



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

**INCLUSIÓN DE FUROSEMIDA EN  
SÍLICE MESOPOROSO UTILIZANDO  
UN SISTEMA CONTINUO DE  
IMPREGNACIÓN POR HUMEDAD  
INCIPIENTE Y SU INFLUENCIA EN  
LA DISOLUCIÓN Y  
BIODISPONIBILIDAD EN RATAS**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO  
DE MAESTRO

EN

**TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA**

DENIS ALAIN GARCÍA MAYTA

LIMA – PERÚ

2020



**ASESOR DE TESIS**

M.Sc. León Faustino Villegas Vílchez

**JURADO EVALUADOR**

Dra. Mónica Jehnny Pajuelo Travezaño

**Presidente**

Mg. Gustavo Vladimir Bravo Orellana

**Vocal**

Mg. María Cleofe Salas Arruz

**Secretaria**

*Esta tesis está afectuosamente dedicada a mis amados padres  
Víctor Teobaldo y María;  
¡por las lecciones para el camino!*

## *Agradecimientos*

*A Elva Lucero Villarreal Pizarro y Kiara Whitney Vera Cruz, por su invaluable ayuda en la realización de los antecedentes para esta investigación.*

*A Jesús Luis Zavala Puma y Daniel Fernando Shimabuku Vega, Account Manager Process Solution – Merck y a Daniel Luis Angélico Business, Development Manager Actives & Formulation -Merck; por su diligente y expeditivo apoyo con el suministro de muestras e información técnica para la realización de este proyecto de investigación.*

*A Magaly Ljubisa Salvador Villanueva, Lorena Stephanie Lévano Ocorima, Angela Verónica Quiñones Andrade y Guido Narciso León Vásquez por su valiosa colaboración en la parte experimental de la presente tesis.*

*A Erik Olivar Gallegos y a Julio Fernando Hidalgo Ascencios, por su tiempo, paciencia y buena disposición a compartir sus conocimientos y experiencia para realizar los estudios in vitro e in vivo del presente estudio.*

*A todo el equipo del Servicio de control de calidad de la UPCH, por su disposición a ayudarme en todo lo necesario para el desarrollo de esta investigación.*

*Al Dr. José del Carmen Aliaga Arauco, profesor de las asignaturas de investigación farmacéutica I y II, por las discusiones a lo largo del desarrollo de las clases las cuales me ayudaron a definir y delimitar la presente investigación.*

*A M.Sc. León Faustino Villegas Vilchez, asesor de la presente tesis, por su orientación en el planteamiento de esta investigación; por sus consejos y recomendaciones durante la ejecución de los estudios in vitro e in vivo.*

*Al Laboratorio de Materiales – CITE materiales de la PUCP, por los análisis de calorimetría diferencial de barrido realizados en sus instalaciones.*

*A Dr. José Fernández y Dr. Ing. Rolf Grieseler, del Centro de caracterización de materiales de la PUCP, por su disposición a compartir conocimientos y orientaciones en la interpretación de los resultados obtenidos.*

*A M.C. Ana María Osorio Anaya, del Laboratorio de nanotecnología e innovación tecnológica de la Facultad de química e ingeniería química de la UNMSM, por sus orientaciones en la caracterización de materiales mesoporosos.*

*Al Dr. Ángel Guillermo Bustamante Domínguez y Renato Arturo Valencia Bedregal, del Laboratorio de cerámicos y nanomateriales de la Facultad de ciencias físicas de la UNMSM, por su ayuda en la realización de los análisis termogravimétricos en esta investigación.*

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

Tesis Autofinanciada

*Y vio Dios que la luz era buena;  
y separó Dios la luz de las tinieblas.*

*Génesis 1:4*

## TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN .....	4
2.1 Planteamiento del problema .....	4
2.2 Marco teórico .....	5
2.3 Justificación del estudio .....	38
2.4 Objetivos .....	40
3. HIPOTESIS.....	41
4. METODOLOGÍA .....	42
4.1 Diseño de la investigación.....	42
4.2 Materiales .....	43
4.3 Preparación de la inclusión de furosemida en Parateck® SLC 500 USP, Ph. Eur - dióxido de silicio mesoporoso .....	44
4.4 Caracterización de la inclusión de furosemida en Parateck® SLC 500 USP, Ph. Eur - Dióxido de silicio mesoporoso.....	49
4.5 Evaluación de disolución .....	54
4.6 Evaluación farmacocinética <i>in vivo</i> .....	55
4.7 Validación del método <i>in vivo</i> .....	58
4.8 Análisis estadístico .....	60
5. RESULTADOS.....	62
5.1 Caracterización de la inclusión de furosemida en en Parateck® SLC 500 USP, Ph. Eur - Dióxido de silicio mesoporoso .....	62
5.2 Evaluación de disolución .....	70
5.3 Evaluación farmacocinética <i>in vivo</i> .....	75
5.4 Validación del método <i>in vivo</i> .....	81
6. DISCUSIÓN .....	83
7. CONCLUSIONES .....	105
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
9. ANEXOS	

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de fases para que un fármaco administrado por vía oral alcance la circulación sistémica. Adaptado de (Xin Xia, 2014) .....	5
Figura 2. Ruta de síntesis para sílice mesoporoso. Adaptado de (Xin Xia, 2014) .....	14
Figura 3. Curva de La Mer. Adaptado de (Navnit Shah, 2014) .....	15
Figura 4. Mezclador amasador con vacío y calefactor. Fuente: www.diosna.com .....	37
Figura 5. Sistema para impregnación por humedad incipiente. Fuente: Elaboración propia. ....	48
Figura 6. Cromatogramas de (a) estándar de furosemida, (b) furosemida en P-SiO <sub>2</sub> y (c) P-SiO <sub>2</sub> .....	63
Figura 7. Termogramas de (a) P-SiO <sub>2</sub> , (b) y (c) inclusión de furosemida en P-SiO <sub>2</sub> .....	65
Figura 8. Termogramas de (a) furosemida, (b) y (c) inclusión de furosemida en P-SiO <sub>2</sub> ..	66
Figura 9. Difractogramas de (a) furosemida, (b) inclusión de furosemida en P-SiO <sub>2</sub> . ....	67
Figura 10. Imagen SEM de (a), (b) de P-SiO <sub>2</sub> y de (c), (d) de la inclusión de furosemida en P-SiO <sub>2</sub> .....	68
Figura 11. Isotermas de adsorción-desorción de (a) P-SiO <sub>2</sub> y (b) Inclusión de furosemida en P-SiO <sub>2</sub> .....	69
Figura 12. Porcentaje de disolución de furosemida a pH 5.8, 37° C ± 0.5 de (a) inclusión de furosemida en P-SiO <sub>2</sub> y (b) furosemida cristalina (materia prima). Promedio ± desviación estándar (n=3) .....	72
Figura 13. Porcentaje de disolución de furosemida a pH 5.8, 37° C ± 0.5 de (a) inclusión de furosemida en P-SiO <sub>2</sub> y (b) comprimidos de furosemida (40 mg, Mylan®). Promedio ± desviación estándar, (n=3). ....	73
Figura 14. Concentración plasmática de (a) inclusión de furosemida en P-SiO <sub>2</sub> y (b) furosemida cristalina (materia prima), n=3, promedio ± desviación estándar. ....	77
Figura 15. Curva de calibración de concentración plasmática de furosemida en plasma de rata (promedio ± desviación estándar, n=3).....	81
Figura 16. Certificado de análisis de furosemida (Suleshvari pharma, India) .....	117
Figura 17. Certificado de análisis de ET de furosemida (Suleshvari pharma, India).....	118
Figura 18. Certificado de análisis de Parateck® SLC 500 USP, Ph. Eur - dióxido de silicio mesoporoso, sílice mesoporoso (P-SiO <sub>2</sub> ).....	119
Figura 19. Análisis estadístico para evaluación de disolución.....	120
Figura 20. Análisis estadístico para evaluación farmacocinética in vivo .....	121

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de clasificación biofarmacéutica (SCB) (14) .....	6
Tabla 2. Solubilidad y permeabilidad de fármacos basado en las subclases del sistema de clasificación biofarmacéutica (15).....	7
Tabla 3. Clase biofarmacéutica, biodisponibilidad y solubilidad de furosemida (Fuente: elaboración propia) .....	32
Tabla 4. Parámetros operacionales del proceso de incorporación de furosemida en P-SiO <sub>2</sub> . (Fuente: elaboración propia) .....	46
Tabla 5. Contenido de furosemida mediante HPLC .....	63
Tabla 6. Contenido de furosemida mediante TG .....	64
Tabla 7. Superficie específica mediante BET .....	69
Tabla 8. Promedio del porcentaje de disolución de furosemida (promedio ± desviación estándar, n=3).....	71
Tabla 9. Medianas de los porcentajes disueltos y vapor p de la prueba de Kruskal Wallis .....	74
Tabla 10. Concentración plasmática en µg/mL de furosemida (promedio ± desviación estándar, n=3).....	76
Tabla 11. Parámetros farmacocinéticos C <sub>máx</sub> y T <sub>máx</sub> .....	78
Tabla 12. Área bajo la curva .....	79
Tabla 13. Medianas de las concentraciones plasmáticas y valor p para la prueba de U Mann - Whitney .....	80
Tabla 14. Porcentajes promedio de recuperación de furosemida para concentraciones de 80 %, 100 % y 120 %.....	82
Tabla 15. Porcentajes promedio de concentración de furosemida a temperatura ambiente y refrigeración (promedio ± desviación estándar, n=3) .....	82
Tabla 16. Datos primarios de las áreas obtenidas en la cuantificación de furosemida en las muestras de furosemida incluida en P-SiO <sub>2</sub> .....	122
Tabla 17. Datos primarios de las absorbancias obtenidas en la disolución de furosemida en las muestras de furosemida cristalina (materia prima), furosemida incluida en P-SiO <sub>2</sub> y comprimidos de furosemida (40 mg, Mylan®).....	123
Tabla 18. Datos primarios de las áreas obtenidas en la cuantificación de furosemida en plasma de ratas en las muestras de furosemida incluida en P-SiO <sub>2</sub> y furosemida cristalina (materia prima).....	124

## GLOSARIO

ABC: área bajo la curva

BET: isothermas de adsorción/desorción de nitrógeno Brunauer, P. Emmett y E. Teller

CDB: calorimetría diferencial de barrido

$C_{\text{máx}}$ : concentración sérica máxima

DRX: difracción de rayos X

ER: estándar de referencia

ET: estándar de trabajo

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

HPLC: cromatografía líquida de alta presión

HPMC: Hidroxipropilmetilcelulosa

IHI: impregnación por humedad incipiente

MEB: microscopía electrónica de barrido

MPSiO<sub>2</sub>: dióxido de silicio mesoporoso

PEG: polietilenglicol

P-SiO<sub>2</sub>: Parateck® SLC 500 USP, Ph. Eur - dióxido de silicio mesoporoso, sílice mesoporoso

PVP: polivinilpirrolidona

SCB: sistema de clasificación biofarmacéutica

SiO<sub>2</sub>: dióxido de silicio

TEOS: tetraetiloorto silicato

TG: termogravimetría

$T_{\text{máx}}$ : tiempo de concentración sérica máxima

USP 42-NF 37, USP: Farmacopea de Estados Unidos

UV: espectroscopía UV visible

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue incrementar la velocidad de disolución y biodisponibilidad de furosemida mediante su confinamiento en la red de poros de Parateck® SLC 500 USP, Ph. Eur - dióxido de silicio mesoporoso (P-SiO<sub>2</sub>) utilizando el método de impregnación por humedad incipiente. Furosemida es un diurético insoluble en agua de clase IV según el sistema de clasificación biofarmacéutica. La caracterización demostró mediante cromatografía líquida de alta presión y termogravimetría que la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> fue de 40.69 % ± 0.76 y 40.75 % ± 0.49 respectivamente; la calorimetría diferencial de barrido y difracción de rayos de X mostraron la supresión de las características cristalinas. La evaluación de disolución realizada a furosemida (materia prima), a la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> y a comprimidos de furosemida (40 mg, Mylan®) mostró una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje disuelto para las dos primeras de 32.28 % ± 0.95 y 85.03 % ± 1.34 a los 5 minutos respectivamente; y 35.98 % ± 1.59, 101.65 % ± 0.64, 92.37 % ± 1.25 a los 60 minutos respectivamente. La evaluación farmacocinética *in vivo*, realizada en ratas Sprague-Dawley, evidenció un notable incremento en el área bajo la curva de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> (33.56 µg h ml<sup>-1</sup>) frente a furosemida (16.81 µg h ml<sup>-1</sup>). Los resultados demostraron un incremento, estadísticamente significativo (p<0.05), en la tasa de disolución y biodisponibilidad de furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub> frente a furosemida.

