  tiene aproximadamente el mismo valor que  $C_s$  [6].

En general, las formas cristalinas de los fármacos son más estables (mayor densidad y punto de fusión) comparados con sus contrapartes amorfas y, en consecuencia, presentan menor solubilidad.

Los hidratos generalmente son menos solubles en medios acuosos que sus congéneres anhídridos, debido a que la forma de hidrato ya tiene enlaces de hidrógeno fármaco-molécula de agua, y la energía liberada al unirse con las moléculas de disolvente es menor que la del anhidro.

Se ha observado que el estado amorfo de un fármaco típicamente posee mayor solubilidad y velocidad de disolución que su fase cristalina. La amorfización es la forma más sencilla y barata de aumentar la solubilidad, sin embargo, uno de los inconvenientes es que son fases metaestables que poseen alta energía interna y mayor movilidad molecular, por lo que tienden a recrystalizarse, acortando la estabilidad.

Estas fases sólidas amorfas presentan altos valores de entropía y se preparan deteniendo o congelando las moléculas lo más rápido posible para evitar que puedan reorganizarse formando nuevamente una red cristalina. Hay que considerar que la absorción oral de un fármaco no sólo depende de su solubilidad, sino también de su permeabilidad para poder atravesar la membrana gastrointestinal [6].

Durante la disolución, pueden ocurrir ciertos problemas como la transformación de la fase amorfa (metaestable) a la fase cristalina (estable), tal es el caso de la atorvastatina, cuya solubilidad en su forma cristalina es de solo 140  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que en su fase amorfa tiene una solubilidad aparente de 460  $\mu\text{g/ml}$ , sin embargo, esta se ve disminuida con el paso del tiempo, llegando hasta los 200  $\mu\text{g/ml}$  después de 24 horas. Este efecto se puede evitar en una gran medida mediante el uso de estabilizadores como los aditivos poliméricos polivinilpiridona (PVP), hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), polietilenglicol (PEG), etc. [6]. La preparación de dispersiones sólidas amorfas a base de polímeros se usa recurrentemente para evitar la tendencia de recrystalización de un fármaco al quedarse el fármaco atrapado en su matriz. Los polímeros funcionan como estabilizadores que disminuyen la movilidad molecular interna, inhibiendo la nucleación y la formación de cristales, con lo cual se evita la recrystalización. Este tipo de fases también presentan desventajas como:

1. Se requieren grandes cantidades de polímero para asegurar la mezcla molecular con el fármaco, lo que lleva a unidades de dosificación sobredimensionadas.

2. Son susceptibles a la humedad y el calor, lo que provoca su desestabilización molecular
3. Pueden presentar problemas en el proceso de fabricación, ya que presentan naturaleza pegajosa.

La preparación de sistemas coamorfos puede ser una solución alternativa a estas formas. Este enfoque se basa en combinar dos o más componentes de bajo peso molecular para formar una monofase amorfa homogénea donde los componentes están en estrechas relaciones estequiométricas. En el caso de las formas farmacéuticas coamorfos, la incorporación de un coformador u otro fármaco permite aumentar la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), limitando la movilidad molecular y evitando la recristalización. Adicionalmente, los sistemas coamorfos presentan una gran variedad de enlaces no covalentes (enlace de hidrógeno e interacciones iónicas) que les permiten tener una gran estabilidad molecular que evita la recristalización.

De esta forma, la solubilidad de la atorvastatina amorfa (300  $\mu\text{g/ml}$ ) es aproximadamente dos veces mayor que la de la fase cristalina hasta por 3 h. Las tasas de disolución de atorvastatina amorfa muestran una concentración plasmática máxima a los 10-15 min, que luego disminuye durante las siguientes 5-6 h debido al aumento en el contenido cristalino. Las curvas de disolución de la forma amorfa tienen pendientes y valores de pico más altos que los de la forma cristalina, alcanzando el valor de equilibrio asintótico a las 8 h [6].

La mejora de la solubilidad es, sin duda, la aplicación más buscada referente a la preparación de cocrisales farmacéuticos, sin embargo, debido a su naturaleza cristalina, los cocrisales tienden a ser estables a la humedad y al almacenamiento, y son menos propensos a sufrir transformaciones de fase. Generalmente son estables al procesamiento de fármacos, granulación húmeda, formación de tabletas, compactación, etc. Esta propiedad de los cocrisales también tiene una aplicación, por ejemplo, en tabletas de liberación lenta [6].

La última década ha sido testigo de la presentación de numerosas solicitudes y concesiones de patentes para cocrisales farmacéuticos que exhiben una solubilidad y estabilidad mejoradas [6].

### **1.10 CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACOS EN UNA FASE SÓLIDA**

Para conocer los valores de solubilidad de los componentes en una fase sólida como las antes descritas, es necesario diseñar un método analítico que permita separarlos y cuantificarlos. Este método debe abarcar desde la selección del disolvente, el método para llevar a cabo la prueba de solubilidad y un método de cuantificación de ambos fármacos, así como para la realización de los cálculos.

### **1.11 TÉCNICAS DE SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANALITOS**

Actualmente se cuenta con numerosos métodos de cuantificación desde técnicas sencillas como las titulaciones ácido-base, redox, potenciométricas y complejométricas, hasta técnicas más especializadas como la espectrometría y la espectrofotometría dentro de la cual se destacan la de fluorescencia y la de UV-Visible.

### 1.11.1 FLUORESCENCIA

La fluorescencia es uno de los métodos más selectivos y sensibles para detección y cuantificación de analitos. Este proceso ocurre cuando una molécula vuelve a su estado basal después de haber sido excitada por absorción de radiación. Para excitar la molécula se requiere de un monocromador el cual se programa para emitir la longitud de onda de excitación, y la fluorescencia se examina con un segundo monocromador el cual se coloca de manera que forme un ángulo de  $90^\circ$  con la luz incidente. Un espejo semiplataado reconduce de nuevo a los haces a un único camino que recorren ambos de forma alternada y pasan por el monocromador que los dirige al detector. En este caso, el detector es un espectrofotómetro, el cual consta de un monocromador de red para luz ultravioleta/visible. Finalmente se calculan el logaritmo de la relación de las señales alternas de la referencia y de la muestra y se envían a un dispositivo de lectura para mostrarla en términos de absorbancia [7].

### 1.11.2 ESPECTROMETRÍA DE UV-VISIBLE

La espectrometría de UV-visible es una técnica utilizada para medir la luz que absorbe una sustancia química, o muestra, midiendo la intensidad de luz, basándose en la Ley de Lambert-Beer. El sistema óptico del espectrofotómetro consiste en una lámpara de descarga de deuterio para el rango de longitudes de onda de UV (ultravioleta) y una lámpara de tungsteno o wolframio la cual opera el rango de longitudes de onda visible y de SWNIR (onda corta del infrarrojo cercano). Ambas fuentes luminosas se combinan ópticamente formando un haz luminoso que pasa a través del obturador/filtro de corrección de dispersión luminosa; a continuación, este pasa a través de la muestra hasta la lente y por la rendija del espectrofotómetro. Dentro de este, la luz se dispersa sobre una matriz de diodos mediante una red de difracción holográfica. Finalmente, esta señal es traducida en un gráfico de absorbancia con valores numéricos con los cuales se lleva a cabo la cuantificación de los analitos [7]. Esto se observa en la ilustración 10.

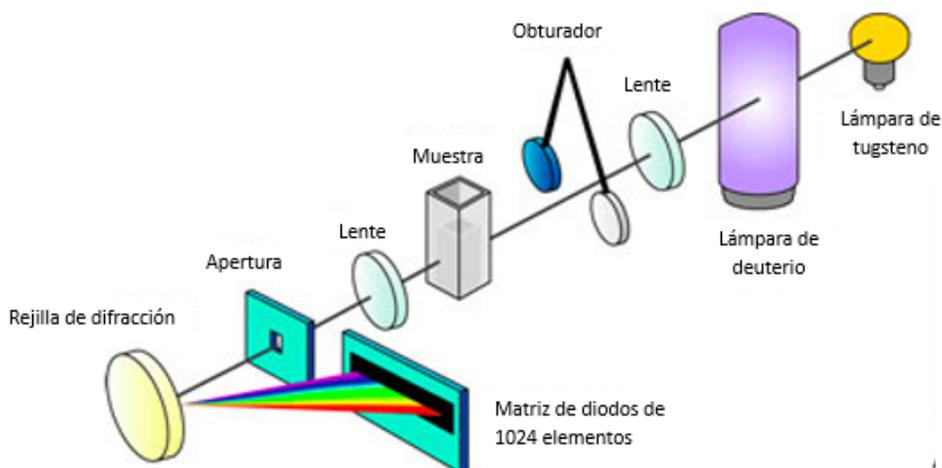


Ilustración 10. Diagrama de un espectrofotómetro de red de difracción y arreglo de diodos. Tomado de la referencia 19

### 1.11.2.1 FUNDAMENTO DE LA ESPECTROMETRÍA UV-VISIBLE (LEY DE LAMBERT-BEER)

Si se considera un haz de radiación monocromática de intensidad “ $I_0$ ” que pasa a través de un recipiente de espesor “ $b$ ” que contiene una especie absorbente de concentración “ $C$ ” se producirá una disminución de la intensidad del haz “ $I$ ” debido a la interacción entre los fotones y la especie absorbente. Esta atenuación de la radiación a medida que pasa a través de un medio absorbente se puede describir cuantitativamente mediante dos términos distintos, pero relacionados entre sí, transmitancia y absorbancia. A la fracción de radiación incidente que pasa a través de la muestra se le denomina transmitancia “ $T$ ” y toma valores entre 0 y 1. La  $T$  se suele expresar en % de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% T = ( I / I_0 ) \times 100$$

La inversa del logaritmo decimal de la transmitancia es la absorbancia ( $A$ ) y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$A = - \log_{10} T = \log ( I_0 / I )$$

Cuando la intensidad del haz incidente y emergente es igual ( $I_0 = I$ ), la absorbancia es igual a cero ( $\log 1 = 0$ ), lo que significa una transmitancia del 100%, es decir que se transmite toda la radiación. Una absorbancia de 1 significa que  $I_0 / I = 10$  ( $\log 10 = 1$ ), lo que implica que se transmite tan solo un 10% de la radiación. De igual modo, una absorbancia de 2 significa que  $I_0 / I = 100$  ( $\log 100 = 2$ ) y, por lo tanto, se transmite tan solo un 1% de la radiación incidente (el 99% restante se absorbe). Puesto que absorbancias superiores a 2 corresponden a una transmitancia demasiado pequeña para ser detectada, muchos instrumentos miden la absorbancia en una escala de 0 a 2.

La ley de Lambert-Beer es una ecuación fundamental en los métodos espectrofotométricos de análisis, ya que permite calcular la concentración de una sustancia a partir de la radiación absorbida por una disolución de esta:

$$A = a \times b \times c$$

Donde:

$a$ = absortividad

$b$ = trayectoria del haz incidente (camino o paso óptico, generalmente 1 cm)

$c$ = concentración de la disolución.

La absortividad es la constante que relaciona la absorbancia con la concentración de la especie absorbente y sus unidades dependerán de las unidades empleadas para la concentración. Así, si  $c$  se expresa en g/L, la absortividad tendrá unidades de L/g x cm. Sin embargo, cuando  $C$  se expresa en mol/L, la absortividad se denomina absortividad molar y tendrá unidades de L/mol x cm.

### 1.11.3 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés High-Performance Liquid Chromatography) es una técnica física de separación que consiste en el paso de una fase móvil en estado líquido en donde se encuentran disueltos uno o varios compuestos de interés (analitos) sobre una fase estacionaria sólida. Los analitos son separados por su interacción con la fase estacionaria, razón por la cual son eluidas en diferentes tiempos. Una vez separados, los analitos pasan por un detector en donde cada uno de ellos genera una señal emitiendo un cromatograma. Esta señal permite identificar y cuantificar componentes de interés como lo son los principios activos en una forma farmacéutica [8].

La fase estacionaria consiste en una columna de acero rellena con un compuesto adsorbente que produce la separación de los analitos mediante la interacción con ellos, reteniendo las moléculas que logren mayor interacción con este por su tamaño, polaridad, estructura, entre otras características. Entre los tipos de relleno más comunes para columnas cromatográficas se encuentran la sílice, la alúmina o las resinas de intercambio iónico, las cuales a su vez pueden contener grupos funcionales en los extremos que les confieran características desde muy polares hasta no polares [8].

De igual manera las fases móviles pueden variar desde muy polares hasta no polares y siempre deberán ser contrarias al tipo de fase estacionaria empleada para así evitar que estas interactúen entre sí y se desgaste la columna cromatográfica [8].

La cromatografía en fase normal usa una fase estacionaria polar comúnmente empleada cuando el analito es polar. La fase móvil suele estar compuesta por un disolvente acuoso y uno orgánico. El uso de los disolventes muy polares disminuye el tiempo de retención, mientras que disolventes con menor polaridad aumentan el tiempo de retención. Las proporciones de estas fases móviles pueden ser iguales durante toda la corrida (flujo isocrático) o en gradiente, comenzando comúnmente por una mayor proporción de fase orgánica la cual va disminuyendo a medida que aumenta la cantidad de fase móvil acuosa [8].

La cromatografía en fase reversa es la forma más común de HPLC. En esta se emplea una fase estacionaria no polar y una fase móvil moderadamente polar. Las características del analito a estudiar son importantes para sus propiedades de retención [8].

Otra clase de cromatografía es la de intercambio iónico. Su retención está basada en la atracción de los iones del soluto y la carga de la fase estacionaria, de manera que, si tienen la misma carga, son excluidos. Las resinas de poliestireno y la celulosa son algunos ejemplos de intercambiadores de iones.

Existen diversos tipos de detectores, entre los más comunes se encuentran el espectrofotómetro de UV, el de arreglo de diodos, de fluorescencia, el de índice de refracción y de espectrometría de masas [8].

Para el desarrollo de una técnica de separación y cuantificación por HPLC, es necesario partir del tipo de analito con el que se trabaja para la elección de fase móvil y fase estacionaria.

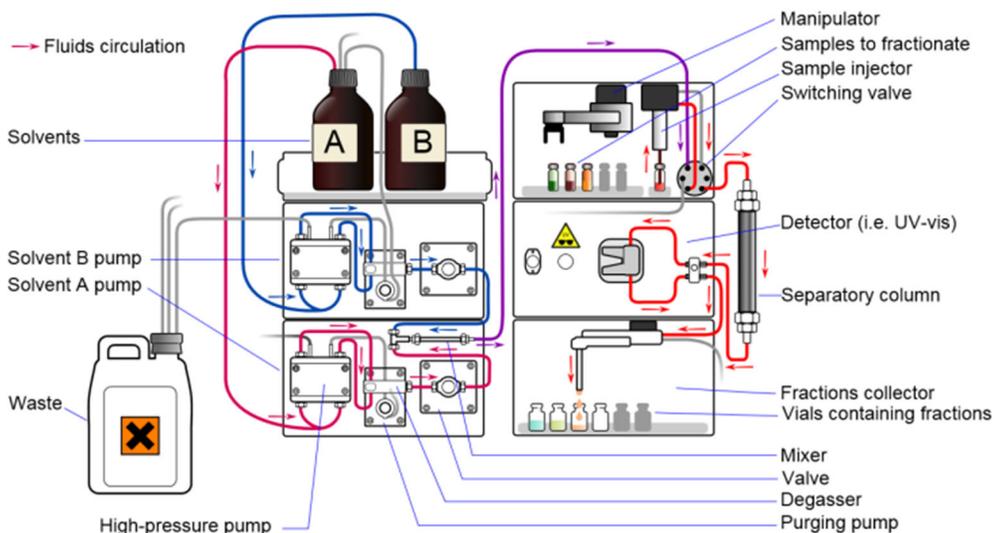


Ilustración 11. Diagrama de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución. Tomado de la referencia 8

## 1.12 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

El desarrollo de un método analítico debe estar acompañado de una validación, la cual tiene como objetivo demostrar que el método es adecuado para el propósito previsto [9]. Actualmente se cuenta con guías internacionales para la validación de métodos analíticos, entre las cuales destaca la guía Q2 R1 de la Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para uso Humano o ICH por sus siglas en inglés (International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use), de la cual forman parte entidades regulatorias de todo el mundo como la COFEPRIS (México), EC (Europa), FDA (Estados Unidos), MHLW/PMDA (Japón) y ANVISA (Brasil) entre muchos otros. La implementación de las guías ICH para la validación de métodos analíticos y en general para el desarrollo de medicamentos abre las puertas al intercambio de estos estudios entre los países que forman parte de este órgano, así como para la comercialización de las formas farmacéuticas desarrolladas bajo estas guías.