**PALABRAS CLAVE:** dióxido de silicio mesoporoso, furosemida, disolución, biodisponibilidad, impregnación por humedad incipiente, sistema de clasificación biofarmacéutica

## ABSTRACT

The objective of this study was to increase the rate of dissolution and bioavailability of furosemide by confinement in Parateck® SLC 500 USP, Ph. Eur - mesoporous silicon dioxide (P-SiO<sub>2</sub>) using the method of incipient wetness impregnation. Furosemide is a class IV water insoluble diuretic according to the biopharmaceutical classification system. Characterization studies using high pressure liquid chromatography and thermogravimetry demonstrated that the inclusion of furosemide in P-SiO<sub>2</sub> was 40.69 % ± 0.76 and 40.75 % ± 0.49 respectively; differential calorimetry scanning and X ray diffraction showed the suppression of crystalline characteristics. The dissolving assessment performed on furosemide, the inclusion of furosemide in P-SiO<sub>2</sub> and furosemide tablets showed a statistically significant difference for the first two in the dissolved percentage of 32.28 % ± 0.95, 85.03 % ± 1.34 at 5 minutes respectively; and 35.98 % ± 1.59, 101.65 ± 0.64 at 60 minutes respectively. The *in vivo* pharmacokinetic assessment, carried out in Sprague-Dawley rats, showed a noticeable increase in the area under the curve of the inclusion of furosemide in P-SiO<sub>2</sub> (33.56 µg h ml<sup>-1</sup>) versus furosemide (16.81 µg h ml<sup>-1</sup>). The results showed a statistically significant increase (p<0.05), in the rate of dissolution and bioavailability of furosemide included in P-SiO<sub>2</sub> versus furosemide.

**KEY WORDS:** mesoporous silicon dioxide, furosemide, dissolution, bioavailability, incipient wetness impregnation, biopharmaceutical classification system

## 1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de formas farmacéuticas sólidas debe conducir a obtener formulaciones que de manera consistente y reproducible cumplan con la biodisponibilidad. La biodisponibilidad, está directamente influenciada por la disgregación del comprimido y la disolución del principio activo, las cuales dependen de la formulación y de las características del fármaco como su solubilidad en agua, tasa de disolución y absorción por las células de la pared intestinal. (1)

Uno de los principales desafíos de la investigación en tecnología farmacéutica es el desarrollo y aplicación de estrategias para optimizar la solubilidad acuosa de los principios activos; las estrategias comúnmente empleadas para superar este desafío son: formación de sales, reducción de tamaño de partícula y formulación de dispersiones sólidas; sin embargo, estas tecnologías presentan limitaciones asociadas al reducido periodo de estabilidad del principio activo, a la dificultad de manipular materiales de tamaño de partícula muy reducido y la gran cantidad de recursos necesarios como tiempo y energía y finalmente los efectos secundarios que presentan las modificaciones químicas de los fármacos. (2)

A raíz de las debilidades que presentan las estrategias indicadas anteriormente; en los últimos años, se han desarrollado diferentes alternativas para optimizar la disolución acuosa de principios activos insolubles, dentro de las cuales destaca la utilización de dióxido de silicio

mesoporoso (MPSiO<sub>2</sub>). El dióxido de silicio (SiO<sub>2</sub>) es un excipiente farmacéutico utilizado en la producción de comprimidos y cápsulas, en la producción de aerosoles, como estabilizante en las emulsiones y como agente de suspensión. El MPSiO<sub>2</sub> se caracteriza por su elevada porosidad, con poros entre 2 y 50 nm, vasta área superficial; además, de ser inerte y biocompatible. La estrategia consiste en incorporar los fármacos al interior de la red de poros de MPSiO<sub>2</sub>, con el fin de confinar las moléculas del fármaco al interior de los poros y mantenerlas en un estado amorfo; de esta forma, debido de la enorme área superficial e hidrofiliidad de MPSiO<sub>2</sub>, se alcanza una disolución más rápida del principio activo. (4,5) (5) Los principales procedimientos para realizar la inclusión de fármacos insolubles en agua a la red de poros de MPSiO<sub>2</sub>, se agrupan en dos categorías, en función al empleo de solventes orgánicos. Dentro de los métodos que utilizan solventes, está la impregnación por humedad incipiente (IHI), el método de inmersión y secado por pulverización; y las técnicas libres de solventes como la mezcla por fusión y co-molienda.(4)

En la presente investigación se utilizó el método de IHI para incorporar furosemida en el sistema de poros de P-SiO<sub>2</sub>, debido a las ventajas que presenta esta metodología frente a las otras; entre ellas, evita que las partículas de P-SiO<sub>2</sub> se sumerjan en la solución del fármaco en solvente orgánico, previniendo la cristalización del principio activo en la superficie las partículas de P-SiO<sub>2</sub> y la obstrucción de los poros; por el contrario, se incorpora el principio activo mediante un flujo controlado de la solución

sobre P-SiO<sub>2</sub> y se promueve la evaporación simultánea del solvente con un baño maría. (6) Para el desarrollo del estudio se seleccionó furosemida debido a que según diversas investigaciones es un diurético con una biodisponibilidad errática o reducida, que oscila entre 20 y 65 %, y por esta razón se le considera un fármaco representativo de la clase biofarmacéutica IV (insoluble e impermeable). (7–10)

La presente investigación se realizó con el propósito de demostrar la utilidad de MPSiO<sub>2</sub> en optimizar la disolución y biodisponibilidad de furosemida mediante una técnica que permita un escalamiento a nivel industrial con la tecnología disponible en la industria farmacéutica. El objetivo de nuestro estudio fue realizar la inclusión de furosemida en sílice mesoporoso utilizando un sistema continuo de impregnación por humedad incipiente y determinar su influencia en la disolución y biodisponibilidad en ratas. (6)

## **2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **2.1 Planteamiento del problema**

La limitante para que las formas farmacéuticas sólidas cumplan con la biodisponibilidad es la pobre solubilidad acuosa que presentan algunos de los principios activos; característica que condiciona una baja disolución en los fluidos gastrointestinales; según varios autores entre el 50 % y 70 % de principios activos descubiertos en los últimos años corresponden a las clases biofarmacéuticas II o IV y esto se debe a nuevas estrategias en el desarrollo de principios activos y al descubrimiento de dianas que requieren de moléculas más lipofílicas para producir el efecto farmacológico. La pobre solubilidad acuosa de los principios activos tiene un impacto negativo en la eficacia de las formas farmacéuticas sólidas; por esta razón, el desarrollo de formas farmacéuticas sólidas se ha orientado al estudio de tecnologías para optimizar la velocidad de disolución de los principios activos de pobre solubilidad acuosa. El planteamiento de este proyecto de investigación es incluir furosemida en P-SiO<sub>2</sub> mediante el método de IHI para lograr incrementar la disolución y biodisponibilidad.

## 2.2 Marco teórico

### 2.2.1 Biodisponibilidad de las formas farmacéuticas sólidas

Las formas farmacéuticas sólidas orales una vez ingeridas deben de pasar por una serie de fases antes de que el principio activo alcance la circulación sistémica, ver Figura 1. Estas etapas comprenden la disolución y la absorción. La disolución del principio activo ocurre en el tracto gastrointestinal luego de que el comprimido o cápsula se ha disgregado en gránulos, y estos han liberado el principio activo el cual debe disolverse hasta alcanzar el grado molecular. Luego, la absorción se produce cuando las moléculas del principio activo atraviesan la pared celular intestinal y alcanzan la circulación sistémica. (11)

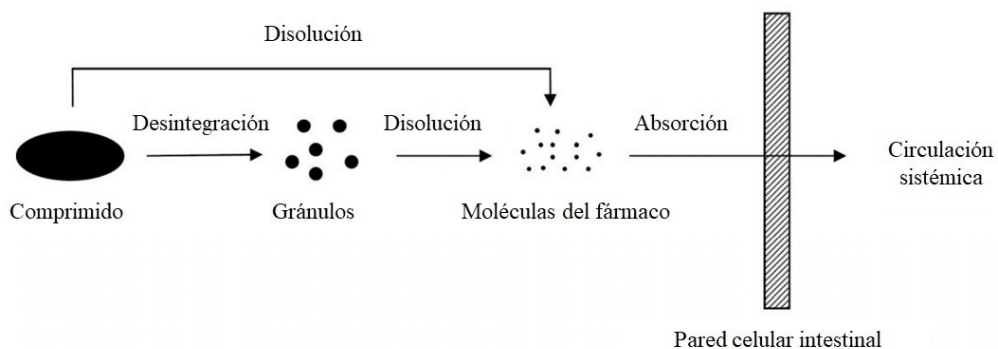


Figura 1. Esquema de fases para que un fármaco administrado por vía oral alcance la circulación sistémica. Adaptado de (Xin Xia, 2014)

Determinadas características de los principios activos son una limitante para que estos alcancen la circulación sistémica y en consecuencia tienen un impacto negativo en la eficacia del medicamento, entre estas características podemos mencionar a la solubilidad acuosa, la permeabilidad y la velocidad de disolución.

(11) Un indicador de la eficacia de las formas farmacéuticas sólidas es la biodisponibilidad, la cual está definida como la velocidad y magnitud en que un determinado principio activo alcanza la circulación sistémica, por tanto, la biodisponibilidad se ha convertido en uno de los requerimientos cruciales que deben cumplir las formas farmacéuticas sólidas. (12)

La importancia de la disolución y por lo tanto de la solubilidad acuosa como un factor determinante de la absorción oral se reconoció formalmente con el establecimiento del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) propuesto por Amidon et al., en 1995, donde, los principios activos se clasificaron en cuatro categorías: clases 1 y 3 contienen moléculas con alta solubilidad acuosa, y clases 2 y 4 contienen moléculas con baja solubilidad; las moléculas de las clases 3 y 4 también muestran una pobre permeabilidad a la membrana biológica (Tabla 1), otro factor disuasorio para la absorción del fármaco. (13)

*Tabla 1. Sistema de clasificación biofarmacéutica (SCB) (14)*

<b>Clase</b>	<b>Solubilidad</b>	<b>Permeabilidad</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>Clase I</b>	Alta	Alta	Sumatriptan Loxoprofeno
<b>Clase II</b>	Baja	Alta	Loratadina Aceclofenaco
<b>Clase III</b>	Alta	Baja	Gabapentina Topiramida
<b>Clase IV</b>	Baja	Baja	Furosemida Meloxicam

Sin embargo, de acuerdo a lo señalado por Butler y Desman (2010), el planteamiento del SCB no toma en cuenta que la disolución *in vivo* e *in vitro* de

los fármacos de las clases II y IV dependen fuertemente de si el principio activo es un ácido o una base, la solubilidad, los componentes de la formulación y también de las condiciones *in vivo* (Tabla 2). Por estas razones, Yasuhiro Tsume et al. (2013), propusieron la inclusión de las subclases a, b y c para los fármacos II y IV.(15).