De acuerdo con la guía ICH Q2 R1 para la validación de métodos analíticos, los parámetros de validación que se evalúan normalmente a un ensayo de disolución o de contenido/potencia son la exactitud, precisión (repetibilidad y/o precisión intermedia), especificidad, linealidad y rango.

Para el mejor entendimiento de la realización de estos ensayos para la validación de métodos analíticos es necesario definir algunos términos como los siguientes:

**Procedimiento analítico:** es la forma de realizar un análisis en donde se describen detalladamente los pasos necesarios para el análisis, el cual incluye por lo menos la preparación de muestras, soluciones patrón, reactivos, equipos e instrumentos empleados, la preparación de curvas de calibración y las fórmulas para cálculo de resultados finales.

**Especificidad:** es la capacidad del método para detectar inequívocamente el analito en presencia de otros componentes que se puedan encontrar presentes. Esta prueba puede ser compensada por otros procedimientos analíticos adecuadamente soportados.

**Exactitud:** es la cercanía de un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado. Se expresa como el porcentaje de recuperación entre la muestra y la referencia o como la diferencia entre la media y el valor de la referencia junto con los intervalos de confianza. Debe evaluarse con un mínimo de 9 determinaciones (por ejemplo 3 réplicas de 3 concentraciones distintas).

**Precisión:** suele expresarse en términos de varianza, desviación estándar o coeficiente de variación y se refiere a la cercanía entre el valor obtenido en varias muestras de la misma preparación bajo las mismas condiciones. Esta debe considerarse en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. Es importante reportar la desviación estándar, coeficiente de variación y el intervalo de confianza.

**Repetibilidad:** es la precisión bajo las mismas condiciones operacionales en un periodo de tiempo pequeño.

**Precisión intermedia:** son las variaciones que se presentan en los resultados en diferentes días, analistas, equipos, etc. Esta prueba puede o no realizarse dependiendo de la realización de otras pruebas.

**Reproducibilidad:** es la precisión de los resultados obtenidos entre laboratorios. Esta prueba es necesaria para estandarización de procedimientos analíticos o para su inclusión en farmacopeas.

**Linealidad:** es el intervalo en el cual se tiene la capacidad de obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. Se recomienda realizar por regresión lineal empleando mínimos cuadrados y con un mínimo de 5 puntos.

**Rango:** es el intervalo en el cual se demuestra que las concentraciones mínima y máxima (incluyendo estas concentraciones) del analito en la muestra tienen un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

**Robustez:** es la capacidad del método para no verse afectado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en sus parámetros y que sirve para indicar su confiabilidad durante el uso normal. En el caso de los métodos por cromatografía de líquidos las variaciones típicas pueden ser la influencia del pH en la fase móvil, la composición de la fase móvil, el uso de diferentes columnas cromatográficas (lotes o marcas), la temperatura y el flujo.

### 1.13 CARACTERIZACIÓN DE LAS FASES SÓLIDAS

La determinación de la morfología de las fases sólidas, antes y después de someterse al proceso de amorfización, nos puede sugerir la formación de una nueva fase. Para esto, existen diversas técnicas, de entre las cuales se eligieron la microscopía electrónica de barrido y difracción de rayos x, al ser dos de las técnicas más comunes para caracterización de fases sólidas multicomponente, observadas durante la revisión bibliográfica.

El Microscopio Electrónico de Barrido convencional (MEB) es un instrumento cuyo funcionamiento se basa en el barrido de la superficie de una especie por medio de un haz de electrones cuyo diámetro es disminuido (entre 4 nm y 200 nm) por lentes electromagnéticas formadas por el paso de corriente a través de solenoides (bobinas). Después de que el haz de electrones interacciona con la muestra, se generan varios tipos de señales, las cuales son colectadas por un detector específico para cada una de ellas. Finalmente, se produce una imagen en el monitor de TV que puede ser almacenada en una placa fotográfica o digitalmente.

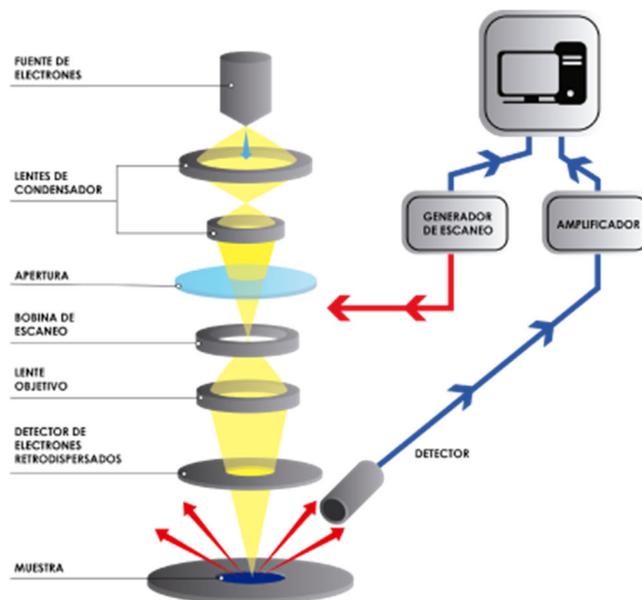
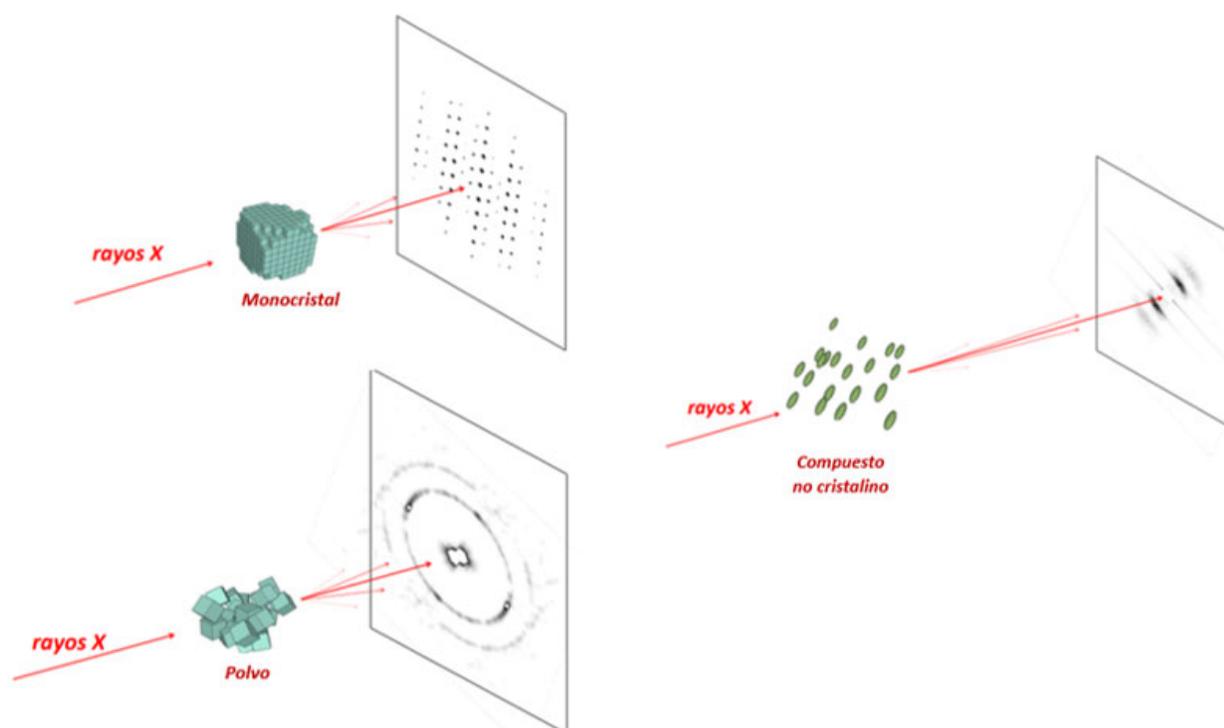


Ilustración 12. Diagrama del funcionamiento del microscopio electrónico de barrido. Referencia 20

La difracción de rayos X (DRX) es otra técnica de caracterización, la cual consiste en la radiación electromagnética producida por la desaceleración en el impacto de un haz de electrones contra átomos de un metal obstáculo (Cu, Mo, Co, etc.) que impactan a la muestra; gracias a esta interacción de longitud de onda ( $\lambda$ ) irradiada y de la distancia entre los planos habrá una respuesta en los planos (h, k, l) que componen la estructura del analito, logrando dar la posición de los átomos del compuesto. El objetivo primordial en la difracción de rayos X es el de obtener una imagen detallada del contenido a nivel atómico de una muestra, como si se pudiese mirar a través del microscopio más poderoso [21].

Las reflexiones de rayos x son colectadas en un plato fotográfico o en un detector electrónico de área, donde el patrón aparece como una serie de círculos concéntricos de intensidad variada [21].

Dependiendo de la simetría de la muestra, es la zona del círculo en donde se observa una mayor intensidad de rayos X, por lo tanto, cuando la muestra carece de una simetría, la intensidad de los rayos X serán mucho más variados alrededor del círculo, mientras que, cuando la muestra es cristalina, la intensidad se podrá observar en zonas definidas, como se puede observar a continuación en la ilustración 13.



*Ilustración 13. Patrón de difracción de un monocristal, una muestra en polvo y un compuesto no cristalino. Adaptado de la referencia 22.*

## 2 JUSTIFICACIÓN

Las estatinas son empleadas como tratamiento de primera línea para las dislipidemias, así como la metformina para la diabetes. Al ser ambas enfermedades de alta comorbilidad, se estima que un porcentaje importante de la población utiliza ambos medicamentos de forma simultánea, por lo que el presente trabajo es un paso más en el desarrollo de una forma sólida farmacéutica en donde se incluyan ambos fármacos y, de esta manera, lograr un mejor apego al tratamiento farmacológico, una mejora en las propiedades de solubilidad de las estatinas y, eventualmente, un efecto positivo en la biodisponibilidad. El mezclar dos fármacos está directamente ligado con intereses en la terapia combinada.

En el presente trabajo se describe la validación del método cromatográfico para la cuantificación de metformina, rosuvastatina y atorvastatina, así como la realización de pruebas de solubilidad de los fármacos solos y la combinación entre metformina-atorvastatina y metformina-rosuvastatina sometidas a molienda para formar las fases coamorfos.

Inicialmente se emplearon 4 estatinas: atorvastatina, rosuvastatina, fluvastatina y pravastatina, sin embargo, durante el desarrollo de la presente se observó que las dos últimas no presentan importantes problemas de solubilidad, por lo cual se realizaron las curvas de calibración para su cuantificación, pero no se continuó con las pruebas de solubilidad.

En este estudio se retomó la investigación de tesis "Preparación por métodos mecanoquímicos de sales fármaco:fármaco conteniendo agentes farmacéuticos para el control glicémico en presencia de diversas estatinas para el potencial tratamiento de diabetes hiperlipidémica" por el Químico Chrystian Rivas Arzate de la Facultad de Química-UNAM en marzo del 2018, en donde se determinó la manera de obtener las fases multicomponentes coamorfos de metformina-atorvastatina, metformina-rosuvastatina, metformina-fluvastatina y metformina-pravastatina mediante un proceso de química verde en el cual se colocan los fármacos en estequiometrías 1:1, 1:2 y 2:1 y se someten a un proceso de molienda mecánica a 600 revoluciones por minuto (RPM) durante 120 minutos; posteriormente se someten a tratamiento térmico de 120°C a 160°C y finalmente se realiza una molienda en mortero durante 15 minutos. La tesis se puede consultar en el repositorio de tesis de la UNAM [https://repositorio.unam.mx/contenidos/preparacion-por-metodos-mecanoquimicos-de-sales-farmaco-farmaco-conteniendo-agentes-farmaceuticos-para-el-control365286?c=L0nZB5&d=false&q=\\*&i=2&v=1&t=search\\_0&as=0](https://repositorio.unam.mx/contenidos/preparacion-por-metodos-mecanoquimicos-de-sales-farmaco-farmaco-conteniendo-agentes-farmaceuticos-para-el-control365286?c=L0nZB5&d=false&q=*&i=2&v=1&t=search_0&as=0).

### 3. OBJETIVOS

- Diseñar un método de cuantificación de los dos fármacos involucrados en una misma fase multicomponente coamorfa, siendo estas metformina-atorvastatina (MA) y metformina-rosuvastatina (MR) y comprobar que esta es adecuada.
- Preparar fases sólidas coamorfos metformina-rosuvastatina y metformina-atorvastatina y determinar si la solubilidad de las estatinas se ve aumentada al formar esta nueva fase en las estequiometrías 1:1, 1:2 y 2:1.
- Caracterizar las fases sólidas para observar si la morfología de los fármacos se ve modificada al someterse al proceso de molienda.

### 4. HIPÓTESIS

Se prepararán coamorfos entre las sales metformina-atorvastatina y metformina-rosuvastatina cuya solubilidad se vea aumentada.

La solubilidad será evaluada a través del desarrollo y la validación de un método analítico.

### 5. REACTIVOS

Tabla 9. Sustancias de referencia empleadas en el presente trabajo

Nombre	Marca	Lote	Pureza	Fórmula	Peso Molecular (g/mol)
Atorvastatina cálcica trihidratada	Tokyo Chemical Industry/Japan (TCI)	XVT2K-PQ	>98.0%	$C_{66}H_{68}CaF_2N_4O_{10}$	1155.36 (anhidra)
Rosuvastatina cálcica*	Sigma-Aldrich	LRAC6958	>98.0%	$C_{40}H_{40}CaF_2NO_{12}S_2$	1001.14
	TRC Canadá	I-2PK-95-I	>98.0%		500.57
Fluvastatina	Tokyo Chemical Industry/Japan (TCI)	XAWMO-RO	>98.0 %	$C_{24}H_{26}FNO_4$	411.473
Pravastatina	TRC Canadá	3-54Q-100-1	>98.0%	$C_{23}H_{36}O_7$	424.539
Clorhidrato de metformina	Tokyo Chemical Industry/Japan (TCI)	OQQWC-SG	>98.0%	$C_4H_{11}N_5 HCl$	165.63

\*La marca Sigma-Aldrich fue empleada durante las pruebas, mientras que la marca TRC Canadá se empleó para los ensayos.

Tabla 10: Reactivos empleados en el presente trabajo

Nombre	Marca	Lote	Pureza
Acetato de amonio	USB	117686	98 %
	Sigma-Aldrich	SLBM7324V	98 %
Ácido clorhídrico	Tecsiquim	-	37 %
Alcohol etílico HPLC	Tecsiquim	TEC-273-NJ-H	> 99.5 %
Acetonitrilo HPLC	Tecsiquim	-	-
Agua Milli Q	NA	NA	NA

Tabla 11: Equipos e instrumentos utilizados en el presente trabajo

Nombre	Marca y especificaciones
Cromatógrafo de líquidos HPLC	Agilent 1260 infinity, quad pump con detector de lámpara UV
Purificador de agua	Milli Q
Potenciómetro	Hanna
Agitador	Thermo Scientific MaxQ 4450
Baño de ultrasonido	Branson
Balanza analítica	Mettler Toledo
Columna cromatográfica	Eclipse 4.6 x 150 mm XDB-C18

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 FLUORESCENCIA

Para llevar a cabo el diseño del método de cuantificación, se llevó a cabo una investigación sobre los métodos empleados por otros investigadores para separar y cuantificar las estatinas de otros fármacos polares como la metformina, encontrando entre los más empleados la espectroscopía de fluorescencia y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Para las primeras pruebas realizadas con el método de fluorescencia, se prepararon soluciones stock de atorvastatina y metformina por separado, en donde se pesaron 15.0 mg de atorvastatina y se llevaron a 50,0 mL, mientras que para la metformina se pesaron 11.4 mg y se llevaron a 50,0 mL. Se hizo un barrido de estas soluciones en el espectrofotómetro UV-visible para determinar la longitud de onda a la cual presentan mayor absorbancia, a la cual se va a incidir la luz para excitar las moléculas y que estas emitan fluorescencia, es decir, que el máximo de absorción corresponde a la longitud de onda de excitación (Gráfica 1).

Una vez determinada la longitud de onda de excitación de cada fármaco, se preparó una curva para observar el efecto de la concentración en la emisión de fluorescencia, para lo cual se realizaron diluciones de la solución stock como se indica en las siguientes tablas.

Tabla 12: Diluciones para curva de fluorescencia de la metformina

No. dilución	Vol. alícuota (mL)	Vol. Final (mL)	Concentración (µg/mL)	Concentración (mmol/L)
Stock	11.4 mg	50.0	228	1.765
1	5.0	10.0	91.2	0.8825
2	4.0	10.0	36.48	0.353
3	4.0	10.0	14.592	0.1412
4	4.0	10.0	5.8368	0.05648
5	4.0	10.0	2.3347	0.022592
6	4.0	10.0	0.00093888	0.0090368

Tabla 13: Diluciones para curva de fluorescencia de la atorvastatina

No. Dilución	Vol. alícuota (mL)	Vol. Final (mL)	Concentración (µg/mL)	Concentración (nmol/L)
Stock	15.0 mg	50.0	300	248.0548
1	4.0	10.0	120	99.2219
2	4.0	10.0	48	39.6877
3	4.0	10.0	19.2	15.8755
4	4.0	10.0	7.68	6.3502
5	4.0	10.0	3.072	2.5401
6	4.0	10.0	1.2288	1.0160

Los resultados de estas pruebas se pueden observar en las gráficas 1, 2, 3 y 4 en la sección de resultados.

## 6.2 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

Posteriormente, se empleó cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector de Ultravioleta-Visible para realizar la separación cromatográfica de los fármacos y cuantificarlos. Para esto se probaron distintas composiciones y proporciones de fase móvil como etanol, metanol, acetonitrilo, ácido fórmico, agua, solución tampón de acetato de amonio, tampón de fosfato de sodio y tampón de fosfato de potasio. Otros factores que se modificaron y ajustaron para obtener los parámetros adecuados en los cromatogramas, fueron el pH a 2.5, 5.0 y 6.8 respetando el rango de pH recomendado por el fabricante de la columna cromatográfica (entre 2 y 8).

Una vez que se determinaron las condiciones cromatográficas para separar ambos compuestos, se procedió a buscar las condiciones cromatográficas adecuadas como longitud de onda, volumen de inyección, flujo, la temperatura de la columna y las proporciones de fase móvil, hasta obtener picos bien definidos, resueltos y simétricos, obteniendo las condiciones indicadas en la tabla 23 en la sección de "Resultados y discusión".

### **6.2.1 PRUEBA DE INFLUENCIA DEL FILTRO (HPLC)**

Debido a que las tuberías del equipo son muy delgadas, es necesario filtrar las soluciones previo a su inyección con el fin de evitar la introducción de partículas que puedan dañar el equipo y/o generar respuestas en el detector que pongan en duda el resultado analítico. Es por esta razón que se llevó a cabo una prueba para determinar la influencia del filtro, para lo cual se preparó una solución 9.52 mg de atorvastatina en 100 mL de agua, se sonicó por 30 minutos y se colocó en viales y se realizaron las determinaciones por triplicado. Por otro lado, se filtró la solución a través de filtros PVDF de 0.45  $\mu\text{m}$ , se eliminaron los primeros 6 mL y los siguientes 4 mL se colocaron en 4 viales con 1 mL cada uno con el fin de verificar si el filtro tenía alguna influencia en la concentración de las soluciones. Estas se inyectaron en el cromatógrafo, obteniendo los resultados indicados en la tabla 24 en la sección de “Resultados y discusión”.

### **6.2.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO**

Para poder calcular la concentración de los fármacos de una solución de concentración desconocida, se prepararon curvas de calibración de cada fármaco por separado en donde se prepararon soluciones de concentración conocida mediante diluciones a partir de su stock. Se inyectaron en el cromatógrafo y se graficó el área del pico en función de la concentración para poder observar si estas aumentaban de manera proporcional (gráfica lineal). A partir de estas gráficas se observó en qué intervalos se obtenía un comportamiento lineal y se prepararon nuevas curvas de calibración que abarcaran únicamente este intervalo lineal; esto con la finalidad de obtener curvas más precisas y con un menor error analítico.

Para la metformina se preparó un stock de 4280  $\mu\text{g/mL}$  y diluciones 6:10 hasta los 0.55  $\mu\text{g/mL}$ . Estas se inyectaron en el cromatógrafo y se graficó la concentración en función del área del pico. Los resultados de esta prueba se pueden observar en la gráfica 5 en la sección de “Resultados y discusión” y su intervalo lineal se observa en la gráfica 6.

Una vez determinado el intervalo lineal, se preparó otra curva partiendo de la concentración más alta de este intervalo, y a partir de estas se prepararon nuevas diluciones con la finalidad de disminuir el rango de error. Para esto se pesaron 15.5 mg de Metformina y se llevaron a un volumen de 100 mL, obteniendo una concentración inicial de 155  $\mu\text{g/mL}$  y a partir de esta se prepararon diluciones de 6/10 hasta llegar a una concentración de 0.56  $\mu\text{g/mL}$  como se indica en la siguiente tabla. Los resultados se observan en la gráfica 7 de la sección de “Resultados y discusión” y los cromatogramas en el “Anexo 1”.

*Tabla 14. Curva de calibración Metformina*

<b>Concentración MET (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Área (mUA)</b>
155.000	3222.9
93.000	2022.6
55.800	1212.0
33.480	744.7
20.088	454.9
12.053	276.1
7.232	159.8
4.339	100.5
2.603	60.9
1.562	38.5
0.937	20.4
0.562	14.7

Para la atorvastatina se preparó un stock de 856.8  $\mu\text{g/mL}$  y se realizaron diluciones 6:10 hasta una concentración de 1.865  $\mu\text{g/mL}$  como se muestra en la siguiente tabla:

*Tabla 15. Concentraciones y áreas para curva de calibración atorvastatina*

<b>Concentración ATV (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Área (mUA)</b>
<b>856.800</b>	16293.3
<b>514.080</b>	9874.3
<b>308.448</b>	5902.0
<b>185.069</b>	3653.8
<b>111.041</b>	2319.6
<b>66.625</b>	1329.2
<b>39.975</b>	819.1
<b>23.985</b>	537.2
<b>14.391</b>	306.5
<b>8.635</b>	186.9
<b>5.181</b>	113.7
<b>3.108</b>	75.6
<b>1.865</b>	38.7

La curva de calibración de la atorvastatina se puede observar en la gráfica 8 en la sección de “Resultados y discusión” y los cromatogramas en el “Anexo 2”.

Para la rosuvastatina se preparó un stock de 10.5 mg en 100 mL con diluciones 6:10 como se muestra en la siguiente tabla.

*Tabla 16. Concentraciones y áreas para curva de calibración rosuvastatina*

<b>Concentración RSV (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Área (mUA)</b>
105.00	3300.8
63.00	2014.1
37.80	1211.2
22.68	728.2
13.61	441.8
8.16	264.9
4.90	160.6
2.94	98.3
1.76	59.0
1.06	36.3

La curva de calibración de la rosuvastatina se puede observar en la gráfica 9 en la sección de “Resultados y discusión” y los cromatogramas en el “Anexo 3”.

En el desarrollo experimental planteado de manera inicial se contemplaban a la fluvastatina y pravastatina como fármacos de estudio, aunque durante las pruebas de solubilidad fueron descartadas debido a que estas no presentaron importantes problemas de solubilidad. No obstante, se desarrollaron las curvas de calibración de estos fármacos como se indica a continuación.

Para la fluvastatina, se preparó la siguiente curva de calibración:

*Tabla 17. Curva de prueba para la fluvastatina*

<b>Concentración FLV (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Área (mUA)</b>
104.00000	293.9
10.40000	177.7
1.04000	115.1
0.10400	57.6
0.01040	39.3
0.00104	22.1
0.00010	13.8

Los resultados para la fluvastatina se observan en la gráfica 10 en la sección de “Resultados y discusión” y los cromatogramas en el “Anexo 4”.

Para la pravastatina se preparó la siguiente curva de calibración:

*Tabla 18. Curva de prueba para la pravastatina*

Concentración PRV (µg/mL)	Área (mUA)
43.13	2319.23
25.88	1419.90
15.53	869.20
9.32	537.55
5.59	295.87
3.35	167.40
2.01	93.03
1.21	51.48
0.72	29.13
0.43	16.83
0.26	9.53

Los resultados de la curva de prueba de la pravastatina se observan en la gráfica 11 en la sección de “Resultados y discusión”. La curva en su intervalo lineal se observa en la gráfica 12 y los cromatogramas en el “Anexo 5”.

### 6.3 PREPARACIÓN DE MEZCLAS FÍSICAS METFORMINA-ATORVASTATINA Y METFORMINA-ROSUVASTATINA

Se determinó que la cantidad necesaria para llevar a cabo las pruebas de solubilidad sería de 1 g de cada fase, por lo que se requería preparar aproximadamente 1.5 g de cada fase. Para esto, se prepararon primero las mezclas físicas de metformina-atorvastatina y metformina-rosuvastatina en las estequiometrías 1:1, 1:2 y 2:1. Se mezclaron durante 30 minutos en vortex y se dividió en dos la cantidad total para someter la mitad al proceso de molienda.

Para la mezcla física de metformina-atorvastatina se pesaron aproximadamente 3 gramos de la sustancia de referencia trihidratada de atorvastatina y se realizó el cálculo de la cantidad de atorvastatina base contenida de la siguiente manera:

$$3.0047g \text{ Ca (Atv)}_2 - 3H_2O \left( \frac{1 \text{ mol Ca(Atv)}_2 - 3H_2O}{1209.3 \text{ g Ca(Atv)}_2 - 3H_2O} \right) \left( \frac{1 \text{ mol Atv Anhidra}}{1 \text{ mol Ca(Atv)}_2 - 3H_2O} \right) \left( \frac{1155.36 \text{ g Atv Anhidra}}{1 \text{ mol Atv Anhidra}} \right) = 2.8706774 \text{ g Atv}$$

Posteriormente se realizó el cálculo de la cantidad necesaria de Metformina para obtener la mezcla en la estequiometría requerida. A continuación, se muestra el ejemplo para el cálculo de la cantidad a pesar de metformina para la mezcla en estequiometría 1:2 de metformina-atorvastatina:

$$2.8706774 \text{ g } Ca(Atv)_2 \left( \frac{1 \text{ mol } Ca(Atv)_2}{1155.36 \text{ g } Ca(Atv)_2} \right) \left( \frac{2 \text{ mol } Atv}{1 \text{ mol } Ca(Atv)_2} \right) \left( \frac{1 \text{ mol } Met}{2 \text{ mol } Atv} \right) \left( \frac{165.63 \text{ g } Met}{1 \text{ mol } Met} \right) = 0.411 \text{ g } Met$$

De esta manera se realizaron los cálculos para las demás estequiometrías, modificando el número de mol requeridos de cada fármaco en el tercer paréntesis de la fórmula anterior.

A continuación, se indican las cantidades que fueron pesadas de ambos fármacos para la preparación de las mezclas físicas:

*Tabla 19. Preparación de las mezclas físicas metformina-atorvastatina*

<b>Estequiometría M:A</b>	<b>Atorvastatina (g)</b>	<b>Metformina (g)</b>	<b>Cantidad total (g)</b>
1:2	3.0047	0.4105	3.4152
1:1	3.0046	0.8217	3.8263
2:1	3.0063	1.6436	4.6499

Para las mezclas de rosuvastatina-metformina se realizaron los cálculos como se indica a continuación: Ejemplo del cálculo para la preparación de la mezcla física de 1:2 MR

$$1.0004 \text{ g } Ca(Rsv)_2 \left( \frac{1 \text{ mol } Ca(Rsv)_2}{1001.14 \text{ g } Ca(Rsv)_2} \right) \left( \frac{2 \text{ mol } Rsv}{1 \text{ mol } Ca(Rsv)_2} \right) \left( \frac{1 \text{ mol } Met}{2 \text{ mol } Rsv} \right) \left( \frac{165.63 \text{ g } Met}{1 \text{ mol } Met} \right) = 0.1655 \text{ g } Met$$

De esta manera se realizaron los cálculos para las demás estequiometrías, modificando el número de mol requeridos de cada fármaco en el tercer paréntesis de la fórmula anterior.

A continuación, se presenta la tabla con los pesos de ambos fármacos para la preparación de las mezclas físicas:

*Tabla 20. Preparación de las mezclas físicas de metformina:rosuvastatina*

<b>Estequiometría M:R</b>	<b>Rosuvastatina (g)</b>	<b>Metformina (g)</b>	<b>Cantidad total (g)</b>
1:2	1.0004	0.1655	1.1659
1:1	1.0005	0.3309	1.3314
2:1	1.0001	0.6617	1.6618

Los fármacos se pesaron y se colocaron en viales de vidrio de 20 mL. Posteriormente se mezclaron en un vórtex durante 30 minutos, cambiando la posición del frasco cada 5 minutos, se pesó la mitad de la mezcla física y se colocó en otro vial para someterla al proceso de molienda de acuerdo a lo indicado en la tesis "Preparación por métodos mecanoquímicos de sales fármaco:fármaco conteniendo agentes farmacéuticos para el control glicémico en presencia de diversas estatinas para el potencial tratamiento de diabetes hiperlipidémica" por el Químico Chrystian Rivas Arzate (2018), la cual indica que se deben agregar 100 µL de etanol y someterse a molienda durante 1 hora para formar la fase coamorfa, sin embargo, estas no pudieron someterse a molienda por medio de un micromolino planetario Pulverisette

7 marca Fristch, debido a que este se encontraba descompuesto, por lo cual la molienda se tuvo que realizar de manera manual en un mortero ágata durante media hora agregando los 400  $\mu$ L de etanol.

De igual manera se realizó la molienda de los fármacos solos para compararlos con la Sustancia de Referencia (SR)

Las muestras fueron caracterizadas por difracción de rayos x de polvos (DRXP) y microscopía electrónica de barrido, tanto a las mezclas físicas como las sometidas a molienda para identificar si se modificó la morfología de los fármacos iniciales, sugiriendo la formación de una nueva fase.

#### 6.4 PRUEBA DE SOLUBILIDAD

Una vez teniendo las mezclas físicas y las mezclas sometidas a molienda, se realizaron las pruebas de solubilidad, para lo cual se pesaron las cantidades indicadas en la siguiente tabla de cada fármaco como sustancia de referencia (SR)/mezcla física (MF)/mezcla sometida a molienda (MOL), se llevaron al volumen de 100 mL y se sometieron a agitación en baño de ultrasonido durante 30 minutos. Las soluciones se filtraron con filtros PVDF de 0.45  $\mu$ m descartando los primeros 20 mL, se colocaron en viales y se inyectaron las soluciones por duplicado.