Tabla 2. Solubilidad y permeabilidad de fármacos basado en las subclases del sistema de clasificación biofarmacéutica (15)

Clase y Sub clase	Solubilidad a pH 2	Solubilidad a pH 6.5	Permeabilidad
I	Alta	Alta	Alta
II <sup>a</sup>	Baja	Alta	Alta
II <sup>b</sup>	Alta	Baja	Alta
II <sup>c</sup>	Baja	Baja	Alta
III	Alta	Alta	Baja
IV <sup>a</sup>	Baja	Alta	Baja
IV <sup>b</sup>	Alta	Baja	Baja
IV <sup>c</sup>	Baja	Baja	Baja

<sup>a</sup> con  $pK_a < 5$ , <sup>b</sup> con  $pK_a > 6$ , <sup>c</sup> con  $pK_a < 0$  o  $> 8$

### 2.2.2 Solubilidad de los principios activos

En la actualidad, hay un aumento constante del número de principios activos con alto potencial terapéutico, pero con una baja solubilidad acuosa, por tanto, estos fármacos presentan mayores desafíos para ser formulados como formas farmacéuticas sólidas orales.(16) Estudios recientes muestran que más del 70 %

de las nuevas moléculas obtenidas mediante síntesis son poco solubles y están clasificadas como clase II y clase IV de acuerdo al SCB. (17)

En las últimas tres décadas ha venido ocurriendo un incremento en la cantidad de principios activos poco solubles debido a la evolución en las estrategias de descubrimiento de fármacos, que ha favorecido la obtención de moléculas más lipófilas, de mayor peso molecular y, por tanto, más insolubles. Otro factor que ha contribuido al aumento del número de principios activos poco solubles está relacionado con la naturaleza de las dianas farmacológicas, debido a que las características químicas para una unión adecuada con las dianas son generalmente incompatibles con los requerimientos químicos de la molécula para tener un buen potencial de absorción. (18)

### **2.2.3 Estrategias para optimizar la solubilidad acuosa de fármacos**

Los métodos más comunes para optimizar la disolución de principios activos con pobre solubilidad acuosa son los métodos químicos, físicos y las dispersiones sólidas.

#### **2.2.3.1 Métodos químicos**

##### **A) Formación de sales**

La modificación química de un principio activo para formar sales cristalinas o co-cristales con mayor solubilidad acuosa, cuando es factible, puede ser una forma

muy eficaz de aumentar la velocidad de disolución, siempre que la forma disuelta del fármaco pueda mantenerse en un estado sobresaturado con respecto a la forma cristalina libre del mismo. (13)

Aunque la formación de sales es el método más común para incrementar la solubilidad de principios activos insolubles en las formas sólidas de dosificación oral, no siempre es la opción más adecuada. Por ejemplo, la solubilidad de un fármaco bajo la forma de clorhidrato puede ser limitada en el estómago, debido a la alta concentración de iones cloruro. Aunque las sales tienen mayor solubilidad, un potencial riesgo es que pueden modificar el pH del tracto gastrointestinal, y ser una causa de incumplimiento de la medicación por parte del paciente. Muchos de los tratamientos médicos prescritos no logran los resultados deseados debido a que el paciente incumple la medicación por los efectos secundarios producidos. (2)

## **B) Modificación de la estructura química**

A menudo es posible aumentar la solubilidad de un medicamento desde el diseño de la molécula del principio activo. Por ejemplo, la modificación de la estructura química para mejorar la solubilidad incluye: i) la adición de grupos ionizables los cuales se ionizarán en la presencia de un medio “buffer”, tales como bases de aminas o ácidos carboxílicos. (2)

Sin embargo, estos métodos tienen varias restricciones. La molécula de un principio activo debe tener propiedades hidrofílicas y lipofílicas, puesto que debe

ser polar para solubilizarse en condiciones acuosas e interactuar con dianas moleculares y debe tener características grasas para atravesar la membrana celular y evitar la excreción rápida. Sin embargo, estas modificaciones en la estructura de la molécula pueden afectar la potencia de las drogas y su modo de acción. (2)

### 2.2.3.2 Métodos físicos

#### A) Reducción de tamaño de partícula

Una estrategia común para aumentar la velocidad de disolución y, por tanto, la biodisponibilidad de los principios activos de baja solubilidad acuosa es la reducción del tamaño de partícula para generar una mayor área superficial. A medida que se disminuye el tamaño de partícula, la relación área superficial/volumen aumenta y la mayor área superficial producida permite una mayor interacción con el disolvente, lo que provoca un aumento en la solubilidad.

(19)

La tasa de disolución de los principios activos, ocurra *in vitro* o *in vivo*, está definida por un proceso de difusión controlado, el cual no involucra reacciones químicas. La ley que define este proceso se explica por la ecuación de Noyes y Whitney. (20)

$$\frac{dm}{dt} = \frac{DA(Cs - Cb)}{h}$$

Donde:

$dm/dt$ : velocidad disolución

D: coeficiente de difusión

A: Área superficial

h: Espesor de capa de difusión

$C_s$ : Solubilidad saturada en capa de difusión

$C_b$ : Concentración de fármaco

Los métodos convencionales de reducción de tamaño de partícula utilizan la fuerza mecánica para la división de las partículas. A escala industrial, la micronización es uno de los métodos más utilizados para reducir el tamaño de partícula, y para alcanzar tamaños de micras o incluso de nanómetros es necesario el aporte de una gran cantidad de energía y fuerza al proceso. El proceso se realiza utilizando un medio, como el agua o un buffer y un estabilizante, es necesaria la incorporación de estabilizantes, para prevenir la aglomeración de las nano partículas. El tiempo de proceso de la micronización puede ser desde horas hasta incluso días, dependiendo de la dureza de las partículas, la cantidad y el tamaño de partícula requerida. (2)

### **2.2.3.3 Dispersiones sólidas**

El término dispersión sólida se ha definido como un sistema de uno o más principios activos en un soporte o matriz inerte en estado sólido, preparado mediante disolventes, fusión o un método combinado de fusión con disolventes. El fármaco en una dispersión sólida puede dispersarse como moléculas separadas,

partículas amorfas o partículas cristalinas, mientras que el portador puede estar en estado cristalino o amorfo. (21)

Los polímeros son los excipientes más utilizados para estabilizar principios activos a nivel micro, nano y en su estado amorfo. En los métodos más usuales, se utilizan una matriz hidrofílica a base de uno o más polímeros, por ejemplo, polivinilpirrolidona (PVP), polietilenglicol (PEG) y derivados de celulosa. Las matrices poliméricas estabilizan las partículas del principio activo dispersado en su estado amorfo o controlando la cristalización. En algunos casos, las matrices incrementan la humectabilidad y el área superficial de los principios activos. Uno de los polímeros ampliamente utilizado en las dispersiones sólidas es hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) para optimizar la solubilidad y estabilidad de los principios activos insolubles. (13)

#### **2.2.4 Dióxido de silicio mesoporoso**

De acuerdo a lo señalado, la baja solubilidad acuosa de los ingredientes farmacéuticos activos es un problema crucial para la industria farmacéutica y se vienen estudiando y evaluando diversos planteamientos para superar esta limitante. Los materiales de  $MPSiO_2$  son una alternativa relativamente reciente dentro de estos planteamientos. (22) En la última década, se ha profundizado la investigación de sistemas de administración de fármacos basados en  $MPSiO_2$  para elevar la solubilidad acuosa y por lo tanto mejorar la biodisponibilidad de las formas farmacéuticas sólidas.(23)

Los materiales de  $\text{MPSiO}_2$  están formados por partículas de  $\text{SiO}_2$  completamente porosas, con estructuras de poros ordenados y con tamaños de poros en el intervalo de 2 a 50 nanómetros. Como potencial sistema de suministro de fármacos, tiene las siguientes ventajas: i) tienen una elevada área superficial y un volumen de poros capaz de incluir cantidades considerables de principio activo; ii) están formadas por partículas compuestas de  $\text{SiO}_2$  amorfo. El  $\text{SiO}_2$  tiene la misma composición química que ha sido aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) como un excipiente farmacéutico y aditivo alimentario; iii) puede adecuarse la distribución de tamaño de poros al tamaño requerido para adaptarse a las diferentes dimensiones de las moléculas de fármacos; iv) las redes de poros ordenadas se pueden adaptar de conectividad en 2 y 3 dimensiones, para poder controlar la velocidad de disolución; v) presenta un tamaño de partícula variable para diferentes vías de administración; vi) y es compatible con la composición usual de los comprimidos. (2,3)

#### **2.2.4.1 Síntesis de dióxido de silicio mesoporoso**

El método de síntesis más utilizado para obtener  $\text{MPSiO}_2$  está basado en una reacción patrón con un surfactante, mediante la combinación de un surfactante y una ruta química de sol-gel, donde la mesofase orgánica de los moldes micelares direccionan los monómeros de  $\text{SiO}_2$  al interior de una estructura amorfa mesoscópicamente organizada. Los moldes moleculares de las micelas se forman mediante un proceso de auto ensamblado. En solución acuosa, las micelas pueden formar diferentes fases de cristales líquidos como láminas de una dimensión, hexagonales en 2 dimensiones y cubos en 3 dimensiones de acuerdo con las

propiedades del modelo molecular y las condiciones de la solución. El SiO<sub>2</sub>, ingresa al proceso bajo la forma de un precursor, se adiciona para formar las paredes alrededor de las micelas. El precursor más utilizado es el Tetraetilo orto silicato (TEOS). En un medio acuoso, TEOS se hidroliza reemplazando los grupos alcóxido (-OR) con grupos hidroxilos (-OH) produciendo grupos silanol (≡Si-OH). Las reacciones de condensación siguientes comprenden la formación de enlaces siloxano (≡Si-O-Si≡). Luego de un periodo de condensación, la estructura silicio-orgánica es filtrada y se elimina el componente orgánico mediante calcinación o por extracción con solventes. Ver Figura 2.

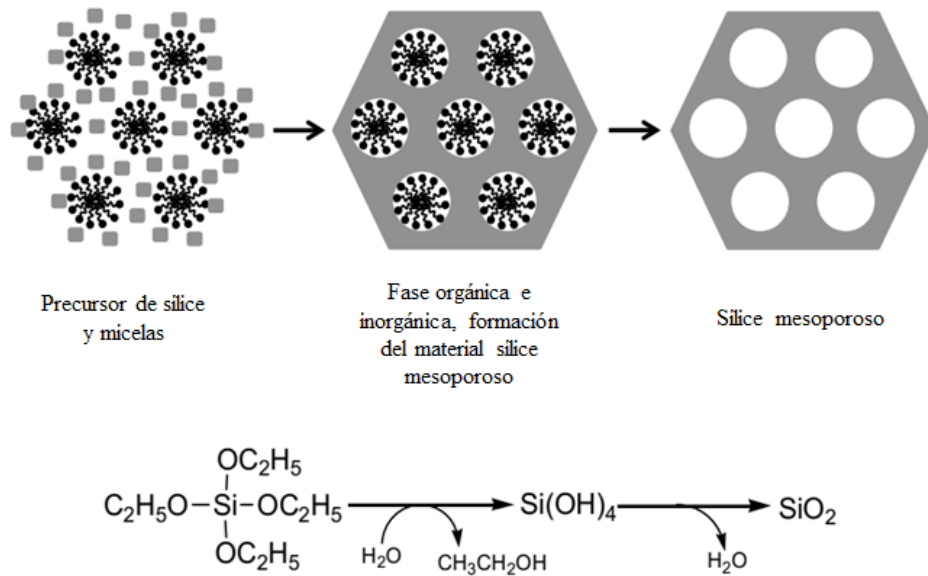


Figura 2. Ruta de síntesis para sílice mesoporoso. Adaptado de (Xin Xia, 2014)

#### 2.2.4.2 Mecanismo de liberación de fármacos

La mayor biodisponibilidad que presentan los principios activos de baja solubilidad acuosa debido a su confinamiento en MPSiO<sub>2</sub> se produce por la sobresaturación que ocurre cuando el fármaco amorfo es liberado en el tracto gastrointestinal. Generalmente, la forma amorfa de las moléculas orgánicas, como son los fármacos, presenta una mayor solubilidad frente a la forma cristalina. En la evaluación *in vitro*, cuando el principio activo se libera del portador MPSiO<sub>2</sub> en un volumen constante de medio de disolución, la concentración se incrementa y sobrepasa a la concentración de saturación de la forma cristalina más estable. (6)

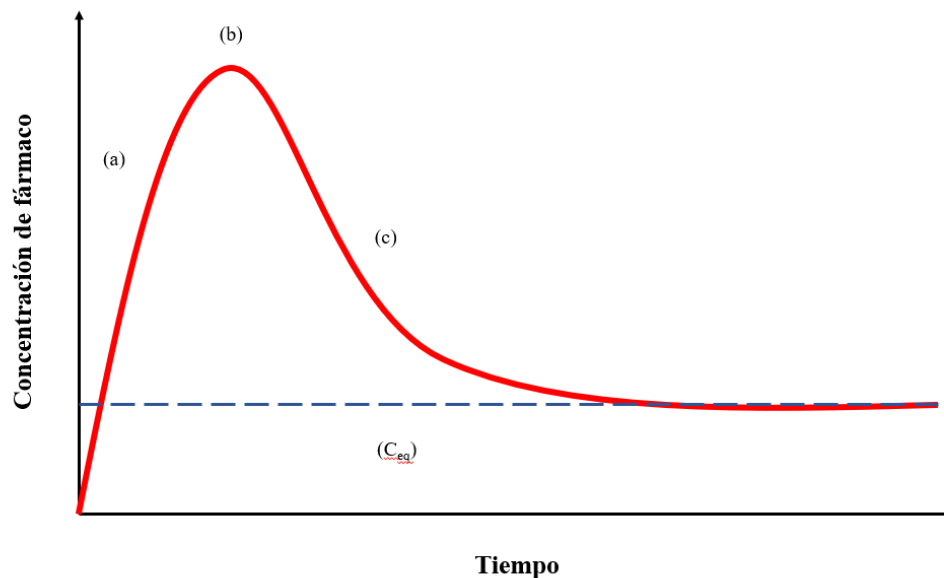


Figura 3. Curva de La Mer. Adaptado de (Navnit Shah, 2014)

Al aplicar los principios científicos establecidos para la cristalización o preparación de una dispersión coloidal por condensación, los cuales involucran etapas de nucleación y crecimiento, a un sistema oral de liberación de fármacos;

este presenta el perfil definido en la curva de La Mer, la cual muestra la concentración de principio activo en un volumen constante de medio de disolución con respecto al tiempo. En la Figura 3, se muestran las tres etapas claramente definidas de la curva, (a) período de liberación rápida del fármaco, la concentración de fármaco disuelto sobrepasa a la concentración de saturación ( $C_{eq}$ ); (b) se inicia la formación de núcleos y crecimiento de cristales, mientras la concentración del fármaco se mantiene elevada; y (c) finalmente, empieza el crecimiento de cristales a expensas del fármaco disuelto. De acuerdo a lo señalado por la termodinámica, la concentración de fármaco en el medio de disolución tiende hacia la concentración de equilibrio,  $C_{eq}$ , la cual corresponde a la solubilidad de equilibrio alcanzada por la forma cristalina más estable de la droga. Sin embargo, la tasa de disolución del principio activo confinado en  $MPSiO_2$  está controlada principalmente por la difusión a través de la red de poros y por la película de principio activo fijada a la superficie de  $MPSiO_2$ . El perfil de la curva y la generación de la sobresaturación del fármaco, es producto de que la cinética de liberación del fármaco es mayor que la de cristalización y crecimiento de núcleos en el medio de disolución. Luego de un tiempo en que la nucleación y crecimiento permanecen como procesos dominantes, la concentración cae hasta alcanzar la concentración correspondiente a la forma cristalina. Este principio general, también se aplica al comportamiento *in vivo* del fármaco, con la condición adicional de eliminación de la droga, que es la absorción a través de las membranas del tracto gastrointestinal. La magnitud de la sobresaturación es por lo tanto determinada por la interacción entre la cinética de la liberación del fármaco desde el  $MPSiO_2$  y la cinética y termodinámica de formación de cristales del

fármaco en la solución. Lo último se explica principalmente por la naturaleza propia del fármaco y por su interacción con el medio de disolución. Las propiedades físicas y químicas del sistema de liberación tienen muy poca influencia en la recristalización del fármaco. Por otra parte, las propiedades del sistema de liberación, en particular la estructura física y química de  $\text{MPSiO}_2$ , son fundamentales de la cinética de liberación; por lo tanto, en la curva liberación (Figura 3), magnitud y duración de la sobresaturación en el tracto gastrointestinal. Con respecto a  $\text{MPSiO}_2$ , es importante comprender el efecto del tamaño de partícula, estructura de los poros y la química de la superficie en la cinética de la liberación de fármacos con el fin de optimizar la liberación de fármacos. (6)

El modelo matemático para la disolución de sólidos fue propuesto por Noyes-Whitney a inicios del siglo XX. A mediados del siglo XX, a raíz del influyente trabajo de Higuchi sobre películas para la liberación de fármacos, los modelos se han ido refinando y adaptando a sistemas específicos de liberación. La reciente revisión realizada por Siepmann-Siepmann (2013) proporciona un detallado panorama de los modelos de difusión controlada en los sistemas de liberación de fármacos. La ecuación de Noyes-Whitney es el primer planteamiento sobre la tasa de disolución de un fármaco desde una forma sólida, considera un proceso simple de difusión de las partículas sólidas con parámetros empíricos para cuantificar la tasa de disolución. La metodología de Nernst – Brunner introdujo el concepto de difusión a través de la capa alrededor de la partícula sólida, además complementa los parámetros empíricos de la ecuación original de Noyes-Whitney con los parámetros físicos de los sólidos. La ecuación que describe la tasa de disolución,  $dM/dt$ , es:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{SD}{\delta} (C_s - C_t)$$

Donde  $C_s$  es la solubilidad de la sustancia,  $C_t$  es la concentración del fármaco en un tiempo  $t$ ,  $S$  es el área superficial disponible para la difusión,  $\delta$  espesor de la capa de unión y  $D$  es el coeficiente de difusión del fármaco a través de la capa de unión. El área superficial y los parámetros de difusión se consideraron independientes del tiempo y las propiedades de difusión de la molécula y el medio de disolución como dependientes del tiempo. (6,24)

En muchos sistemas utilizados para la liberación de fármacos,  $S$  y  $D$  dependerán de las propiedades del sistema evaluado y pueden variar a medida que avanza la disolución. Hixon y Crowell (1931), ampliaron el modelo considerando el cambio en el área superficial a medida que cambia el radio de la partícula por la disolución. (6,24)

Para sistemas de liberación formulados utilizando  $MPSiO_2$ , las dimensiones y estructura de la red de poros, así como el diámetro de las partículas afectarán el coeficiente de difusión y el área superficial. El área superficial puede calcularse geoméricamente y el coeficiente de difusión mediante el planteamiento de transferencia de masa de partículas porosas. Mortera et al. (2010), ilustró ese planteamiento donde  $D$  se determinó mediante la ecuación de Stokes-Einstein para derivar la difusión del fármaco en el medio de disolución ( $D_{dm}$ ) y mediante la ecuación de Renkin se corrigió el valor de hidratación estérica ( $\delta$ ) y la constrictividad ( $\omega_t$ ) en los poros:

$$D = \frac{Ddm(\delta)(\omega t)}{\tau}$$

$$D = \frac{Ddm \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 \left(1 - 2.1 \left(\frac{a}{r}\right) + 2.09 \left(\frac{a}{r}\right)^3 - 0.95 \left(\frac{a}{r}\right)^5\right)}{\tau}$$

Donde  $\delta$  y  $\omega t$  son funciones de la relación entre el fármaco y los radios de los poros ( $a/r$ ) y  $\tau$  es la tortuosidad, que se supone es igual a uno si los poros son cilíndricos, como es el caso de los MPSiO<sub>2</sub> ordenados. Esta ecuación modificada ilustra de forma más clara la relación con los datos experimentales que la ecuación original de Noyes-Whitney. (6,24)

La construcción teórica, así como los modelos matemáticos aportan el sentido para comprender los efectos de las propiedades de MPSiO<sub>2</sub> en el desempeño de los sistemas de liberación de fármacos, en particular la estructura y dimensión de los poros. (6)

#### **2.2.4.3 Toxicología de dióxido de silicio mesoporoso**

En general, el SiO<sub>2</sub> no se considera peligroso para el ser humano. Debido a sus singulares propiedades, los MPSiO<sub>2</sub> han sido ampliamente estudiados para aplicarlos en el ámbito de la tecnología farmacéutica. El SiO<sub>2</sub> está incluido en el registro de excipientes farmacéuticos de la FDA, además de estar incluido en varias farmacopeas. El MPSiO<sub>2</sub> se ha venido utilizando en productos

farmacéuticos y alimentos por muchos años sin que se hayan reportado efectos adversos. (4)

Los estudios toxicológicos de MPSiO<sub>2</sub> se han orientado a investigar su seguridad al utilizarlo como portador en el suministro de fármacos. En primer lugar, es importante diferenciar la toxicidad de SiO<sub>2</sub> cristalino frente al amorfo. La inhalación SiO<sub>2</sub> cristalino es causante de silicosis. Sin embargo, es importante apuntar que SiO<sub>2</sub> amorfo presenta una mejor tolerancia pulmonar, probablemente por la elevada área superficial y su estado amorfo los cuales promueven su rápida disolución y remoción de los alveolos. (2)

Es importante la evaluación toxicológica de MPSiO<sub>2</sub> como portador de fármacos y de acuerdo a la vía de administración. Hudson et al. (2008), reportaron la seguridad de una dosis de 40 mg kg<sup>-1</sup> de sílice mesoporoso en ratones, por vía intraperitoneal e intravenosa. Sin embargo, dosis de 1200 mg kg<sup>-1</sup> fue letal para los ratones. En las vías subcutánea e intramuscular no se observó toxicidad. (2)

El impacto de la forma de las partículas de MPSiO<sub>2</sub> fue investigado por Huang et al. (2011), comparando el aclaramiento de partículas columnares cortas y largas de MPSiO<sub>2</sub> luego de la administración parenteral; demostrando que las partículas columnares cortas tienen un aclaramiento más rápido frente a las largas. Y en otro estudio comprobó que una dosis única de 500 mg kg<sup>-1</sup> y dosis diarias de 80 mg kg durante 14 días no mostraron signos de toxicidad y se alcanzó un aclaramiento completo luego de 4 semanas de producida la administración por vía intravenosa. (2)

#### 2.2.4.4 Aplicaciones de dióxido de silicio mesoporoso

El SiO<sub>2</sub> es largamente utilizado en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. Presenta un tamaño de partícula muy pequeño (7 - 16 nm) y una gran área superficial específica (100 - 400 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) que le brinda excelentes características reológicas y es útil para optimizar las propiedades de flujo de materiales en polvo en los procesos de producción de comprimidos y cápsulas. En los geles y formulaciones semisólidas el SiO<sub>2</sub> se utiliza para estabilizar las emulsiones y como agente espesante, tixotrópico y de suspensión. En aerosoles, que no sean para inhalación, el SiO<sub>2</sub> promueve la suspensión de partículas, elimina la sedimentación y minimiza la obstrucción en las boquillas de pulverización. (3)

Además de las funciones indicadas, se ha reconocido la capacidad de SiO<sub>2</sub> de interactuar con los fármacos, siendo esta propiedad la que ha llevado a una nueva era en su uso, como portador y modificador de la solubilidad de los ingredientes farmacéuticos activos. De acuerdo a esto se están investigando las siguientes aplicaciones. (4)

a. En fármacos de baja solubilidad en agua

Los materiales mesoporosos a base de SiO<sub>2</sub> son portadores de interés para incrementar la solubilidad y biodisponibilidad de fármacos de baja solubilidad. Mediante el confinamiento del fármaco en una red de poros, que estabiliza al fármaco en estado amorfo, produciendo de esta manera un

incremento en el área superficial del fármaco y un incremento de su humectabilidad. (2,6,11,22)

b. Incremento de la estabilidad

Al confinar a los fármacos en la trama de poros de  $\text{MPSiO}_2$ ; la enorme energía superficial de los mesoporos reduce la energía libre de Gibbs promoviendo la estabilidad de la forma amorfa del ingrediente farmacéutico activo. Además, la formación de núcleos y el crecimiento de cristales del fármaco se minimizan por el reducido espacio de los poros. (6,22)

c. Modificación de la liberación y administración dirigida de fármacos

La liberación de los principios activos depende del área superficial, diámetro y volumen de poros, presencia de los grupos silano en la superficie, etc. De acuerdo a esto, los poros cilíndricos y de pequeña abertura prolongan la difusión y liberación de los fármacos. Además, los perfiles de liberación también pueden modificarse por la modificación de la superficie del material mesoporoso, debido a las interacciones entre el fármaco y los grupos silanol del portador mesoporoso. (6,11,22)

d. Suministro de proteínas

La estabilidad de las proteínas y la concentración de moléculas de péptidos o proteínas que alcanzan el lugar de acción en un determinado rango de tiempo es una preocupación importante durante el desarrollo de sistemas de suministros de medicamentos. Investigaciones recientes han puesto en

evidencia a los MPSiO<sub>2</sub> como portadores de proteínas debido a su biocompatibilidad, baja toxicidad, elevada área superficial, capacidad de adsorción, tamaño de poros controlado y la posibilidad de modificar los grupos funcionales de la superficie. (6)