*Tabla 21. Peso de cada fase para llevar a cabo la prueba de solubilidad y volumen de la solución*

Sustancia	Peso 1 (mg)	Peso 2 (mg)	Volumen (mL)
Atorvastatina SR (agua)	10.0	10.0	100
Atorvastatina Mol (agua)	10.0	10.0	100
Atorvastatina SR (fase móvil)	10.0	10.0	100
Metformina:atorvastatina 1:2 MF	11.4	11.4	100
Metformina:atorvastatina 1:2 MOL	11.4	11.4	100
Metformina:atorvastatina 1:1 MF	12.7	12.7	100
Metformina:atorvastatina 1:1 MOL	12.7	12.7	100
Metformina:atorvastatina 2:1 MF	15.5	15.5	100
Metformina:atorvastatina 2:1 MOL	15.5	15.5	100

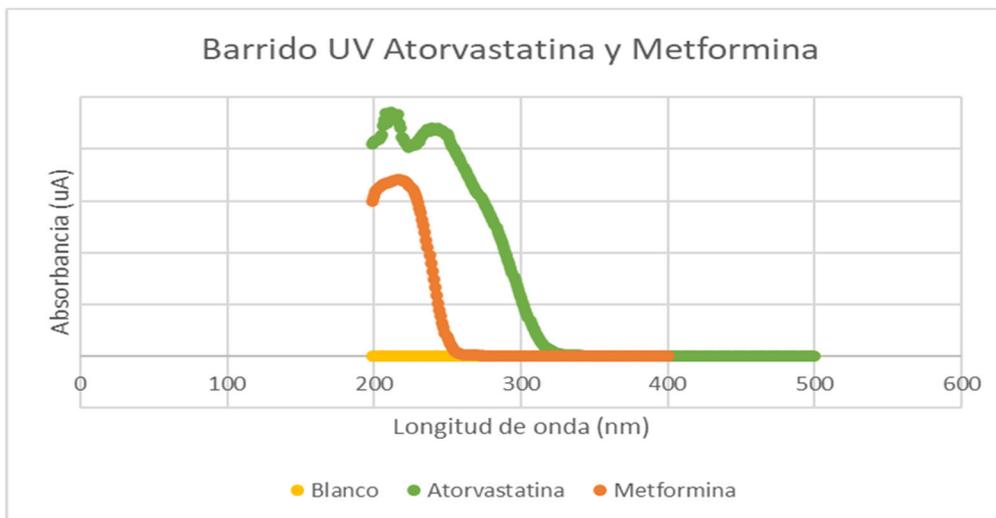
Los resultados de las pruebas de solubilidad de las fases atorvastatina-metformina se pueden observar en la sección de resultados. Por otro lado, a las fases metformina-rosuvastatina no se les pudieron realizar las pruebas de solubilidad debido a la emergencia sanitaria con el COVID-19, ya que el sitio en el cual se llevó a cabo la investigación fue la Red de Apoyo a la Investigación, dentro del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición, el cual fue hospital para atención de pacientes con dicha enfermedad.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 FLUORESCENCIA

A continuación, se presenta la gráfica de resultados del barrido UV-visible de la solución de atorvastatina y de metformina para determinación del máximo de absorción de cada uno de los fármacos.

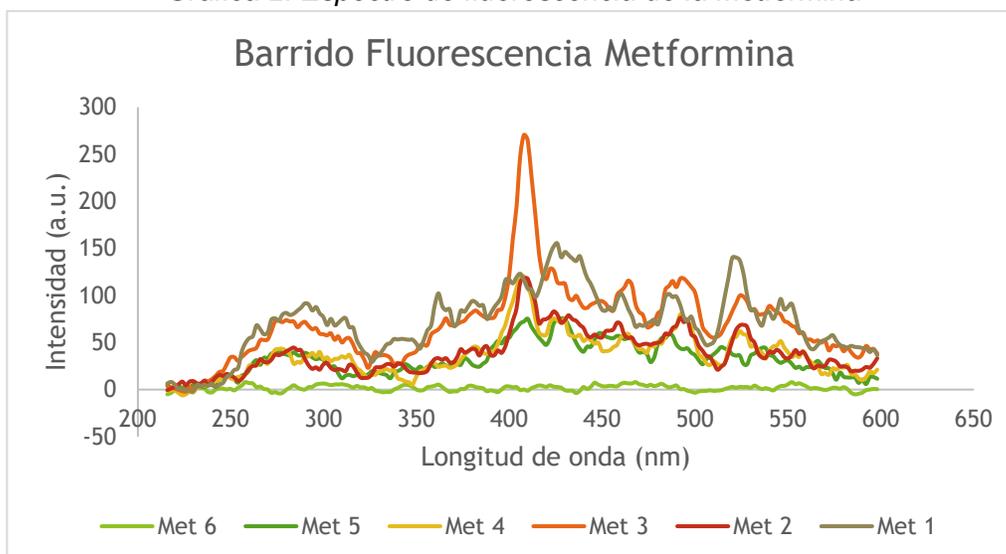
Gráfica 1. Barrido Ultravioleta-Visible de metformina y atorvastatina.



En esta gráfica se observa que la longitud de onda que más absorben las moléculas es de 243 nm para la atorvastatina y de 203 nm para la metformina respectivamente. Esta longitud de onda es la que logra excitar la molécula con mayor facilidad y producir el fenómeno de fluorescencia, por lo cual es la longitud de onda a la cual habría que emitir el haz de luz para lograr observar este fenómeno.

Al incidir un espectro de luz UV sobre las soluciones de la curva de calibración de metformina se obtiene la siguiente gráfica de fluorescencia:

Gráfica 2. Espectro de fluorescencia de la metformina

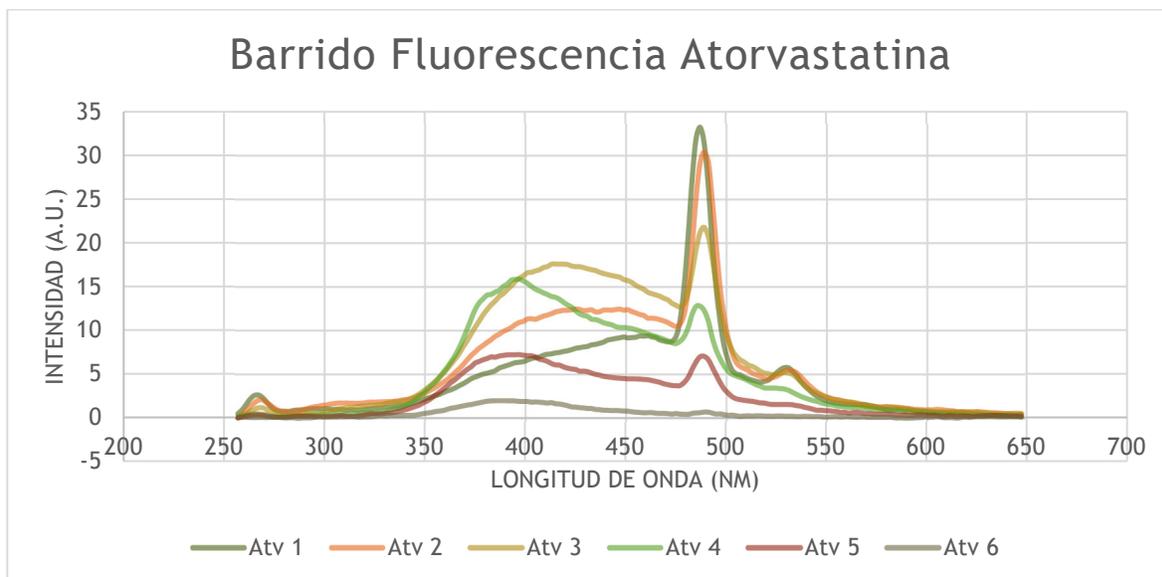


En esta gráfica se observa que la metformina emite fluorescencia en todo el espectro muestreado de manera irregular y no es posible percibir un máximo de emisión, el cual se pueda monitorear con mayor facilidad. A pesar de que no se tiene un máximo de fluorescencia, sí se observa en la gráfica una tendencia de aumento en la fluorescencia proporcional al aumento en la concentración de las soluciones, por lo que probablemente el método podría ser empleado para medir concentraciones mayores de metformina a las requeridas en esta investigación.

El pico que se observa en la dilución 4 aproximadamente a los 420 nm, puede deberse a la presencia de alguna partícula en la solución ya que no se observa el mismo comportamiento en las demás soluciones, incluso en las de mayor concentración.

Ahora se muestra la gráfica de fluorescencia de las soluciones de la curva de calibración de atorvastatina:

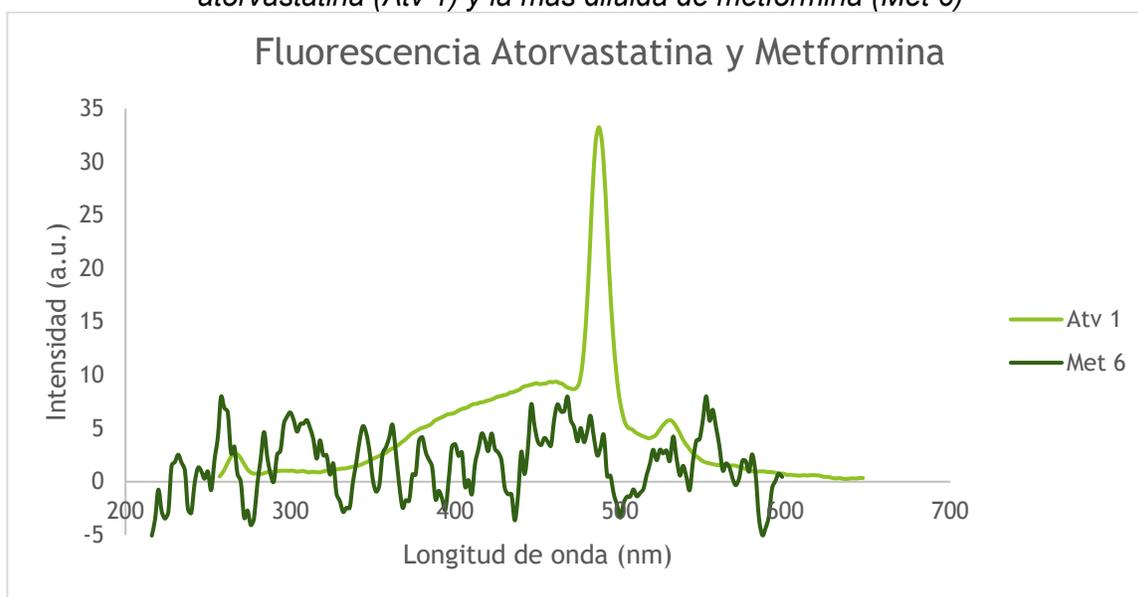
*Gráfica 3. Espectro de fluorescencia de las soluciones de atorvastatina*



En el caso de la atorvastatina, se observa un máximo de emisión de fluorescencia entre 480 y 490 nm, la cual aumenta proporcionalmente con la concentración de las soluciones, por lo que este método se podría considerar como apto para su cuantificación.

Ahora se muestra una gráfica comparativa entre el fenómeno de fluorescencia emitido por la atorvastatina y por la metformina.

Gráfica 4: Comparación del barrido de fluorescencia entre la solución más concentrada de atorvastatina (Atv 1) y la más diluida de metformina (Met 6)



En esta gráfica se comparan las señales de fluorescencia de la solución de menor concentración de atorvastatina (ATV) y la solución de mayor concentración de metformina (MET); esto con la finalidad de hacer notar que la respuesta emitida por la metformina, aún en la solución más concentrada llega apenas a las 9 unidades, siendo ésta mucho menor a la respuesta que presenta la atorvastatina, aún en su solución de menor concentración la cual llega a las 35 unidades, por lo cual no se podría diferenciar la señal que emite cada uno en una solución que contuviera ambos fármacos, y se concluye que este método no es adecuado para poder distinguir la respuesta emitida por cada uno de los fármacos y lograr así su cuantificación en una solución que contenga ambos fármacos bajo estas condiciones.

## 7.2 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

A continuación, se indican las condiciones cromatográficas con las que se logró obtener picos simétricos y resueltos de los fármacos en mezcla, las cuales son iguales tanto para las fases entre metformina-atorvastatina como para las fases metformina-rosuvastatina:

Tabla 23. Condiciones cromatográficas para separación de metformina-estatina:

<b>Fase móvil</b>	Acetonitrilo: acetato de amonio 10 mM 35:65
<b>Flujo</b>	1.8 mL/min
<b>Longitud de onda</b>	249 nm
<b>Volumen de inyección</b>	25 µL
<b>Temperatura columna</b>	35°C

### 7.2.1 INFLUENCIA DEL FILTRO

En la siguiente tabla se indican los resultados de la prueba de influencia del filtro en la concentración de las soluciones. Los cromatogramas de esta prueba se pueden observar en el “Anexo 6”.

Tabla 24. Área del pico de atorvastatina de las soluciones para la prueba de influencia de filtro

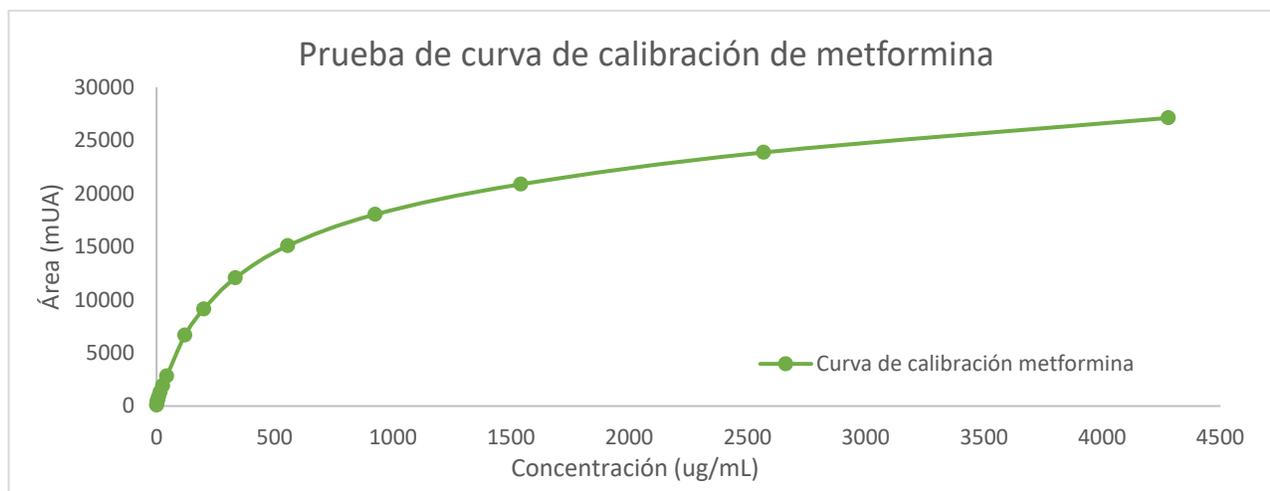
Concentración ATV (µg/mL)	Área 7mL filtrados (mUA)	Área 8mL filtrados (mUA)	Área 9mL filtrados (mUA)	Área 10mL filtrados (mUA)	Sin filtrar
95.2	983.3	1075.2	1082.6	1091.5	1199.3
95.2	983.1	1075.2	1080.0	1091.1	1211.9
95.2	983.5	1075.7	1080.1	1091.4	1199.4
95.2	983.3	1075.4	1080.9	1091.3	1203.5

En los resultados de esta prueba, se observa que al descartar los primeros 6 mL de la solución filtrada y colocar el siguiente mL en un vial, este presenta una concentración menor a la de la solución sin filtrar. Al filtrar de 1 mL en 1 mL y colocarse en distintos viales esta diferencia va disminuyendo hasta después de filtrar 10 mL, ya que, a partir de esta solución, la concentración es muy cercana a la de la solución sin filtrar. Esto se debe a que el filtro va atrapando moléculas de analito, lo cual disminuye la concentración de la solución, hasta que este se satura después de pasar cierta cantidad de solución a través de él. De acuerdo con los resultados de esta prueba indicados en la tabla anterior, se puede determinar que este estado de saturación del filtro se alcanza después de pasar 10 mL de solución a través del filtro, por lo cual las siguientes soluciones fueron filtradas descartando los primeros 15 mL antes de colocar en viales.

### 7.2.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO

La gráfica 5 muestra los resultados de la curva de calibración preparada como prueba para observar el comportamiento de la metformina a diferentes concentraciones.