#### **2.2.4.5 Métodos de inclusión de fármacos en dióxido de silicio mesoporoso**

La mayoría de los métodos utilizados para realizar la inclusión de los fármacos en MPSiO<sub>2</sub> utilizan solventes orgánicos para solubilizar los principios activos que serán incluidos. La presencia de solventes orgánicos incorpora necesariamente al proceso una etapa de secado para eliminar el solvente o solventes utilizados.(25)

##### **A) Métodos basados en solventes**

###### **- Inmersión en solventes**

La inclusión del fármaco en MPSiO<sub>2</sub> se alcanza mediante la adsorción desde una solución del principio activo en un solvente adecuado. Se suspende una cantidad determinada de MPSiO<sub>2</sub> en una solución del fármaco, se somete a agitación durante 1 o 2 horas, luego se filtra para eliminar el exceso y separar el solvente; luego, el filtrado se somete a secado hasta obtener polvo seco.(25)

Para optimizar la disolución de Carvedilol, fármaco de pobre solubilidad en agua, Kovacic et al. (2011), realizaron la impregnación de SiO<sub>2</sub> (Sylysia) con una solución de Carvedilol en acetona. El método utilizado para lograr la

inclusión de Carvedilol en los poros de Sylysia fue el de inmersión en solventes. La caracterización de la inclusión de Carvedilol en Sylysia se realizó utilizando técnicas de adsorción/desorción de nitrógeno (BET), difracción de rayos X (DRX), determinación de la humectabilidad, espectroscopía infrarroja y análisis térmico. Los resultados mostraron que la inclusión de Carvedilol en Sylysia presenta un incremento significativo en la liberación del principio activo comparado con la disolución de Carvedilol y de la mezcla física del fármaco con Sylysia. (26)

Otra investigación que utiliza el método de inmersión en solventes es la desarrollada por Feliczak-Guzik et al. (2015), en la que se realizó la síntesis de MPSiO<sub>2</sub> modificado con grupos amino y quitosano; luego, mediante la caracterización del material sintetizado utilizando DRX, microscopía electrónica de barrido (MEB) y BET para la porosidad se demostró que MPSiO<sub>2</sub> obtenido presenta una configuración meso estructurada, gran área superficial y un diámetro de poros para diversas aplicaciones. Finalmente, se realizó la inclusión de furosemida mediante el método de inmersión con etanol y los estudios preliminares demostraron que el material mesoporoso sintetizado modifica el perfil de liberación furosemida. (27)

- **Secado por pulverización (Spray drying)**

Consiste en un método semejante al método de inmersión, siendo la principal diferencia la forma de remoción de los solventes; estos se eliminan mediante un proceso de secado por pulverización. Mediante este

procedimiento se obtienen partículas de forma esférica, característica que facilita el flujo y compresión del material. (25)

En la investigación desarrollada por Takeuchi et al. (2004), mediante los métodos de evaporación y secado por pulverización (spray drying) prepararon dispersiones de tolbutamida en dos tipos de SiO<sub>2</sub>, no porosos (Aerosil 200, Aerosil R972, ambos hidrofílicos) y porosos (Sylysia 350, Sylophobic 200, ambos hidrofóbicos), como portador de principios activos. Los resultados mostraron que la tasa de disolución de tolbutamida en las dispersiones sólidas preparadas con los tipos de SiO<sub>2</sub> hidrofílico fue marcadamente mayor comparadas con la velocidad de disolución de tolbutamida. (28)

- **Impregnación por humedad incipiente**

En esta técnica, se mezcla un volumen determinado de una solución del principio activo con una cantidad de sílice mesoporoso, el volumen de los poros del MPSiO<sub>2</sub> debe ser igual al volumen de solución con el principio activo. La inclusión del principio activo a la red de poros ocurre por capilaridad. (25)

Las principales limitaciones de este método están en el riesgo de formación de cristales en la superficie de las partículas de Sílice mesoporoso y el riesgo de no obtener una distribución homogénea de la solución que contiene al principio activo. (25)

Liao et al. (1984), realizó la incorporación de prednisona, prednisolona e hidrocortisona en SiO<sub>2</sub>, 2 no porosos y 3 porosos; el SiO<sub>2</sub> se utilizó como un medio para dispersar soluciones de los fármacos mediante el método de IHI para obtener polvos de un flujo adecuado para la producción de formas farmacéuticas sólidas. Los corticoides se disolvieron en N, N dimetilacetamida-propilenglicol 400 (7:3 v/v) y con esta solución se prepararon dispersiones de SiO<sub>2</sub> 10 % (p/v). La disolución se realizó en varios medios acuosos y mostró que los fármacos incluidos en el SiO<sub>2</sub> fue mayor comparado con la velocidad de disolución de los principios activos micronizados. (29)

Van Speybroeck et al. (2019), realizó la incorporación de varios fármacos de baja solubilidad acuosa (carbamecepa, cinarizina, danazol, diazepam, fenofibrato, griseofulvina, indometacina, ketoconazol, nifedipino y fenilbutazona) en MPSiO<sub>2</sub> para evaluar la optimización de la disolución. La incorporación se realizó mediante el método IHI. Los resultados de disolución mostraron la efectividad de MPSiO<sub>2</sub> para incrementar la velocidad de disolución. (30)

## **B) Métodos libres de solventes**

### **- Mezcla por fusión**

La aplicación de calor a la mezcla de fármaco y Sílice mesoporoso promoverá la transformación de los cristales de principio activo en una forma amorfa por

el entrapamiento en la red estructurada de poso del material mesoporoso.  
(25)

Este método elimina el inconveniente de utilizar solventes orgánicos, sin embargo, resulta poco conveniente para fármacos termolábiles. (25)

Watanabe et al. (2001), evaluaron la recristalización de indometacina incluida en dispersiones de SiO<sub>2</sub> obtenidas mediante co-molienda o por mezcla por fusión, las condiciones de almacenamiento de las muestras fueron de 30° C y 11 % de humedad relativa. Se determinó una reducción de la tasa de cristalización con o sin período de inducción en ambas muestras. En dos métodos, co-molienda prolongada y mezclado por fusión, se alcanzó una elevada estabilidad para la forma amorfa de indometacina. Esto se determinó mediante las pruebas de resonancia magnética nuclear en las que se observó una gran interacción química entre el fármaco y SiO<sub>2</sub> en la interfase de la dispersión en las muestras obtenidas mediante co-molienda. Sin embargo, una co-molienda incompleta genera un estado amorfo inestable debido a la recristalización de los cristales remanentes, los cuales actúan como iniciadores de la recristalización. (31)

#### - **Co-molienda**

El objetivo de este método es alcanzar la “amorfización” del principio activo mediante la interacción entre el fármaco y MPSiO<sub>2</sub> con la formación de

puentes de hidrógeno; para ello la mezcla de fármaco con MPSiO<sub>2</sub> se somete a un molino de bolas, compactador de rodillos o un sistema planetario.(6)

Entre los factores que influyen la cantidad de fármaco incluido en MPSiO<sub>2</sub> y el nivel de “amorfización” alcanzado están el tiempo e intensidad de mezclado, nivel de presión y humedad. (25)

Pan et al. (2008), desarrollaron una investigación con el propósito de investigar la transición del estado cristalino al amorfo (“amorfización”), fenómeno que ocurre cuando se realiza el mezclado de principios activos en estado cristalino con adsorbentes porosos. Para este estudio se utilizó indometacina y tres tipos de SiO<sub>2</sub>. La transformación del estado cristalino a amorfo de indometacina ocurre durante la mezcla seca con el SiO<sub>2</sub> y es independiente de la intensidad y tiempo de mezclado. Los resultados mostraron un incremento en la tasa de disolución de las mezclas de indometacina y SiO<sub>2</sub> comparada con la velocidad de disolución de indometacina en estado cristalino, y estos resultados están directamente asociados a la cantidad de material convertido a amorfo. (32)

#### **2.2.4.6 Caracterización de fármacos en dióxido de silicio mesoporoso**

Los métodos que se utilizan para caracterizar la inclusión de fármacos en MPSiO<sub>2</sub> se enfocan en establecer la presencia del fármaco en el interior de los poros, en determinar la cantidad de fármaco incluido en el MPSiO<sub>2</sub> y en demostrar los cambios en la cristalinidad del fármaco debido a su inclusión en la trama de poros

de MPSiO<sub>2</sub>. Para determinar la presencia del principio activo en los poros se utiliza BET, para establecer la cantidad de fármaco en el material mesoporoso es factible utilizar termogravimetría (TG), Cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y espectroscopía UV visible. Finalmente, los cambios en la cristalinidad de furosemida se pueden determinar por calorimetría diferencial de barrido (CDB), DRX y microscopía electrónica de barrido (MEB). (22) (2)

Para cuantificar principios activos en MPSiO<sub>2</sub>, los métodos más usuales son aquellos que requieren una etapa previa de extracción (HPLC y UV) y TG. En los métodos que requieren de extracción, el fármaco debe liberarse previamente desde la red de poros de MPSiO<sub>2</sub> hacia un medio líquido en el cual será cuantificado. Con frecuencia se utiliza HPLC para la cuantificación de la cantidad total del fármaco; además, este método brinda información adicional sobre una posible degradación del fármaco en MPSiO<sub>2</sub>. Otro método para realizar la cuantificación es UV para moléculas con marcada absorción en el rango ultravioleta o el de luz visible. Sin embargo, en los métodos de extracción, es indispensable asegurar la extracción de la totalidad del fármaco incluido en MPSiO<sub>2</sub> para obtener resultados confiables. En TG el peso del fármaco se determina en función de la variación de la temperatura. La masa del fármaco incluido en MPSiO<sub>2</sub> se determina por la pérdida de masa debido a la descomposición térmica la cual ocurre a temperaturas más bajas comparadas con la temperatura de descomposición de MPSiO<sub>2</sub>. (22)

Para la caracterización del estado físico de los fármacos en MPSiO<sub>2</sub> los métodos más usuales son DRX y CDB. Ambos métodos se utilizan para determinar el estado cristalino y las dimensiones de los cristales del material incluido en

MPSiO<sub>2</sub>. En la DRX, el ancho de los picos se incrementa cuando disminuye el tamaño de los cristales. La CDB permite diferenciar al fármaco ubicado dentro de los poros del fármaco depositado en la superficie de las partículas de MPSiO<sub>2</sub>, debido a que el fármaco incluido en los poros no forma la curva endotérmica de fusión del fármaco. Si el fármaco cristaliza dentro de los poros, esto produce una depresión de la curva endotérmica de fusión por el tamaño reducido de los cristales. Por el contrario, si el fármaco está en estado amorfo no se observa la curva endotérmica de fusión. Además, BET nos son útiles para determinar la presencia del fármaco en los poros debido a la disminución del área superficial. (22)

Finalmente, la MEB es útil para el estudio de la forma y superficie de las partículas, así como sus dimensiones. (2)

### **2.2.5 Furosemida**

Furosemida es un diurético de techo alto administrado para el tratamiento de edemas asociados a problemas cardíacos, hepáticos y renales; así como en el tratamiento de la hipertensión.(7) Furosemida es un agente diurético que se administra por vía oral e intravenosa, actúa en la porción gruesa de la rama ascendente del asa de Henle. El mecanismo de acción es la inhibición del cotransportador Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> que existe en la membrana luminal, originando un aumento en la cantidad de sodio que llega al túbulo colector, produciendo un incremento de la secreción de K<sup>+</sup> y de H<sup>+</sup>.(33)

Furosemida es un fármaco modelo de la clase biofarmacéutica IV, mayormente se absorbe en el estómago y en la sección proximal del intestino delgado; desafortunadamente, en esas zonas este diurético presenta muy baja solubilidad, por lo tanto, luego de la administración oral, furosemida presenta una baja biodisponibilidad muy variable y un perfil farmacocinético variable.(10) Las características de furosemida han sido descritas en diversas investigaciones, las cuales aparecen resumidas en la Tabla 3 y confirman que furosemida pertenece a la clase biofarmacéutica IV, señalan que presenta rangos ampliamente variados de biodisponibilidad y una muy pobre solubilidad en agua.

Tabla 3. Clase biofarmacéutica, biodisponibilidad y solubilidad de furosemida (Fuente: elaboración propia)

CLASE BIOFARMACÉUTICA	BIODISPONIBILIDAD	COMENTARIO *	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
IV	---	---	(34)
IV	---	Biodisponibilidad reducida	(7)
IV	---	Absorción errática	(8)
IV	---	Solubilidad menor que 100 µg/ml en agua	(27)
IV	20 – 60 %	Biodisponibilidad altamente variable	(9)
IV	60 – 65 %	Fármaco representativo de clase IV	(10)
IV	60 – 65 %	Modelo de clase biofarmacéutica IV Presenta solubilidad muy baja (5 – 20 µg/mL) en la zona de absorción (mucosa gástrica e intestino delgado)	(35)
IV	---	Solubilidad de 0.25 mg/ml	(22)
IV	50 – 61 %	---	(36)
IV	---	Fármaco modelo de clase IV Solubilidad muy baja (5 – 20 µg/mL)	(37)
IV	37 – 51 %	Absorción variable	(38)

\* Descripción de furosemida que el autor (s) señala en cada una de las referencias indicadas.

Estudios previos han señalado la importancia de  $\text{MPSiO}_2$  para incrementar la disolución de furosemida, evaluando el impacto distintos grupos funcionales en la superficie de los poros, probando distintos métodos de inclusión del fármaco en  $\text{MPSiO}_2$ , etc., entre los cuales podemos citar la investigación desarrollada por Feliczak-Guzik et al. (2015), en la que se realizó la síntesis de  $\text{MPSiO}_2$  modificado con grupos amino y quitosano; luego, mediante la caracterización del material sintetizado utilizando DRX, MEB y BET para la porosidad se demostró que  $\text{MPSiO}_2$  obtenido presente una configuración mesoestructurada, gran área superficial y un diámetro de poros para diversas aplicaciones. Finalmente, se realizó la inclusión de furosemida mediante el método de inmersión con Etanol y los estudios preliminares demostraron que el material mesoporoso sintetizado modifica el perfil de liberación furosemida. (27)

Otro estudio importante es el desarrollado por Ambrogi V. et al. (2012), en la que realizaron la síntesis y caracterización  $\text{MPSiO}_2$ . Luego, se realizó la inclusión de furosemida mediante 3 variantes del método de inmersión utilizando etanol y dimetilsulfóxido. Finalmente, se demostró el incremento en la liberación de furosemida en los estudios de disolución in vitro; sin embargo, la cantidad de furosemida que se logró incluir estuvo en un porcentaje muy bajo, alrededor de 3 %.(10)

### 2.2.5.1 Estudios de biodisponibilidad

Optimizar la biodisponibilidad de los fármacos en los fluidos biológicos es uno de los desafíos más importantes de la investigación en tecnología farmacéutica. Sin embargo, es ampliamente conocida la baja correlación entre los estudios *in vitro* e *in vivo*; por lo tanto, son necesarios los estudios en animales durante el desarrollo de formulaciones con fármacos de pobre solubilidad acuosa. (22)

En la investigación realizada por Van Speybroeck et al. (2019), el objetivo principal fue el estudio del efecto de la liberación y absorción de fenofibrato (fármaco de baja solubilidad acuosa) incluido en MPSiO<sub>2</sub>. Los estudios de liberación se realizaron teniendo en cuenta lo siguiente: condición “sink”, medio super saturado, bajo alimentación y ayuno. Subsecuentemente, los estudios *in vivo* de todas las formulaciones se realizaron en un modelo animal con ratas Wistar (300 - 380 g), con tomas de muestra a 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 24 h y los resultados obtenidos de concentración sérica máxima (C<sub>máx</sub>), tiempo concentración sérica máxima (T<sub>máx</sub>) y área bajo la curva (ABC) (n=3) muestran que el control de la liberación de fenofibrato por MPSiO<sub>2</sub> contribuye a incrementar su absorción. (39)

Wang, F. et al. (2010), realizó la inclusión de indometacina, fármaco de clase biofarmacéutica II, de baja solubilidad, en MPSiO<sub>2</sub> de superficie funcionalizada para optimizar la liberación del fármaco por vía oral. La inclusión de indometacina en MPSiO<sub>2</sub> demostró el incremento de la absorción por vía oral comparado con el fármaco en estado cristalino, este incremento se tradujo en la

reducción de 4 veces el  $T_{m\acute{a}x}$  y un incremento de 200 % en  $C_{m\acute{a}x}$ . Los estudios in vivo se realizaron con grupos de 4 ratas Sprague-Dawley (330 g de peso). (40)

#### **2.2.5.2 Proyección industrial del método continuo de impregnación por humedad incipiente**

Los comprimidos y cápsulas siguen siendo las formas farmacéuticas más utilizadas desde el siglo XIX. Existen varias razones que explican la gran aceptación que tienen las formas sólidas orales. En primer lugar, la vía oral es la menos invasiva de las vías de administración; los pacientes pueden administrar la forma de dosificación por sí mismos. Para la industria farmacéutica, las formas sólidas presentan ventajas importantes; como, por ejemplo, utilizan tecnología muy accesible para la producción, son las formas farmacéuticas con menos problemas de estabilidad, ocupan muy poco volumen, lo cual facilita el almacenamiento y transporte; y pueden formularse de formas muy diversas para facilitar su identificación. Finalmente, los comprimidos y cápsulas pueden diseñarse de diversos tipos para adecuarlos a necesidades terapéuticas específicas. (1)

Como se ha señalado anteriormente, la formulación de formas farmacéuticas sólidas debe conducir a la obtención de productos que cumplan con la biodisponibilidad, sean estables fisicoquímicamente y factibles de manufacturar. Sin embargo, la biodisponibilidad se ve afectada por la gran cantidad de fármacos insolubles en agua que se vienen descubriendo en los últimos años, como ya se ha indicado, se estima que más del 70 % de las nuevas moléculas son insolubles en

agua; por esta razón se han venido investigando diversas técnicas para optimizar la solubilidad acuosa de los principios activos, dentro de ellas se tiene como una alternativa de relevante interés a la incorporación de fármacos en los nano poros de dióxido de silicio mesoporoso. Además, otro de los desafíos importantes en el desarrollo de formas sólidas orales es el diseño de un proceso factible de manufacturar con la tecnología existente por esta razón en el presente estudio se realizó la modificación de la metodología IHI de un método de inmersión en solventes a uno continuo con el fin de utilizar la tecnología de los mezcladores amasadores con vacío y calefactor (Figura 4) y así facilitar el escalamiento desde la etapa de laboratorio, luego a nivel piloto y a escala industrial. (1,21,41)

Los mezcladores amasadores con vacío y calefactor van a permitir realizar la incorporación de la solución de furosemida a los poros de dióxido de silicio coloidal de forma gradual para evitar la cristalización en la superficie de las partículas, en simultáneo realizar la evaporación del solvente con el sistema de calefacción el cual permite tener una temperatura muy precisa y homogénea dentro del contenedor; asimismo, el sistema de vacío evitará la formación de condensado al interior del contenedor y facilitará la eliminación de los vapores del solvente; esta eliminación se realiza con protección anti explosiones mediante la inertización del equipo con un gas inerte como nitrógeno.(41)



*Figura 4. Mezclador amasador con vacío y calefactor. Fuente: [www.diosna.com](http://www.diosna.com)*

### 2.3 Justificación del estudio

La investigación para lograr el incremento de la velocidad de disolución y biodisponibilidad de furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub> mediante un sistema continuo de IHI es importante por las siguientes razones; la primera, facilitar la formulación de formas farmacéuticas sólidas con principios activos de pobre solubilidad acuosa que cumplan adecuadamente con la prueba de disolución establecida en las farmacopeas oficiales, se disuelvan en los fluidos gastrointestinales para facilitar su absorción y; en segundo lugar, propiciar la utilización de una metodología factible de realizar a nivel de laboratorio y con gran potencial de escalamiento a nivel piloto e industrial en los procesos farmacéuticos.

Las formas farmacéuticas sólidas como las cápsulas, comprimidos, gránulos y polvos son las formas farmacéuticas de mayor producción en la industria farmacéutica por varias razones, entre ellas es que la vía oral es la menos invasiva para la administración de fármacos, además de ser la más aceptada y conocida por el paciente. También es una ventaja el hecho de que el paciente no requiera de asistencia para la administración de las formas sólidas. Por lo tanto, la investigación en el desarrollo de estrategias para lograr que un fármaco insoluble se disuelva in vitro, en los fluidos gastrointestinales y que la forma farmacéutica cumpla adecuadamente con la biodisponibilidad es un ámbito de vasto interés en la investigación de la tecnología farmacéutica.

Una limitante para la implementación de nuevas tecnologías y métodos a nivel industrial está en la dificultad de reproducir a una mayor escala la investigación de

laboratorio, tales como a un nivel de piloto e industrial. En la presente investigación se utilizará un método continuo de IHI para realizar la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, metodología que se podrá realizar fácilmente con los equipos existentes en el laboratorio y que será factible de escalar a nivel industrial con los equipos utilizados en los procesos farmacéuticos debido a que es procedimiento semejante al proceso de granulación húmeda ampliamente utilizado en los procesos de producción de la industria farmacéutica.

## **2.4 Objetivos**

### **2.4.1 Objetivo general**

Evaluar la biodisponibilidad y velocidad de disolución de furosemida incluida en Parateck® SLC 500 USP, Ph. Eur - Dióxido de silicio mesoporoso (P-SiO<sub>2</sub>) obtenida en un sistema continuo de impregnación por humedad incipiente

### **2.4.2 Objetivos específicos**

1. Caracterizar la inclusión de furosemida en Parateck® SLC 500 USP, Ph. Eur - dióxido de silicio mesoporoso (P-SiO<sub>2</sub>).
2. Evaluar la disolución de la inclusión de furosemida en Parateck® SLC 500 USP, Ph. Eur - dióxido de silicio mesoporoso (P-SiO<sub>2</sub>).
3. Evaluar la biodisponibilidad de furosemida incluida en Parateck® SLC 500 USP, Ph. Eur - dióxido de silicio mesoporoso (P-SiO<sub>2</sub>) utilizando un modelo experimental en ratas.

### **3. HIPOTESIS**

La inclusión de furosemida en Parateck® SLC 500 USP, Ph. Eur - dióxido de silicio mesoporoso (P-SiO<sub>2</sub>) mediante un sistema continuo de impregnación por humedad incipiente (IHI) logrará incrementar su velocidad de disolución y biodisponibilidad.

## 4. METODOLOGÍA

En el presente capítulo se detalla el diseño de la investigación, los materiales y metodología utilizados para realizar la inclusión de furosemida en la red de poros de P-SiO<sub>2</sub>; los reactivos y técnicas de laboratorio empleados para efectuar la caracterización de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>; así como, los procedimientos para evaluar la disolución y la farmacocinética *in vivo*.

### 4.1 Diseño de la investigación

Diseño de investigación: comparativo, experimental y prospectivo. Mediante un sistema continuo de IHI se incorporó furosemida a los nanoporos de P-SiO<sub>2</sub>; luego, se caracterizó la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, se evaluó la disolución *in vitro* y su biodisponibilidad en ratas. La caracterización de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> consistió en determinar el contenido de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> mediante HPLC y TG; el cambio en la cristalinidad se determinó mediante CDB y DRX; la topografía de los poros y la inserción de furosemida se evidenció mediante MEB y la reducción de la porosidad por la inclusión de furosemida se analizó utilizando BET. La evaluación de disolución se realizó de acuerdo al método de la USP 42-NF 37 y se determinó la cinética de disolución de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, furosemida en cristales (materia prima) y a comprimidos de furosemida (40 mg, Mylan®). Finalmente, en la evaluación de la farmacocinética *in vivo* se compararon los parámetros de ABC, C<sub>máx</sub> y T<sub>máx</sub> de la inclusión furosemida en P-SiO<sub>2</sub> frente a furosemida cristalina (material prima).

## **4.2 Materiales**

### **4.2.1 Reactivos**

Parreck® SLC 500 USP, Ph. Eur - Sílice mesoporoso (Merck, Alemania), furosemida (Suleshvari pharma, India), etanol (J.T. Baker, México), ácido acético glacial (J.T. Baker, México), acetonitrilo (J.T. Baker, México), tetrahidrofurano (J.T. Baker, México), ácido clorhídrico (J.T. Baker, México), hidróxido de sodio (Merck, Alemania), fosfato monobásico de potasio (J.T. Baker, México), agua ultra pura, estándar de trabajo (ET) de furosemida (Suleshvari pharma, India) trazado con estándar de referencia (ER) USP lote: M0M043.