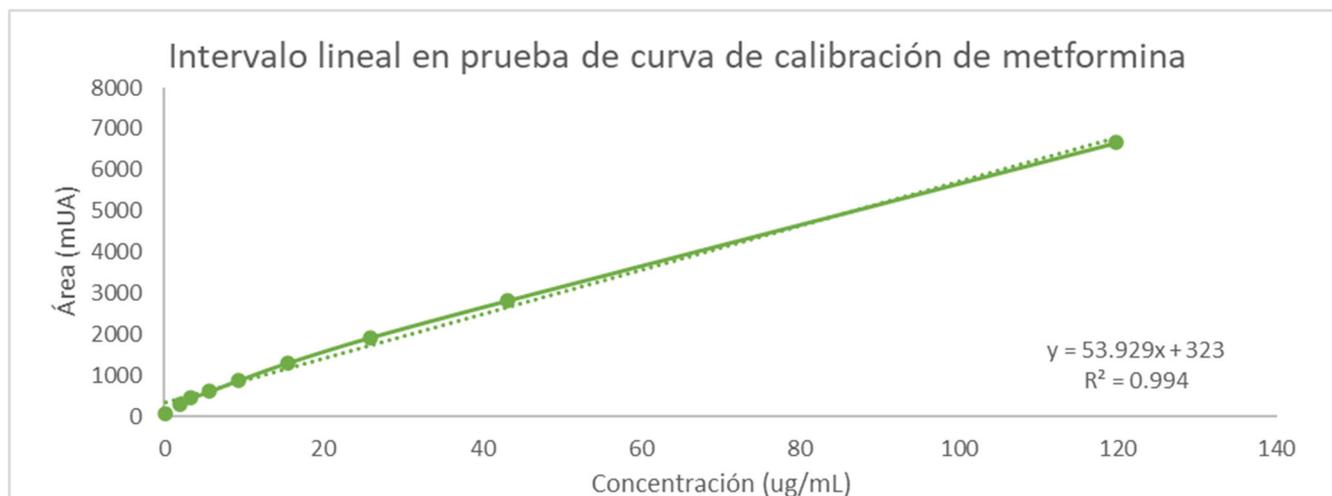
Gráfica 5. Prueba de la curva de calibración de metformina (4280 µg/mL - 0.55 µg/mL)



En esta gráfica se observa que el tipo de comportamiento es una línea curva, sin embargo, esta no se ajusta a algún modelo matemático, incluso al exponencial entre las concentraciones de los 4280 µg/mL a los 0.55 µg/mL, por lo cual se filtraron los datos buscando un intervalo en el cual se pudiera observar un comportamiento lineal y obtener su ecuación, de tal manera que permita determinar la concentración en una solución desconocida.

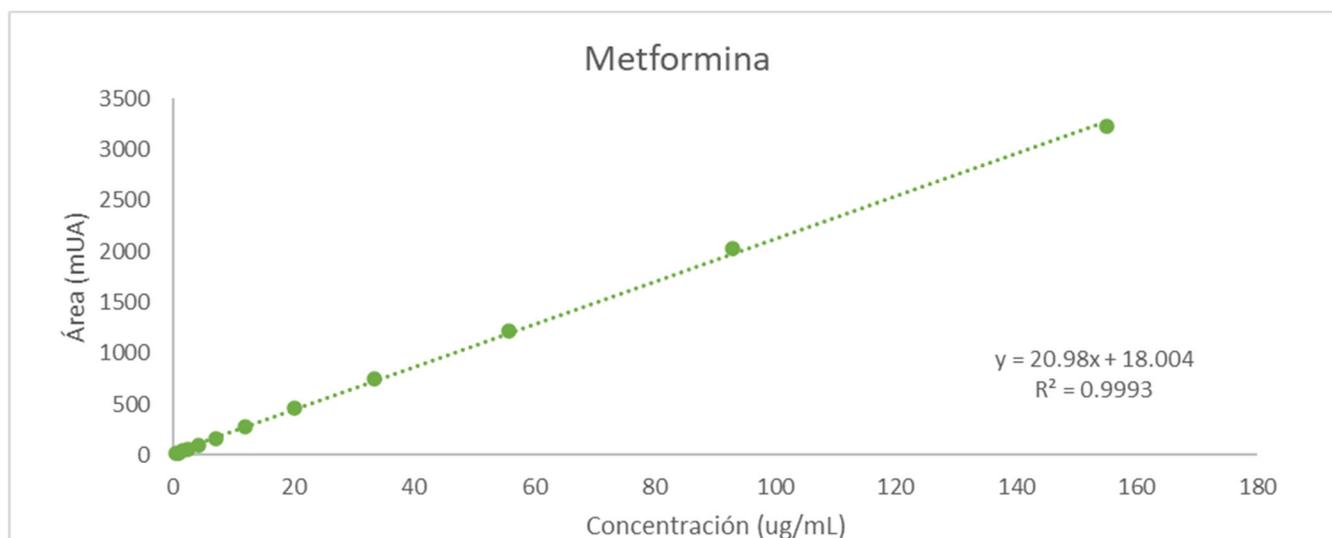
A continuación, se muestra el segmento de la gráfica anterior en donde se tiene un comportamiento lineal.

Gráfica 6. Ampliación del segmento lineal de la curva de calibración inicial (32 µg/mL - 0.55 µg/mL)



En la gráfica anterior se observa un intervalo lineal con un coeficiente de correlación de 0.994 entre los 32 µg/mL y los 0.55 µg/mL, por lo cual se procede a preparar una nueva curva en este intervalo, la cual tenga un menor error. Esta se muestra a continuación:

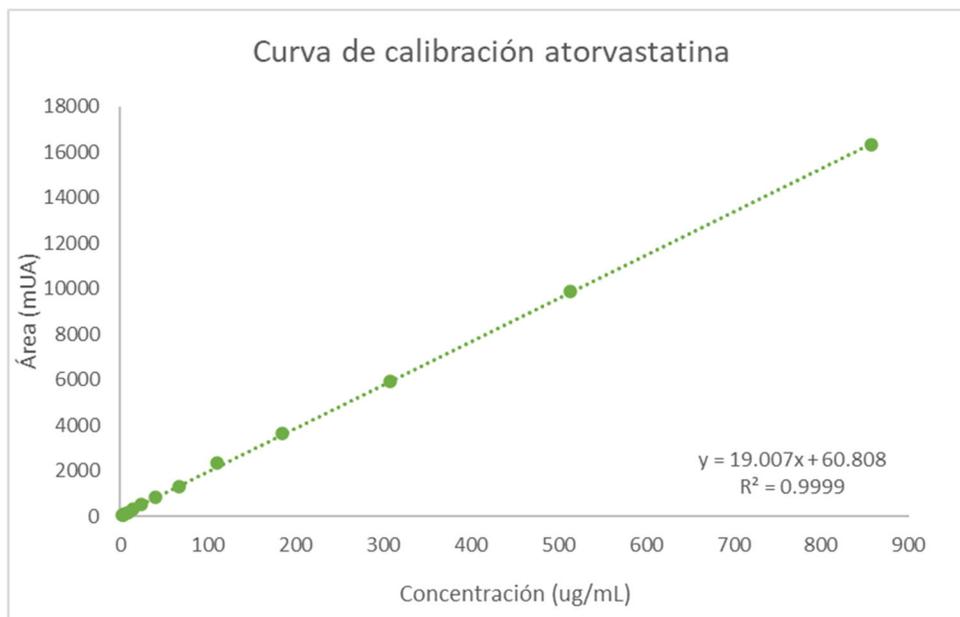
Gráfica 7. Curva de Calibración Metformina (32 µg/mL – 0.5 µg/mL)



En esta nueva curva de calibración, preparada a partir de un stock de menor concentración y únicamente en el intervalo lineal, se observa un mejor coeficiente de correlación comparado con la anterior, por lo cual, se puede decir que sí se logró reducir el error en su preparación.

Se realizó lo mismo para obtener la curva de calibración de la atorvastatina en su intervalo lineal, obteniéndose los siguientes resultados:

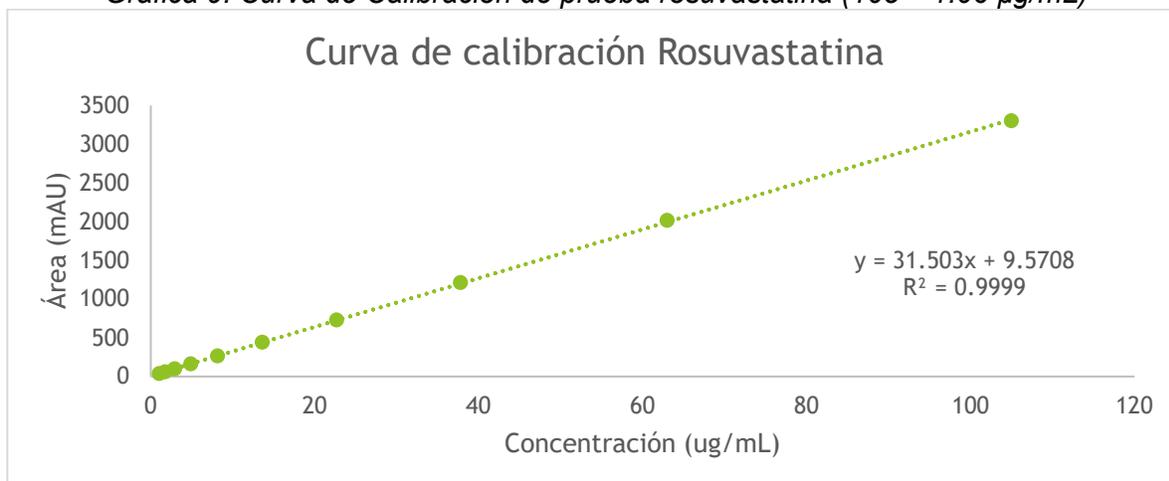
*Gráfica 8. Curva de Calibración de atorvastatina (856.8 µg/mL - 1.865 µg/mL)*



En esta curva de calibración, se observa que el intervalo es lineal en todo en rango de concentraciones probadas, por lo cual, se empleará esta curva para determinar la concentración en las soluciones problema mediante la ecuación indicada.

Se muestra ahora la curva de calibración de la rosuvastatina:

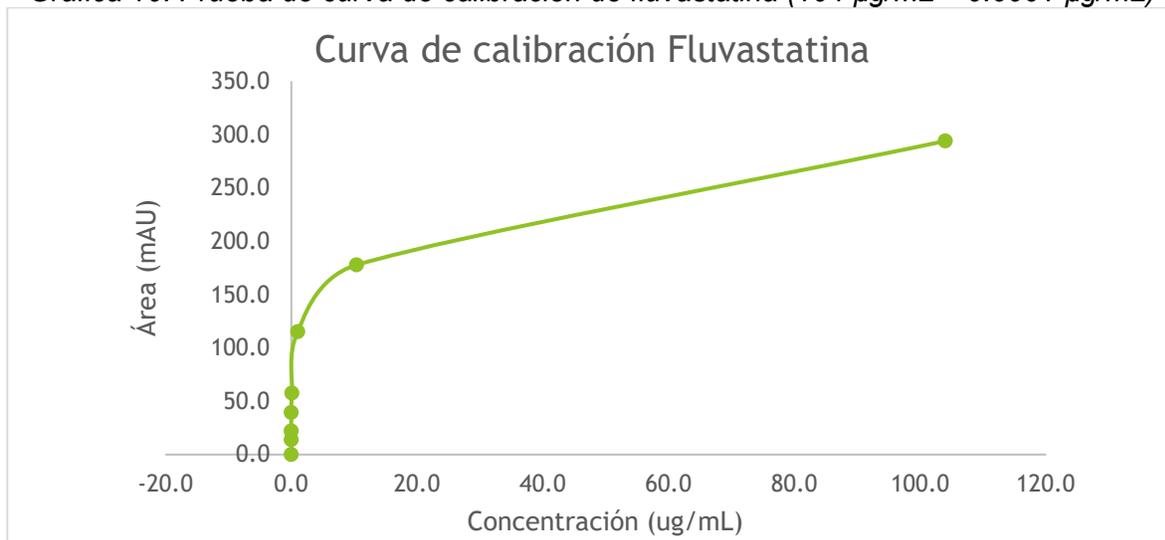
*Gráfica 9. Curva de Calibración de prueba rosuvastatina (105 – 1.06 µg/mL)*



Para los casos de la atorvastatina y la rosuvastatina, el comportamiento lineal se observa incluso a altas concentraciones, por lo cual se puede adaptar la curva de calibración a las concentraciones necesarias siempre y cuando se encuentre dentro de estas concentraciones o en otras donde se demuestre linealidad.

Se muestra a continuación la curva de calibración de prueba para la fluvastatina:

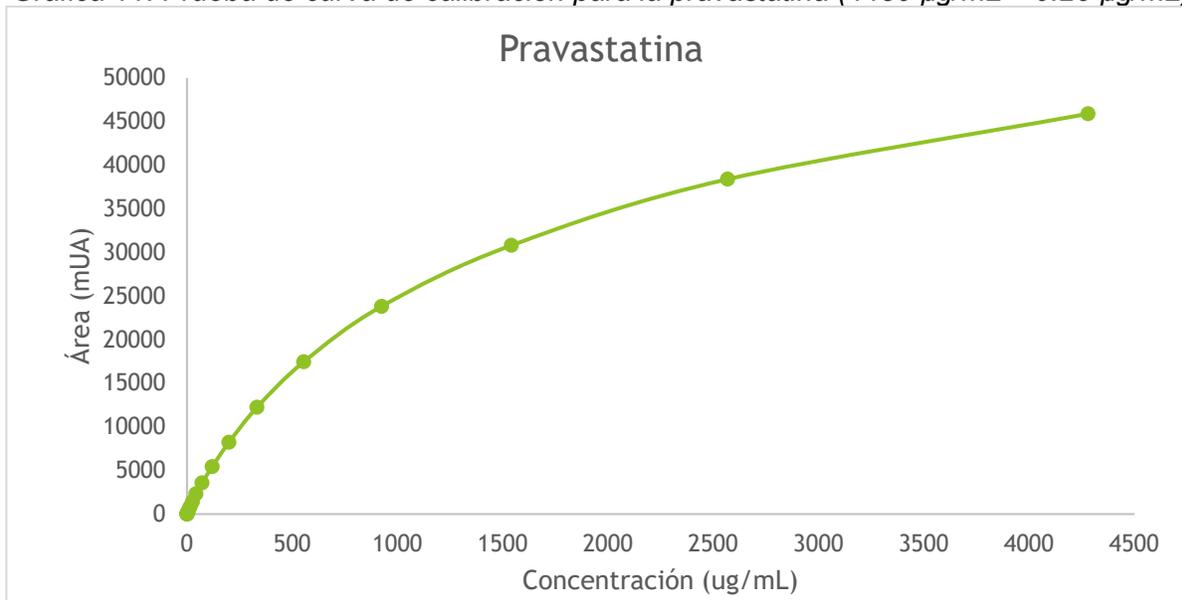
Gráfica 10. Prueba de curva de calibración de fluvastatina (104  $\mu\text{g/mL}$  – 0.0001  $\mu\text{g/mL}$ )



Como se observa en esta gráfica, el comportamiento que tiene la fluvastatina en el intervalo de prueba, no se puede definir en este experimento, sin embargo, se podría preparar nuevamente a concentraciones menores para observar la tendencia de manera más clara.

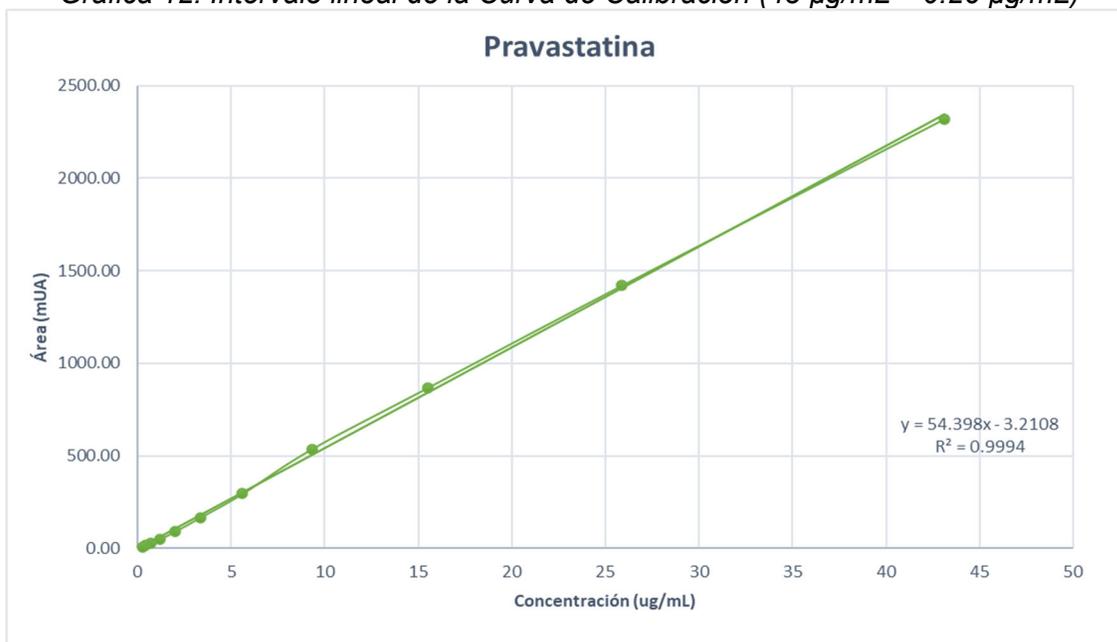
Los resultados de las pruebas realizadas para la pravastatina también se presentan a continuación:

Gráfica 11. Prueba de curva de calibración para la pravastatina (4450  $\mu\text{g/mL}$  – 0.26  $\mu\text{g/mL}$ )



Para esta estatina, también se buscó si se tenía un intervalo de comportamiento lineal en la gráfica, encontrándose a las concentraciones indicadas en la siguiente gráfica:

Gráfica 12. Intervalo lineal de la Curva de Calibración (43 µg/mL – 0.26 µg/mL)



Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la pravastatina y fluvastatina fueron descartadas durante esta fase de la investigación al no presentar problemas de solubilidad experimentalmente.

## 7.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS FASES SOMETIDAS A MOLIENDA

### 7.3.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

A continuación, se muestran las imágenes de la espectroscopía electrónica de barrido realizada a los fármacos y a las fases sólidas formadas entre las mezclas después del proceso de molienda, realizadas con la finalidad de evidenciar el cambio de su morfología que sugiera la formación de una nueva fase.

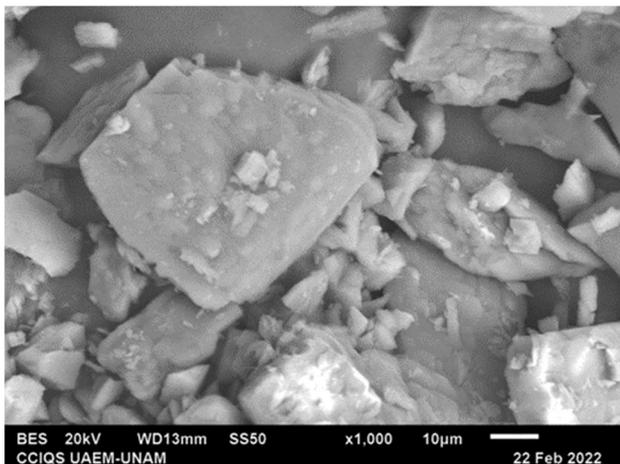


Ilustración 14. Metformina

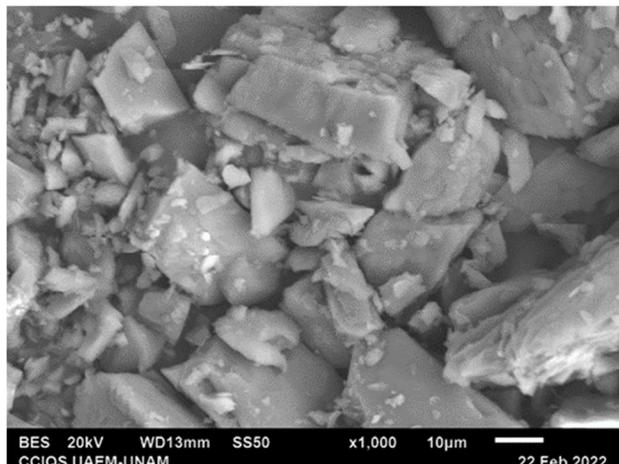


Ilustración 15. Metformina

En la ilustración 14 se observan tamaños de grano grandes e irregulares de metformina con esquinas muy marcadas, las cuales se ven disminuidas en su volumen en la ilustración 15, después del proceso de molienda al que fue sometido, sin embargo, la morfología no se ve modificada.

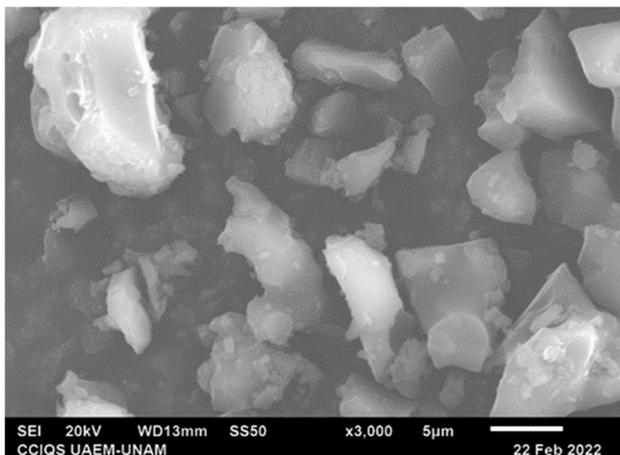


Ilustración 16. Rosuvastatina

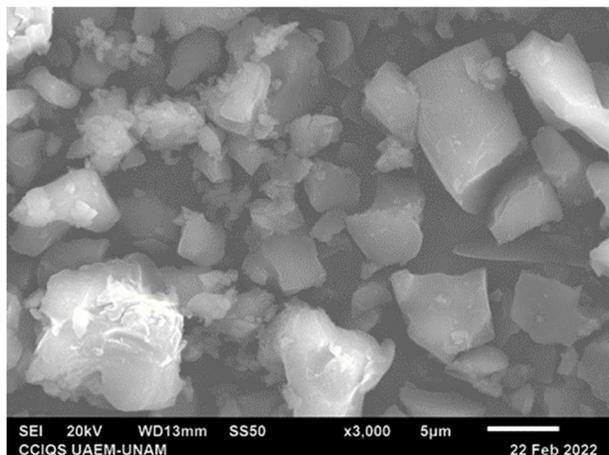


Ilustración 17. Rosuvastatina

Al igual que en el caso de la metformina, en las ilustraciones 16 y 17 se observa que la morfología cristalina de la rosuvastatina no se ve modificada cuando se somete al proceso de molienda, sino que se observa únicamente una disminución en el tamaño.

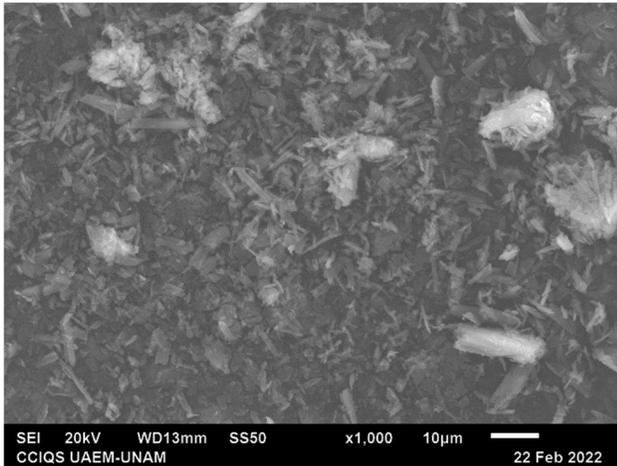


Ilustración 18. Atorvastatina SR

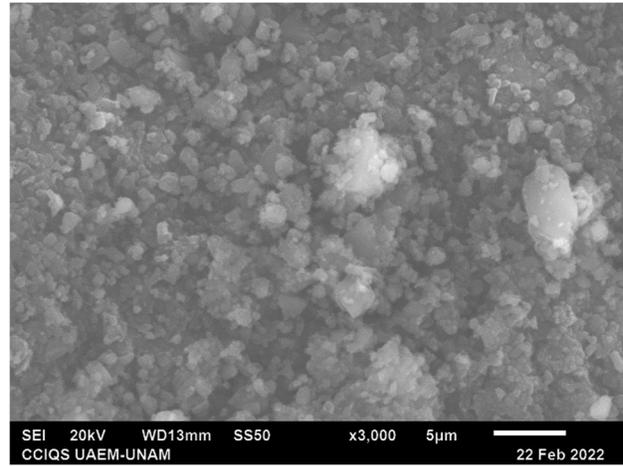


Ilustración 19. Atorvastatina MOL

Las ilustraciones en la tabla anterior de lado derecho muestran la sustancia de referencia (SR) de atorvastatina a distintos acercamientos, mientras que de lado izquierdo se muestra el fármaco sometido a molienda, de igual manera, a distintos acercamientos. El caso de la atorvastatina difiere al de la metformina y la rosuvastatina, ya que en las ilustraciones se observa que su morfología se ve modificada al ser sometida a molienda, pasando de agujas a formas redondeadas.

Ahora se muestran los resultados de las mezclas sometidas a molienda entre la metformina y la atorvastatina en las estequiometrías 1:1, 1:2 y 2:1.

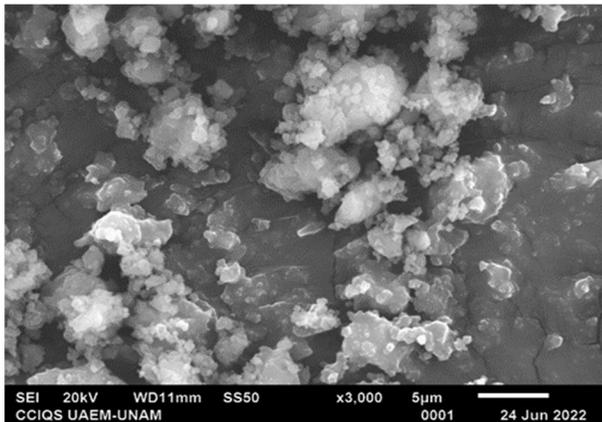


Ilustración 20. Metformina-atorvastatina 1:1 sometida a molienda

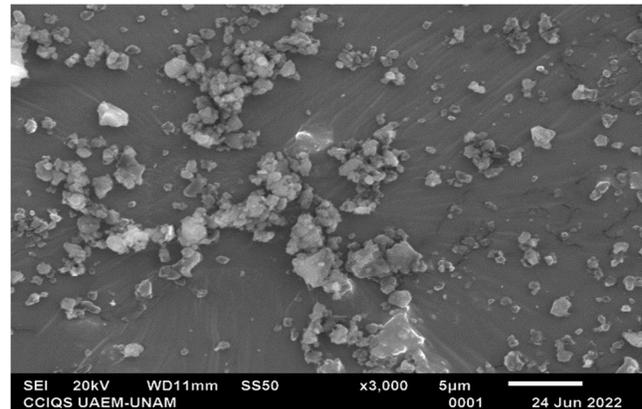
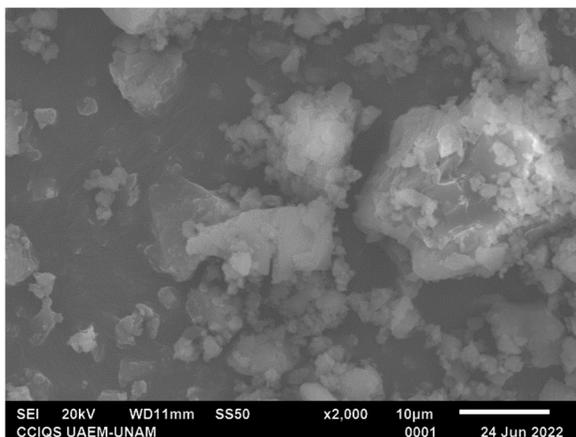


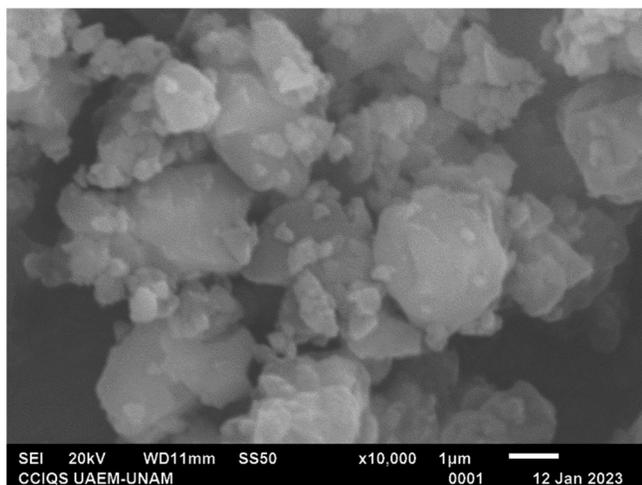
Ilustración 21. Metformina-atorvastatina 1:2 sometida a molienda



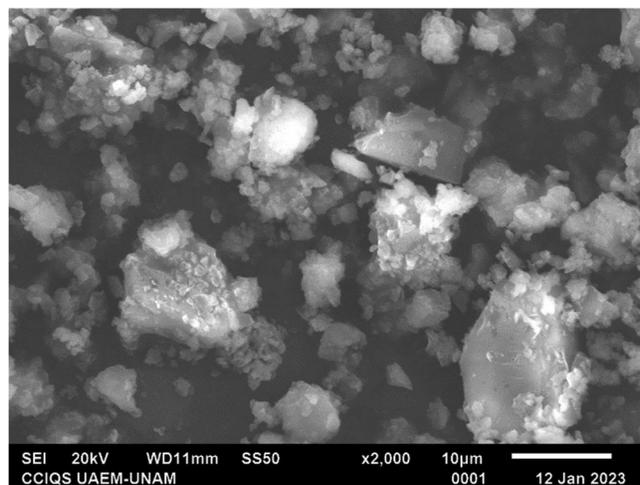
*Ilustración 22. Metformina-atorvastatina 2:1 sometida a molienda*

En las ilustraciones 20, 21 y 22 se observa que las fases sometidas a molienda entre la metformina y la atorvastatina tienen una morfología redondeada, muy distinta a las agujas que se observan en las sustancias de referencia de los fármacos, lo cual es indicativo de la formación de una nueva fase.

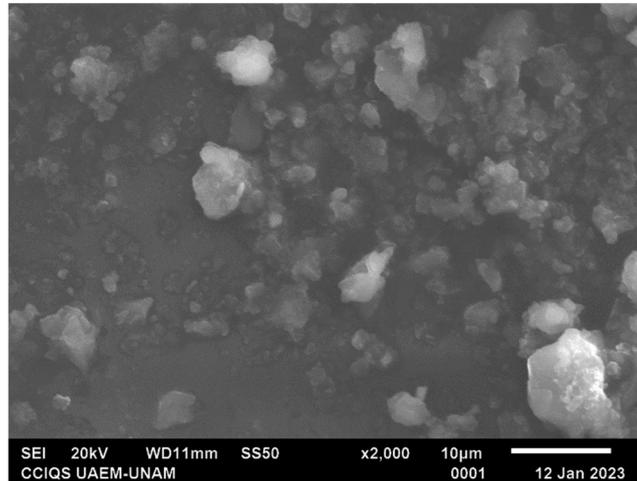
Se muestran ahora, las imágenes de espectroscopía electrónica de barrido de las mezclas sometidas a molienda entre la metformina y la rosuvastatina en las estequiometrías 1:1, 1:2 y 2:1



*Ilustración 23. Metformina-rosuvastatina 1:1 sometida a molienda*



*Ilustración 24. Metformina-rosuvastatina 1:2 sometida a molienda*

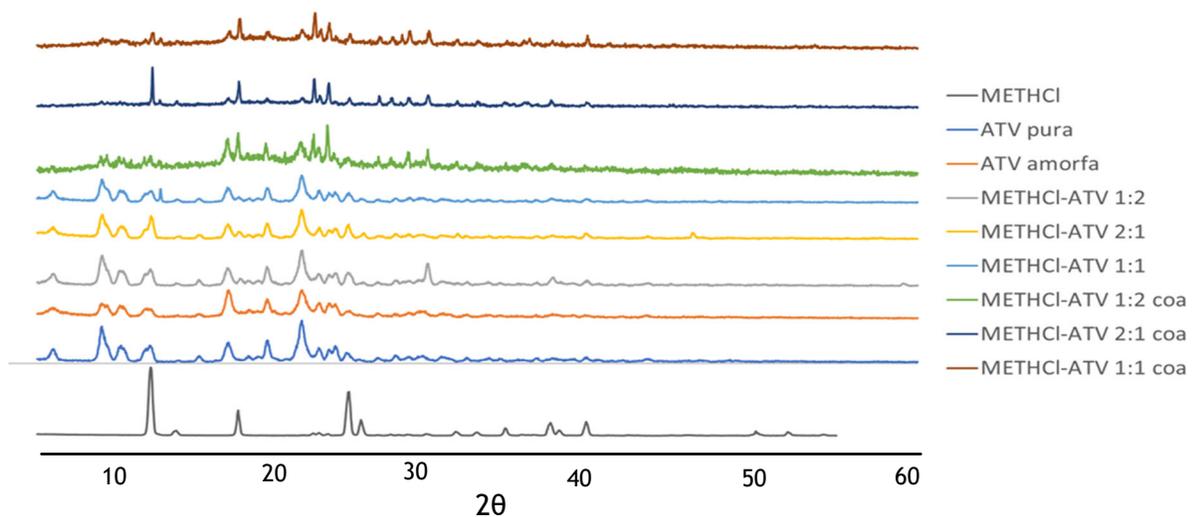


*Ilustración 25. Metformina-rosuvastatina 2:1 sometida a molienda*

Al igual que las fases formadas entre la metformina y la atorvastatina, las imágenes 23, 24 y 25 muestran que las mezclas de metformina y rosuvastatina sometidas a molienda forman morfologías redondeadas, sugiriendo la formación de nuevas fases entre ambos fármacos.