### **4.2.2 Animales de laboratorio**

Se utilizaron 45 ratas de la cepa Sprague-Dawley, machos, de 2 meses de edad, con un peso corporal entre 200-240 g, las cuales provinieron del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. El ambiente donde permanecieron durante el periodo de aclimatación y durante la ejecución de las pruebas tuvo un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con temperatura y humedad relativa de 22° C y 70 % respectivamente; para su alojamiento se utilizaron jaulas de polipropileno en donde se colocaron en grupos de 3 ratas por jaula para mayor comodidad de los animales y adecuado manejo en el periodo previo y durante la ejecución de la prueba. Durante su estancia tuvieron agua *ad libitum* y pellets de alimento balanceado proveniente de la Universidad Agraria de la Molina.

La utilización de animales en la presente investigación fue aprobada por el Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia mediante la constancia 041-04-19 del 24 de abril de 2019. El trabajo con animales de experimentación fue realizado en el área de modelos biológicos y toxicológicos del laboratorio de Servicio de Control de Calidad.

### **4.3 Preparación de la inclusión de furosemida en Parateck® SLC 500 USP, Ph. Eur - dióxido de silicio mesoporoso**

#### **4.3.1 Determinación de los parámetros de operación**

La inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> se realizó mediante IHI y los parámetros de operación del sistema se establecieron con la finalidad de diseñar un proceso eficiente que garantice el confinamiento de furosemida en la red de poros de P-SiO<sub>2</sub>. De acuerdo a esto, se buscó:

- Determinar el flujo óptimo de solución de furosemida, para evitar la sobre humectación de P-SiO<sub>2</sub> o hacer un proceso muy prolongado por el bajo flujo de aplicación.
- Establecer el flujo de nitrógeno y presión de vacío que evite la formación de condensado en las paredes del contenedor, la pérdida de P-SiO<sub>2</sub> por la succión de la bomba de vacío o prevenir el movimiento brusco de P-SiO<sub>2</sub> dentro del contenedor.
- Especificar un rango de temperatura alrededor del punto de ebullición de etanol para evitar un secado brusco de la solución que produzca la

cristalización de furosemida en la superficie de las partículas de P-SiO<sub>2</sub>, o de lo contrario, producir una sobre humectación y formación de aglomerados de P-SiO<sub>2</sub> por falta de evaporación del solvente.

De acuerdo a lo señalado, los valores evaluados y establecidos para los parámetros operacionales del sistema IHI utilizado para incorporar furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros operacionales del proceso de incorporación de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>. (Fuente: elaboración propia)

<b>Parámetro</b>	<b>Valores analizados</b>	<b>Comentario</b>
<b>Flujo de solución (mL h<sup>-1</sup>)</b>	< 30	Proceso muy largo, mayor a 7 horas
	30 a 35	Duración de proceso entre 6 y 7 horas
	> 35	Se forman aglomerados húmedos de P-SiO <sub>2</sub>
<b>Presión de Nitrógeno (Bar)</b>	< 2.5	Presencia de condensado en las paredes del contenedor
	2.5 a 3.5	Desempeño adecuado del proceso
	>3.5	Movimiento brusco de P-SiO <sub>2</sub> dentro de contenedor
<b>Presión de vacío (Bar)</b>	- 0.1	Presencia de condensado en las paredes del contenedor
	- 0.2 a - 0.3	Desempeño adecuado del proceso
	- 0.4	Pérdida de P-SiO <sub>2</sub> en ducto de vacío
<b>Velocidad de agitación (r.p.m.)</b>	< 15	Formación de aglomerados húmedos de P-SiO <sub>2</sub>
	15 a 25	Desempeño adecuado del proceso
	> 25	Movimiento brusco de P-SiO <sub>2</sub> dentro de contenedor
<b>Temperatura de baño maría (° C)</b>	< 78	Formación de aglomerados húmedos de P-SiO <sub>2</sub>
	78 a 80	Desempeño adecuado del proceso
	> 80	Secado muy rápido de solución de fármaco

#### **4.3.2 Inclusión de furosemida en Parteck® SLC 500 USP, Ph. Eur - Dióxido de silicio mesoporoso**

La inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> se realizó mediante un sistema continuo de IHI (ver Figura 5). Se preparó una solución de furosemida en etanol al 2 % (p/v). En primer lugar, se secó P-SiO<sub>2</sub> a 100° C durante 4 horas; luego, se colocó en un vaso de precipitados, se mantuvo en baño maría a una temperatura entre 78° C a 80° C y con el nivel del agua ligeramente por encima del nivel de P-SiO<sub>2</sub> en el contenedor. Se incorporó al contenedor de P-SiO<sub>2</sub> una conexión para el ingreso de nitrógeno a una presión de 3.5 bares y una para el vacío a una presión de aproximadamente -0.2 bares. Finalmente, se inició la agitación de P-SiO<sub>2</sub> mediante un agitador vertical a una velocidad entre 15 a 25 r.p.m. y se aplicó la solución de furosemida sobre P-SiO<sub>2</sub> mediante una bomba de infusión manteniendo un flujo de 30 a 35 mL hora<sup>-1</sup> durante toda la aplicación. Finalmente, luego de finalizada la aplicación de la solución de furosemida, se sometió a secado a P-SiO<sub>2</sub> durante 12 horas a una temperatura de 78 a 80° C para evaporar todo resto de alcohol etílico.

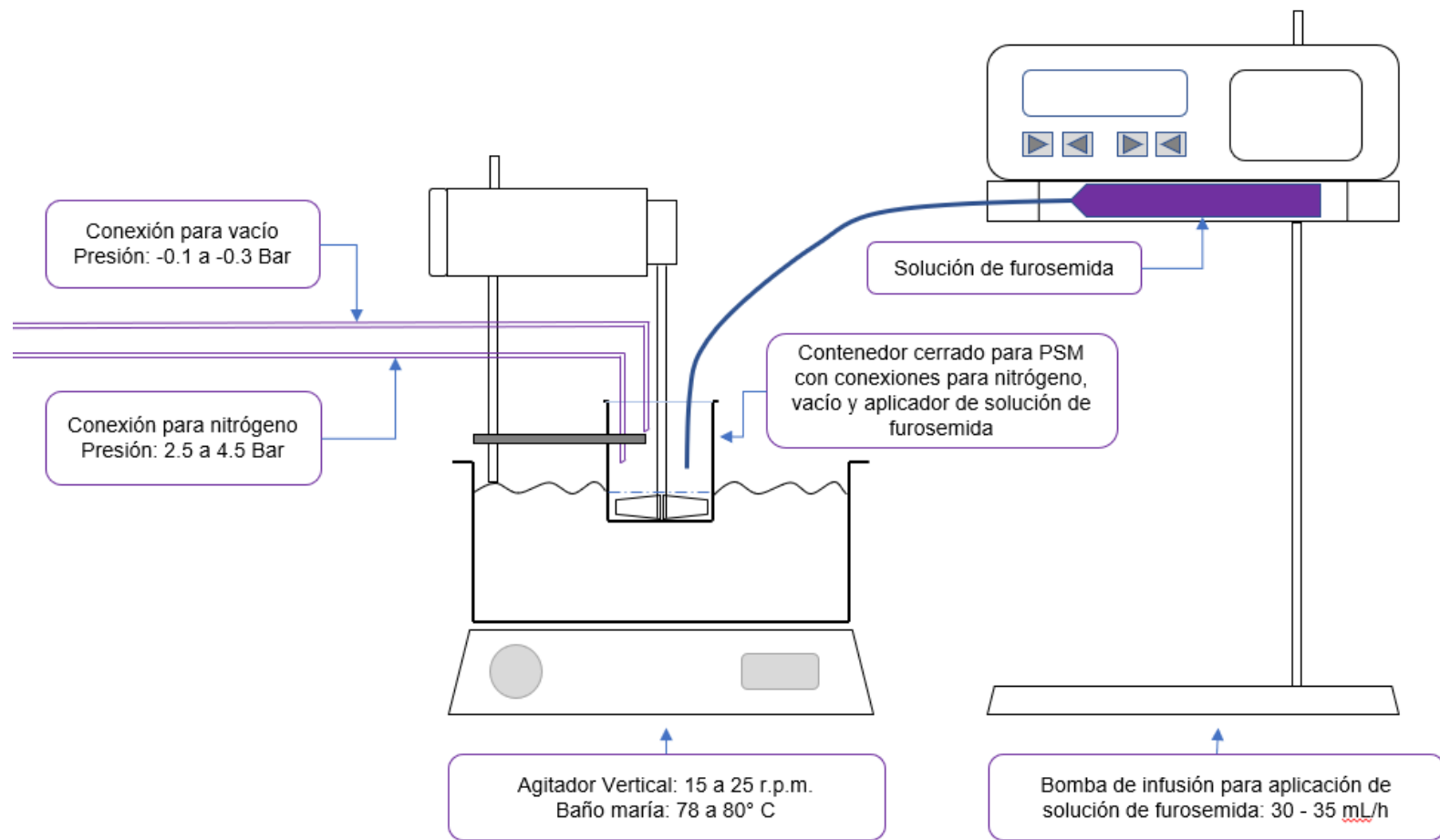


Figura 5. Sistema para impregnación por humedad incipiente. Fuente: Elaboración propia.

#### **4.4 Caracterización de la inclusión de furosemida en Parateck® SLC 500 USP, Ph. Eur - Dióxido de silicio mesoporoso**

Las pruebas de caracterización de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> se realizaron en el Laboratorio de servicio de control de calidad - UPCH (cuantificación de furosemida mediante HPLC), Laboratorio de Cerámicos y Nanomateriales de la Facultad de Ciencias Físicas - UNMSM (cuantificación de furosemida mediante TG) y en el Centro de Caracterización de Materiales – PUCP (imágenes por MEB, análisis de CDB, DRX y BET).

##### **4.4.1 Valoración de contenido de furosemida**

La cantidad de furosemida en las muestras de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, furosemida cristalina (materia prima) y comprimidos de furosemida (40 mg, Mylan®) se cuantificó mediante HPLC, de acuerdo al método de valoración de contenido de comprimidos de furosemida de la USP 42-NF 37. Para las muestras de inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> y comprimidos de furosemida (40 mg, Mylan®), la técnica consistió en pesar y homogeneizar en un mortero una cantidad determinada de las muestras, luego se transfirió una porción de polvo pesado con exactitud, equivalente a 50 mg de furosemida, a una fiola de 50 mL, se agregaron 30 mL de solución de dilución y se sometió a ultrasonido durante 20 minutos. Luego, se agregó solución de dilución a volumen, se mezcló y filtró, desechando los primeros 10 mL del filtrado. Para el caso de la muestra de furosemida se pesó con exactitud la cantidad de 50 mg y se procedió a la preparación de la muestra de acuerdo a lo indicado líneas arriba. (42)

Luego, cada una de las muestras se inyectaron por separado en el HPLC en volúmenes iguales de 10  $\mu\text{L}$  de la preparación de ET y de la preparación de valoración, se empleó una columna Zorbax Extend-C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm x 150 cm; velocidad de flujo 1  $\text{mL min}^{-1}$ , se midió la respuesta a 254 nm; se registraron los cromatogramas, se midieron las respuestas correspondientes a los picos y se calculó la cantidad de furosemida en mg por gramo y porcentaje. (42)

El porcentaje de furosemida presente se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Furosemida}(\%) = \left( \frac{\text{Área M}}{\text{Área E}} \right) \left( \frac{\text{Peso E}}{25} \right) (\text{Potencia E}) \left( \frac{50}{\text{Peso M}} \right) (100)$$

En donde:

Área M: área de muestra

Área E: área de estándar

Peso E: peso de estándar

Potencia E: potencia de estándar

Peso M: peso de muestra

Preparación del ET, se disolvió una cantidad de ET de furosemida, pesado con exactitud, en la solución de dilución para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1,0 mg por mL.

Fase móvil, se mezcló tetrahidrofurano, ácido acético glacial y agua en las proporciones 300:10:700.

Solución de dilución, se diluyó 22 mL de ácido acético glacial con una mezcla de acetonitrilo agua (50:50) hasta completar 1000 mL.