### 7.3.2 DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVOS (DRXP)

A continuación, se observan los gráficos de Difracción de Rayos X de Polvos (DRXP)



*Ilustración 26. Difracción de rayos X de los fármacos solos, las mezclas físicas y las mezclas sometidas a molienda.*

En la ilustración 26 se muestra el patrón de la difracción de rayos x de los fármacos, las mezclas físicas y las mezclas sometidas a molienda. En la parte inferior de la ilustración se observa en color gris oscuro la metformina, en color azul rey la atorvastatina y en color anaranjado la atorvastatina sometida a molienda. Al comparar los patrones de difracción de los fármacos en su estado como sustancia de referencia, las mezclas físicas y los coamorfos se puede definir si existe un cambio, lo cual sugiere la formación de una nueva fase sólida, como se observa en la ilustración 22 a continuación:

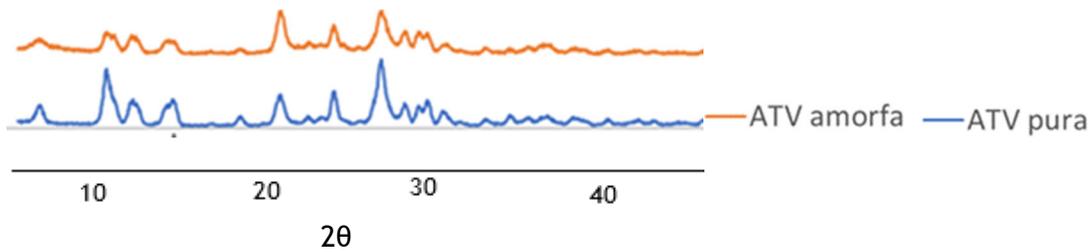


Ilustración 27. Comparación entre la difracción de rayos x de la atorvastatina como sustancia de referencia y la atorvastatina pura.

En esta ilustración, se observa que la difracción de la atorvastatina como sustancia de referencia es de mayor intensidad en ciertas zonas en específico, lo cual sugiere que tiene una estructura un poco más cristalina que la de la atorvastatina sometida al proceso de molienda, en donde se observa un patrón de difracción menos definido y concentrado en ciertas áreas, lo cual sugiere que la muestra sufrió un cambio estructural de amorfización.

A continuación, en la ilustración 28, se observa que en las 3 gráficas en la parte superior correspondientes a las mezclas físicas entre metformina y atorvastatina aún son muy marcados los patrones de difracción en zonas específicas, muy parecidas a la difracción que emiten las moléculas solas.

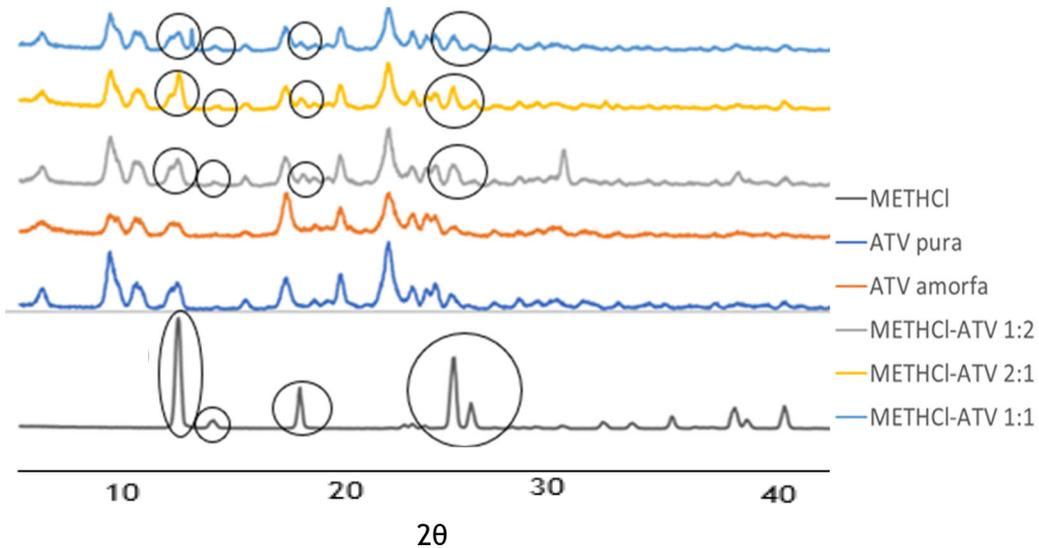
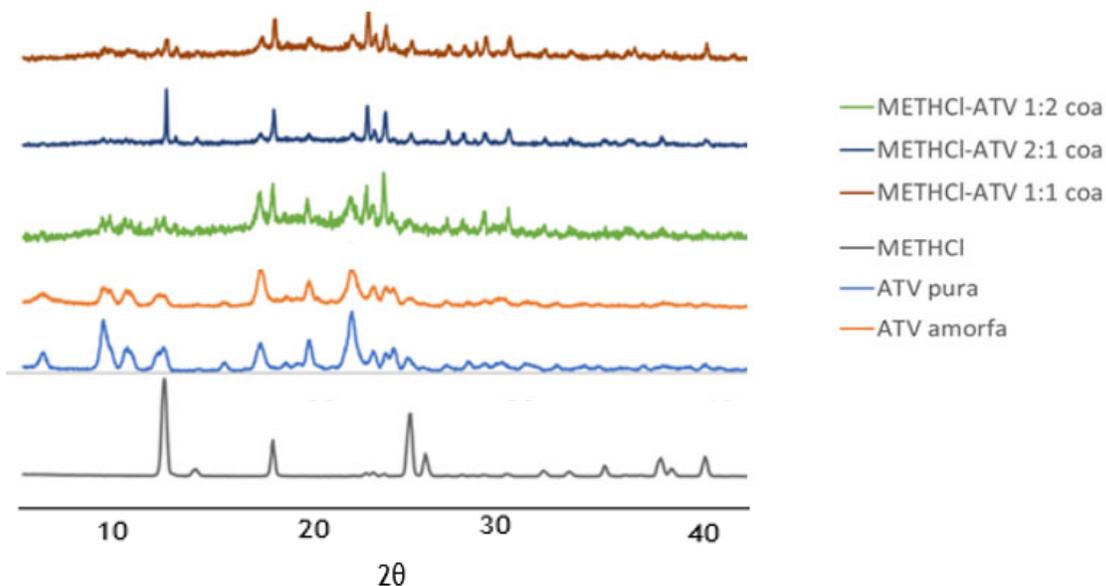


Ilustración 28. Difracción de rayos x de los fármacos solos y las mezclas físicas entre MET-ATV

En las mezclas sometidas a molienda, este patrón de difracción se observa menos focalizado como se muestra en la siguiente ilustración:

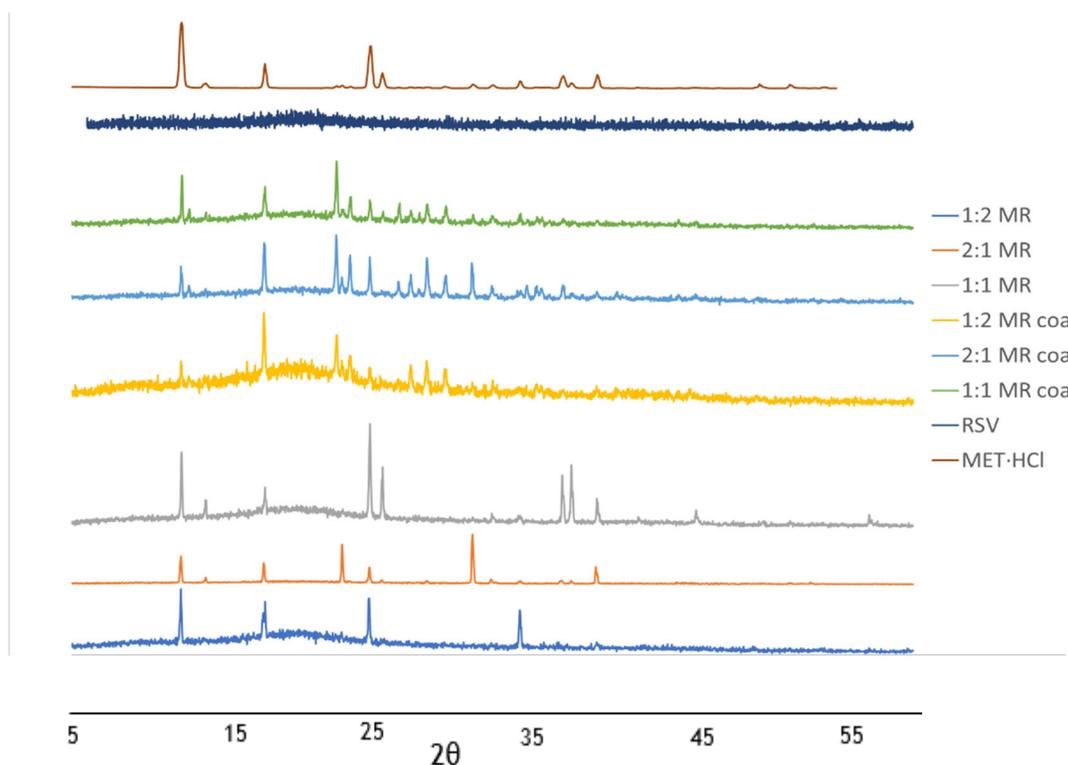


*Ilustración 29. Comparación entre las mezclas sometidas a molienda y los fármacos solos.*

Esta disminución en los patrones de difracción focalizados sugiere, de igual manera, la formación de una nueva fase.

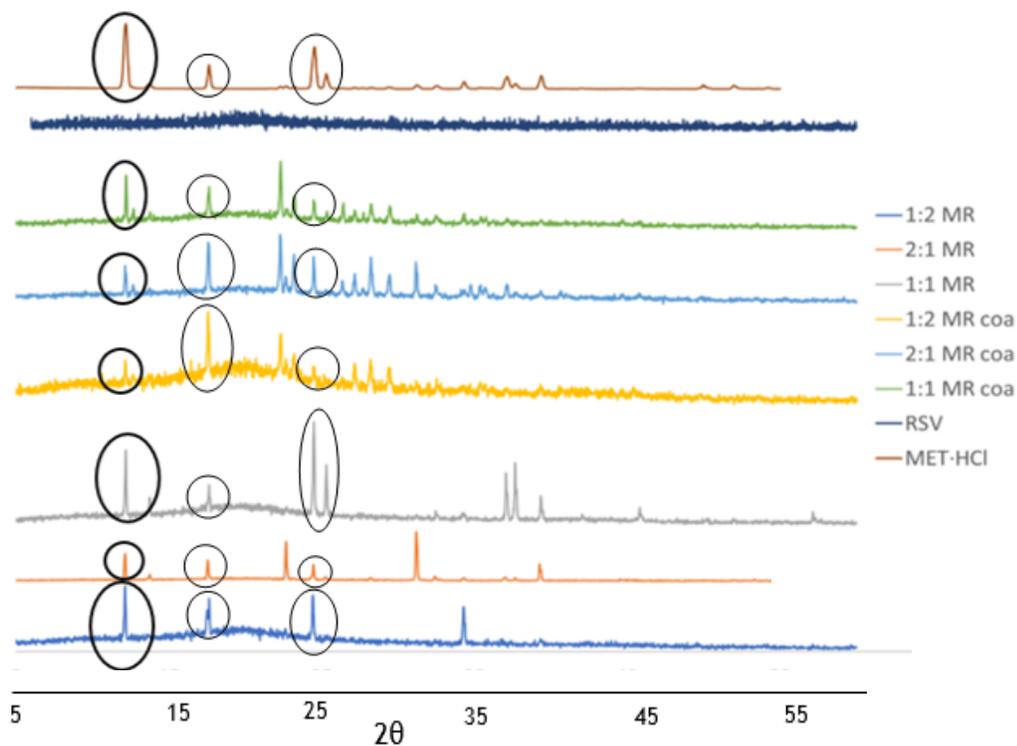
Lo anterior concuerda con los resultados observados en la microscopía electrónica de barrido, ya que las mezclas sometidas a molienda presentan morfología más redondeada, por lo cual, la focalización de las zonas de difracción se ve también disminuida.

A continuación, se muestran los resultados de la prueba para las mezclas físicas y las fases sometidas a molienda entre metformina y rosuvastatina:



*Ilustración 30. Difracción de rayos X de los fármacos solos, las mezclas físicas y las mezclas sometidas a molienda entre metformina y rosuvastatina.*

En esta gráfica se observa el patrón de la rosuvastatina sustancia de referencia en color azul fuerte; en este se pueden apreciar picos continuos, de tamaño similar y sin un patrón definido. Esto puede deberse a que durante el desarrollo de la prueba se tuviera alguna interferencia en el equipo. Desafortunadamente, para este fármaco no se sometió a prueba su fase sometida a molienda, por lo que no se cuenta con alguna referencia para comparar si hubo algún cambio en la morfología del fármaco solo, sin embargo, a continuación, se discuten las diferencias encontradas entre las mezclas de metformina y rosuvastatina, así como de sus fases sometidas a molienda.



*Ilustración 31. Comparación entre la difracción de rayos X de la metformina, las mezclas físicas y las mezclas sometidas a molienda de las fases entre metformina y rosuvastatina.*

En esta ilustración se puede observar que el patrón de difracción de la metformina se conserva en las mezclas físicas, sin embargo, la intensidad se ve modificada en cada una de las demás fases debido a la cantidad, ya que se encuentra en combinación con otros fármacos. Ya que no se cuenta con el patrón de difracción de la rosuvastatina, no se puede saber si esta también presenta un patrón de difracción focalizado y, por lo tanto, tampoco es posible definir si esto se debe a que el proceso de molienda fue manual o a la naturaleza misma de la metformina como sustancia de referencia ya que esto mismo se observa tanto en las mezclas físicas como en las sometidas a molienda. Sin embargo, en el caso de las muestras coamorfos (1:2 MR coa; 2:1 MR coa y 1:1 MR coa) se observa la contribución amórfica (halo). En estos casos, es evidente observar que la rosuvastatina se amorfiza y la metformina no. Previamente, en el sistema coamorfo metformina-nateglinida se ha reportado que la metformina es reacia a amorfizarse y solo lo hace parcialmente por medio de molienda [11]. En este caso sucedió lo mismo. La muestra 1:2 MR coa es la que presenta mayor contribución amórfica, lo cual es congruente debido a que la rosuvastatina se encuentra en exceso.

## 7.4 PRUEBA DE SOLUBILIDAD

Una vez realizadas las curvas de calibración de la metformina y la atorvastatina solas, se puede obtener la ecuación de cada una de estas e interpolar el valor de absorbancia de cada pico en el cromatograma para conocer la concentración de cada fármaco en las soluciones de la prueba de solubilidad.

A continuación, se muestra una tabla con los valores de esta la ecuación de la curva de calibración para la metformina y la atorvastatina:

*Tabla 25. Variables obtenidas de la curva de calibración de atorvastatina y metformina.*

Variable	Atorvastatina	Metformina
b	19.007	20.98
m	60.808	18.004
r <sup>2</sup>	0.9999	0.9993

En la tabla 26, se muestran los resultados de dos ensayos de la prueba de solubilidad realizada a la atorvastatina SR (sustancia de referencia) en agua y en fase móvil, la atorvastatina sometida a molienda, las mezclas físicas entre la metformina y la atorvastatina y las fases formadas al llevar a cabo la molienda:

*Tabla 26. Resultados de la prueba de solubilidad*

Fármaco/fase	Ensayo 1				Ensayo 2			
	Área Atv	Área Met						
ATV SR/agua	1245.47	N/A	1246.67	N/A	1199.50	N/A	1202.71	N/A
ATV MOL/agua	1221.43	N/A	1220.08	N/A	1194.58	N/A	1197.12	N/A
ATV SR/Fase Móvil	1207.34	N/A	1206.28	N/A	1239.26	N/A	1239.83	N/A
MET:ATV 1:2 MF	1199.70	110.10	1197.70	110.32	1094.94	132.99	1103.43	132.98
MET:ATV 1:2 MOL	1205.46	141.46	1204.05	141.72	1087.56	131.72	1089.54	132.07
MET:ATV 1:1 MF	1194.17	187.93	1194.17	187.68	1134.64	230.42	1126.60	230.38
MET:ATV 1:1 MOL	1211.42	227.75	1210.37	227.52	1207.00	216.04	1208.72	216.32
MET:ATV 2:1 MF	1032.75	572.34	1034.80	573.73	1427.82	530.57	1431.81	530.84
MET:ATV 2:1 MOL	1252.30	437.10	1255.43	437.63	1261.57	444.23	1258.70	444.14

En donde:

SR= Sustancia de referencia

MOL= mezcla sometida al proceso de molienda

MF= mezcla física

A continuación, se muestra la tabla en la cual se promedian las dos inyecciones de cada ensayo:

Tabla 27. Promedio de las áreas de metformina y atorvastatina de la prueba de solubilidad

Fármaco/ fase	Concentración (µg/mL)		̄ Área atorvastatina	̄ Área metformina	̄ Área atorvastatina	̄ Área metformina
	1	2	Ensayo 1		Ensayo 2	
Atorvastatina SR/agua	100	100	1246.06775	N/A	1201.10553	N/A
Atorvastatina MOL/agua	100	100	1220.75625	N/A	1195.85077	N/A
Atorvastatina SR/FM	100	100	1206.80738	N/A	1239.54547	N/A
MET:ATV 1:2 MF	114	114	1198.69739	110.20981	1099.18152	132.987225
MET:ATV 1:2 MOL	114	114	1204.75775	141.58580	1088.54779	131.893635
MET:ATV 1:1 MF	127	127	1194.17011	187.80704	1130.61731	230.40045
MET:ATV 1:1 MOL	127	127	1210.89569	227.63485	1207.85675	216.181045
MET:ATV 2:1 MF	155	156	1033.77509	573.03547	1429.815185	530.704895
MET:ATV 2:1 MOL	155	156	1253.86194	437.36722	1260.132755	444.18248

Para hacer el cálculo de la concentración de cada fármaco, se empleó la ecuación de la recta:

$$y = mx + b$$

Se despejó la variable x de la siguiente manera

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Y se sustituyó de acuerdo con las variables obtenidas de las curvas de calibración de la atorvastatina y la metformina indicadas en la tabla 26. A continuación se presenta un ejemplo de este cálculo para la concentración de la atorvastatina en el ensayo 1 de la solución de la sustancia de referencia en agua:

$$x = \frac{1246.06775 - 19.007}{60.808} = 20.17927 \mu g/mL$$

Se muestra a continuación un ejemplo del cálculo de la concentración de metformina en la mezcla física met:atv 1:2

$$x = \frac{110.20981 - 20.98}{18.004} = 4.95611$$

Los resultados de la prueba de solubilidad de atorvastatina, mezclas físicas y mezclas sometidas a molienda se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 28. Resultados de la prueba de solubilidad.

Fármaco/ fase	Atv E1	Atv E2	Met E1	Met E2
Atorvastatina SR/agua	20.17927	19.43985	0.0	0.0
Atorvastatina mol/agua	19.76301	19.35344	0.0	0.0
Atorvastatina SR/FM	19.53362	20.07200	0.0	0.0
Met:atv 1:2 MF	19.40025	17.76369	4.95611	6.22124
Met:atv 1:2 MOL	19.49991	17.58882	6.69883	6.16050
Met:atv 1:1 MF	19.32580	18.28066	9.26611	11.63188
Met:atv 1:1 MOL	19.60085	19.55088	11.47827	10.84209
Met:atv 2:1 MF	16.68807	23.20103	30.66293	28.31176
Met:atv 2:1 MOL	20.30744	20.41057	23.12748	23.50603

La comparación entre los resultados de la concentración en el ensayo 1 y 2, muestra diferencias, con lo cual se puede concluir que el mezclado no es homogéneo y que es necesario emplear otra técnica para que este lo sea. Aparentemente, la molienda por medio de mortero y pistilo puede dar lugar a formas sólidas diferentes a las obtenidas por medio del proceso realizado con una moledora automatizada. Se ha observado que la molienda por medio de equipos comparado con molienda con mortero; pueden proporcionar una mayor entrada de energía, los tiempos de reacción pueden programarse de forma más sistemática (mejorando la reproducibilidad) y ofrece una mejor mezcla (transferencia de masa y energía) entre los componentes involucrados [12].

A continuación, se muestran en la tabla 29, la comparación entre los valores de concentración de atorvastatina obtenidos a partir de las curvas de calibración y el calculado de forma teórica:

Tabla 29. Concentración teórica de atorvastatina y metformina en cada solución.

Fármaco/ fase	Concentración teórica (µg/mL)		Concentración calculada (µg/mL)	
	ATV1	MET1	ATV1	MET 1
Atorvastatina SR/agua	100	0	19.8	0.0
Atorvastatina MOL/agua	100	0	19.6	0.0
Atorvastatina SR/FM	100	0	19.8	0.0
MET:ATV 1:2 MF	100.30	13.70	18.6	5.6
MET:ATV 1:2 MOL	100.30	13.70	18.5	6.4
MET:ATV 1:1 MF	99.73	27.27	18.8	10.4
MET:ATV 1:1 MOL	99.73	27.27	19.6	11.2
MET:ATV 2:1 MF	100.21	54.79	19.9	29.5
MET:ATV 2:1 MOL	100.21	54.79	20.4	23.3

En la tabla 29, se puede observar que las concentraciones teóricas y las calculadas mediante curva de calibración son muy diferentes, esto puede deberse a que la curva de calibración fue preparada en días distintos a cuando se ejecutó la prueba de solubilidad, por esta razón se recomienda que esta sea preparada el mismo día del análisis para verificar si es idóneo hacer el cálculo de la concentración de los fármacos por este medio.

Por otro lado, con la solución preparada de atorvastatina en fase móvil, se puede hacer el cálculo de la concentración en las demás soluciones si la empleamos como un patrón de referencia. Se utilizó esta solución ya que, al estar disuelta en fase móvil, se asegura que el total de los fármacos se encuentra disuelto.

Para hacer el cálculo de atorvastatina en las soluciones se requiere calcular la concentración de atorvastatina en la solución:

$$\frac{10.0 \text{ mg Atv}}{100 \text{ mL}} = 100 \mu\text{g/mL}$$

Con la absorbancia de esta solución y la concentración se puede hacer el cálculo de la atorvastatina en las demás soluciones. A continuación, se muestra el ejemplo del cálculo de la atorvastatina en la solución de la mezcla física entre metformina y atorvastatina en estequiometría 1:2:

$$\frac{1198.69739 \times 100 \mu\text{g/mL}}{1206.80738} = 99.32798 \mu\text{g/mL}$$

En donde:

1206.80738= área de la solución estándar de atorvastatina en fase móvil

100 $\mu$ g/mL= concentración de la solución estándar

1198.69739= área de la atorvastatina en la solución problema

Con esta fórmula se puede calcular la cantidad de atorvastatina en cada solución, sin embargo, no se puede determinar la cantidad de metformina ya que no se preparó una solución de referencia al no ser el fármaco de interés en aumentar su solubilidad.

A continuación, se muestran los resultados de las concentraciones de atorvastatina en las soluciones preparadas, calculado a partir de una solución estándar.

Tabla 30. Concentración de atorvastatina en las soluciones calculada a partir de un estándar

Fármaco/fase	Concentración atorvastatina (µg/mL)			
	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio	Teórica
Atorvastatina SR/agua	103.3	99.4	101.3	100.0
Atorvastatina MOL/agua	101.2	99.0	100.1	100.0
Atorvastatina SR/FM	100.0	102.7	101.3	100.0
Met:atv 1:2 MF	99.3	90.7	95.0	100.30
Met:atv 1:2 MOL	99.8	90.1	95.0	100.30
Met:atv 1:1 MF	99.0	94.0	96.5	99.73
Met:atv 1:1 MOL	100.3	100.0	100.2	99.73
Met:atv 2:1 MF	85.7	118.3	102.0	100.21
Met:atv 2:1 MOL	103.9	104.5	104.2	100.21

En los resultados de la tabla anterior, se puede observar que la concentración calculada por medio de una solución stock, es muy parecida a la concentración teórica, incluso se asemeja más que la concentración calculada con las curvas de calibración.

Finalmente, en la cantidad de atorvastatina disuelta, se puede observar que esta mantiene su solubilidad, ya que la concentración de atorvastatina en todas las preparaciones a las distintas estequiometrías es la misma que la solución preparada en fase móvil.

## 8. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se muestran los resultados de microscopia de barrido electrónico y los de difracción de rayos X de polvos, en los cuales se sugiere la formación de una nueva fase sólida entre la metformina y la atorvastatina después de someterse a un proceso de molienda por medio de mortero. Sin embargo, los resultados de las pruebas de solubilidad indican que esta propiedad en la atorvastatina no se ve modificada. Esto puede atribuirse a que regularmente los resultados obtenidos por medio de molienda con mortero y molienda empleando equipos automatizados pueden ser diferentes [12]. Probablemente esto influyó en que no lográramos el objetivo de modificar la solubilidad de la ATV mediante la preparación de estas formas sólidas. Lamentablemente, el que estuviese descompuesta la molidora durante el desarrollo del proyecto y la pandemia por COVID-19, evitó que lleváramos a cabo la reacción con este equipo, como se describe en la tesis "Preparación por métodos mecanoquímicos de sales fármaco:fármaco conteniendo agentes farmacéuticos para el control glicémico en presencia de diversas estatinas para el potencial tratamiento de diabetes hiperlipidémica" realizada por el Químico Chrystian Rivas Arzate de la Facultad de Química-UNAM. Actualmente la molidora está funcionando y se llevarán a cabo de nuevo estos experimentos para corroborar si la preparación de estas formas sólidas (mortero vs equipo automatizado) influyen en la meta de modificar la solubilidad de ATV y RSV.

## 9. REFERENCIAS

- [1] Escobedo de la Peña J., Buitrón Granados L. V., Ramírez Martínez, J. C. Chavira Mejía, R. Schargrotsky H., Marcet Champagne B. (2011) Diabetes en México. Estudio CARMELA. Revista Cirugía y Cirujanos. Volumen 79, nº 5, pp. 424-431.
- [2] Aguilar Salinas C. A., Aschner P. y colaboradores (2019) Guías ALAD sobre el Diagnóstico, Control y Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 con Medicina Basada en Evidencia. Revista de la Asociación Latinoamericana de la Diabetes. Edición 2019.
- [3] Murillo M. D. (2004), Guía de seguimiento farmacoterapéutico sobre diabetes. Grupo de Investigación en Atención Farmacéutica CTS-131. Universidad de Granada, [https://www.ugr.es/~cts131/esp/guias/GUIA\\_DIABETES.pdf](https://www.ugr.es/~cts131/esp/guias/GUIA_DIABETES.pdf)
- [4] Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2021). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 13.0 Edición. Capítulo generalidades, solubilidad página 15
- [5] Sathisaran I., Dalvi S. (2018). Engineering Cocrystals of Poorly Water-Soluble Drugs to Enhance Dissolution in Aqueous Medium. Revista Pharmaceutics. doi: 10.3390/pharmaceutics10030108
- [6] Jagadeesh N., Nangia A. (2011). Solubility Advantage of Amorphous Drugs and Pharmaceutical Cocrystals, Crystal Growth & Design. Revista American Chemical Society. Volumen 10th Anniversary. Páginas 2662-2679.
- [7] Skoog D. A., West D. M., Holler J. (2001). Fundamentos de Química Analítica. Cuarta Edición. Volumen 1. Editorial Reverté. Capítulo 24 Espectroscopía atómica basada en radiación ultravioleta y visible. Páginas 613-638,
- [8] Dong M. y Ahuja S. (2005). Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. Volumen 6. Publicado en Elsevier Academy Press. Capítulo 2: Conceptos clave de HPLC en análisis farmacéuticos y capítulo 4: Columnas HPLC en análisis farmacéuticos.
- [9] Borman P. J., Elder D. P. (2006). Guía Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH Topic Q 2 (R1), part I: validation of analytical procedures: Definitions and methodology, Wiley One Library, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf)
- [10] Bolla G., Sarma B., Nangia A. K. (2022). Crystal Engineering of Pharmaceutical Cocrystals in the Discovery and Development of Improved Drugs. Artículo publicado en Chemical Reviews por American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00987>
- [11] Wairkar S., Gaud R. (2016). Co-Amorphous Combination of Nateglinide-Metformin Hydrochloride for Dissolution Enhancement. Publicado en AAPS PharmSciTech. Páginas 673–681, <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0371-4>

- [12] Solares B. M., Coyote D. G., Páez F. J.C., Zermeño O. M.R., de la O C. C.M., Canseco D., Avila S. A., Morales M. D., Germán A. J. M. (2021). Mechanochemistry: A Green Approach in the Preparation of Pharmaceutical Cocrystals. Publicado en *Pharmaceutics*. Página 790. doi: 10.3390/pharmaceutics13060790
- [13] DrugBank Online, versión 5.1.10, último cambio 04 de noviembre 2023 02:08, (banco de datos), Rosuvastatin, fecha de consulta: 08 oct 23 15:51 h, <https://go.drugbank.com/drugs/DB01098>
- [14] DrugBank Online, versión 5.1.10, último cambio 04 de noviembre 2023 02:08, (banco de datos), Atorvastatin, fecha de consulta: 24 nov 23 19:06 h, <https://go.drugbank.com/drugs/DB01076>
- [15] DrugBank Online, versión 5.1.10, último cambio 04 de noviembre 2023 02:08, (banco de datos), Pravastatin, fecha de consulta: 24 nov 23 18:59 h, <https://go.drugbank.com/drugs/DB00175>
- [16] DrugBank Online, versión 5.1.10, último cambio 04 de noviembre 2023 02:08, (banco de datos), Fluvastatin, fecha de consulta: 24 nov 23 19:16 h, <https://go.drugbank.com/drugs/DB01095>
- [17] DrugBank Online, versión 5.1.10, último cambio 04 de noviembre 2023 02:08, (banco de datos), Metformin, fecha de consulta: 24 nov 23 19:41 h, <https://go.drugbank.com/drugs/DB00331>
- [18] González M. G., Noguez A. M. E. (2006). Principios de Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis por Rayos X Característicos. Departamento de Ingeniería Química Metalúrgica. Publicado en Libros UNAM.
- [19] Agilent (s.f.). autor: Dr. Ursula Tems. Using a Diode Array UV-Vis in Regulated Environments, fecha de consulta: 24 oct 23 19:58 h  
[https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/public/Using a Diode Array in Regulated Environment s.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/public/Using_a_Diode_Array_in_Regulated_Environment_s.pdf)
- [20] Metalinspect (s.f.). Microscopio electrónico de barrido: Qué es y cómo funciona. Fecha de consulta: 28 oct 23 13:24 h <https://www.blog.metalinspect.com.mx/que-es-y-como-funciona-un-microscopio-electronico-de-barrido>
- [21] Desiraju G. R.; Vittal J. J.; Ramanan A., (2011). Crystal Engineering: a Textbook. Publicado en World Scientific Publishing. Capítulo 1. Ingeniería de cristales,
- [22] ALBA (s. f.), Difracción de Rayos X, fecha de consulta: 28 oct 23 13:42 h  
<https://www.cells.es/es/divulgacion/recursos-educativos/posters/9-difraccion.pdf>