#### **4.4.2 Análisis Termogravimétrico**

Se utilizó el TG para determinar la cantidad de furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub>. La determinación de la cantidad de furosemida se realizó en un equipo Linseis STA PT-1600 (Selb, Alemania); luego de encender el equipo se estabilizó la señal a 0 o un valor muy cercano a 0. Se pesó con exactitud 20 mg de cada una de las muestras, se colocaron en crisoles de porcelana; luego, se colocaron las muestras en el horno, y se sometieron a incrementos de temperatura de 10° C min<sup>-1</sup>, entre 0° y 800° C. Los datos registrados en formato ASCII se procesaron con el *software* Origin 2017® para determinar el contenido de furosemida perdido entre 250 y 800° C.

#### **4.4.3 Análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido**

Para realizar el CDB de furosemida y de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> se utilizó el equipo NETZSCH STA 449F3 (Alemania). Luego de encender el equipo se estabilizó la señal a 0 o en un valor muy cercano a 0. Se pesó con exactitud 5 mg de cada una de las muestras, se colocaron en crisoles de aluminio con “pin hole” en la tapa; luego, se colocaron las muestras en el horno, y se sometieron a incrementos de temperatura de 10° C min<sup>-1</sup>, entre 0° y 600° C, en una atmósfera inerte de nitrógeno con un flujo de 50 mL min<sup>-1</sup>. Los datos registrados en formato

ASCII se procesaron con el software Origin 2017® para determinar el flujo de energía entre 250 y 600° C.

#### **4.4.4 Análisis por Difracción de Rayos X**

Los difractogramas de furosemida y de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> se realizaron en un equipo Bruker modelo D8 Discover (Billerica, Massachusetts, Estados Unidos), equipado con detectores LynxEye. Una vez encendido del equipo se procedió a incrementar el voltaje (kV) y el amperaje (mA) de 20/10 (valores en reposo) a 40/40 (valores en operación). Luego, ingresar los valores de los *drivers* del sistema: theta: 0, 2 theta: 0, chi: 0, phi: 0, x: 0, y: 0 y Z: -0.9. Luego, colocar la muestra de furosemida en el portador de muestras y colocarla en el equipo. Luego, iniciar la lectura entre -1 a 1 en el rango de  $2\Theta = 5^\circ$  hasta  $2\Theta = 90^\circ$ , con variaciones de  $0.02^\circ$  por segundo y un tiempo total de análisis de 1.5 horas. Se procedió de acuerdo a la metodología indicada para la obtención del difractograma de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>. Los datos registrados en formato ASCII se procesaron con el *software* Origin 2017® para determinar los picos de ambas muestras.

#### **4.4.5 Análisis por Microscopia electrónica de barrido**

Las imágenes de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> y de P-SiO<sub>2</sub> se obtuvieron mediante un microscopio FEI, modelo Quanta 650 (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Las muestras de P-SiO<sub>2</sub> y furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub> se prepararon en una *clean-room*, utilizando guantes y mascarillas para evitar el

aporte de partículas extrañas a las muestras; luego, se colocaron cuidadosamente en los portadores de muestras del equipo, utilizando una cinta de carbono para fijarlas, y se soplaron suavemente con una pistola de nitrógeno para eliminar todo riesgo de contaminación.

Una vez preparadas las muestras, se introdujeron a la cámara del equipo, se seleccionó el modo de alto vacío, y una vez alcanzada la presión de  $5 \times 10^{-5}$  Torr y se encendió el haz de electrones y se procedió a capturar las imágenes navegando sobre la superficie de las muestras, las imágenes se tomaron con aumentos entre 3000x y 10000x con el detector de electrones secundarios E-T (Everhart-Thornely).

#### **4.4.6 Análisis de Área Superficial Específica**

El análisis de la superficie específica se realizó en el equipo Gemini VII (Norcross, Georgia, Estados Unidos). Para realizar la medición; en primer lugar, se encendió el equipo 30 minutos antes de iniciar la prueba. Luego, se colocó el material en la porta muestra de vidrio, se pesó en una balanza analítica tres veces y se registraron los pesos obtenidos. Se colocó la muestra en la unidad de calentamiento del equipo BET para eliminar el aire, las muestras de P-SiO<sub>2</sub> y de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> se desgasificaron a 130° C y 90° C respectivamente, durante 4 horas en atmósfera de helio, luego del cual se enfrió la muestra y se pesó nuevamente para determinar la masa perdida. Al finalizar, la etapa de vacío, se colocó el portador de vidrio conteniendo la muestra en el equipo BET y se inició la medición enfriando la muestra a 77 K, seguido de la inyección

de nitrógeno a varias presiones para determinar el nitrógeno desplazado para el cálculo de la superficie específica. La cantidad de Nitrógeno absorbido durante un barrido de presión relativa ( $p/p^\circ$ ) determina las isothermas de adsorción-desorción y a partir del modelamiento BET (Brunauer, Emmett y Teller) se determinó el área específica de las muestras. Los datos registrados se procesaron con *Microsoft Excel* 2016 para determinar la porosidad de las muestras.

#### **4.5 Evaluación de disolución**

Los estudios de disolución se realizaron de acuerdo a lo establecido en la monografía <711> disolución y al método de disolución señalado para comprimidos de furosemida de la USP 42-NF 37. Las muestras analizadas fueron la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, furosemida y comprimidos de furosemida (40 mg, Mylan®). (42)

Cada una de las muestras se analizó por triplicado ( $n=3$ ), de acuerdo al siguiente procedimiento, se colocó 900 mL del medio de solución amortiguadora de fosfato de pH 5,8 en cada uno de los vasos del aparato Disolutor Distek 2100C, luego se ensambló el aparato 2 (paletas), se ajustó la temperatura del medio a  $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$  y se procedió a colocar la cantidad de muestra equivalente a 40 mg de furosemida para la inclusión de furosemida y para furosemida; luego, se puso a funcionar el aparato durante un tiempo de 90 minutos a una velocidad 50 r.p.m. y se fue retirando 5 mL de medio de disolución a los 5, 10, 15, 20, 40, 60 y 90 minutos. Finalmente, se filtraron los 5 mL muestreados, se tomaron 2 mL del filtrado en una fiola de 50 mL, se completó a volumen con solución amortiguadora de fosfato

de pH 5,8 y se determinó la cantidad de furosemida a partir de las absorbancias UV en el punto isobéptico a 274 nm en porciones filtradas de la solución en análisis, diluidas apropiadamente en solución amortiguadora fosfato de pH 5,8, en comparación con una solución estándar que contenga una concentración conocida de furosemida en el mismo medio. (42)

El porcentaje disuelto de furosemida se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Furosemida(\%) = \left(\frac{A M}{A E}\right) \left(\frac{P E}{25}\right) \left(\frac{5}{100}\right) \left(\frac{2}{50}\right) (Pot E)(900) \left(\frac{50}{2}\right) \left(\frac{40}{P M}\right) (100)$$

En donde

A M: área de muestra

A E: área de estándar

P E: peso de estándar

Pot E: potencia de estándar

P M: peso de muestra

#### **4.6 Evaluación farmacocinética *in vivo***

Los estudios *in vivo* se realizaron tomando como referencia la investigación desarrollada por Hasan Ali et ál., (2017), la cual comprende la administración de furosemida y furosemida en nanopartículas lipídicas sólidas a dos grupos de animales conformados por ratas macho Sprague-Dawley. (43)

La dosis de furosemida cristalina (materia prima) y de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> fue de 40 mg kg<sup>-1</sup> y se preparó en suspensión previa a la administración

en los animales; para ello, el peso de fármaco correspondiente a cada uno de los animales se agregó a una solución de carboximetilcelulosa 0.30 %, polisorbato 80 (tween 80) 0.05 % en agua ultra pura, luego se homogeneizó adecuadamente previa a su administración. En todos los casos, la administración de la dosis se realizó inmediatamente preparada la suspensión descrita líneas arriba.

Para el estudio de biodisponibilidad se utilizaron 45 animales, divididos en 3 grupos, 2 grupos de 21 ratas (primer y segundo grupo) y uno de 3 ratas como control basal. Los 21 animales del primer grupo se dividieron e identificaron en 7 subgrupos de 3 animales cada uno, a los que se les administró  $40 \text{ mg kg}^{-1}$  de la suspensión de furosemida (materia prima) por vía oral mediante una cánula de administración enteral; luego de transcurridas 0.5 horas se procedió a tomar las muestras de sangre por punción cardiaca a cada uno de los 3 animales del primer subgrupo. Las muestras de sangre se colectaron en sendos tubos de centrifugado estériles de polipropileno; de inmediato, se centrifugaron a 5000 r.p.m. para separar el plasma, el cual también se almacenó en tubos de centrifugado estériles de polipropileno a  $-20^{\circ} \text{C}$ , previo a los análisis. Inmediatamente finalizada la toma de muestra se aplicó la eutanasia por sobredosis anestésica a cada rata mediante la administración de pentobarbital sódico ( $100 - 150 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Luego, una vez transcurrida 1 hora, se continuó con el mismo procedimiento descrito líneas arriba para el segundo subgrupo; y así sucesivamente para los siguientes subgrupos a las 2, 4, 6, 12 y 24 horas.

A los 21 animales del segundo grupo se les administró  $40 \text{ mg kg}^{-1}$  de suspensión de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> por vía oral y se realizó de acuerdo al

procedimiento utilizado con los subgrupos de ratas que recibió la suspensión de furosemida.

Durante el transcurso del estudio todos los grupos de animales tuvieron agua *ad libitum*.

La determinación de la concentración de furosemida en el plasma ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) del primer y segundo grupo de ratas se realizó mediante HPLC. Para ello, cada una de las muestras de plasma, se acondicionó a temperatura ambiente, se diluyó con acetonitrilo en la proporción 1:3, y se sometió a un agitador tipo vórtice durante 60 segundos, se centrifugó a 5000 r.p.m. y se filtró el sobrenadante en volúmenes de 1 ml en viales ámbar para cromatografía.

La cantidad de furosemida en el plasma se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Furosemida}(\mu\text{m/mL}) = \left(\frac{A M}{A E}\right) \left(\frac{P E}{25}\right) \left(\frac{3}{25}\right) (\text{Pot E}) (1000)(3)$$

En donde:

A M: área de muestra

A E: área de estándar

P E: peso de estándar

Pot E: potencia de estándar

Los parámetros farmacocinéticos de ABC,  $C_{\text{máx}}$  y  $T_{\text{máx}}$  se calcularon con los datos obtenidos de todos los animales.

El ABC se calculó mediante la regla de los trapecios, realizando la suma de los trapecios individuales desde el tiempo 0 hasta las 24 horas.

De acuerdo a la ecuación:

$$ABC = \left(\frac{C_0 + C_1}{2}\right)(t_1 - t_0) + \left(\frac{C_1 + C_2}{2}\right)(t_2 - t_1) + \dots + \left(\frac{C_{n-1} + C_n}{2}\right)(t_n - t_{n-1})$$

En donde:

C<sub>0</sub>: concentración plasmática en el tiempo 0

C<sub>1</sub>: concentración plasmática en el tiempo 1

T<sub>1</sub>: tiempo 0

T<sub>0</sub>: tiempo 1

La determinación de C<sub>máx</sub> y T<sub>máx</sub> se realizó de forma directa registrando la máxima concentración observada y el tiempo correspondiente.

#### **4.7 Validación del método *in vivo***

La validación del método de cuantificación de furosemida en plasma se realizó mediante una curva de calibración para determinar los límites de detección y cuantificación, así como exactitud y estabilidad de furosemida en las muestras de plasma.

##### **4.7.1 Curva de calibración**

Para la determinación del límite de cuantificación y el límite de detección se utilizó el método de la extrapolación de la recta a concentración cero. Para ello se preparó la curva de calibración con las siguientes concentraciones de furosemida 0.50, 1.25, 2.50, 3.75, 5.00, 6.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **4.7.2 Exactitud**

Las muestras de plasma se obtuvieron del grupo de 3 ratas utilizadas para el control basal; para ello la sangre colectadas de las ratas mediante punción cardíaca se colocó en sendos tubos de centrifugado estériles de polipropileno; luego, se centrifugaron a 5000 r.p.m. para separar el plasma, el cual también se almacenó tubos de centrifugado estériles de polipropileno a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para realizar el análisis se acondicionaron las muestras de plasma a temperatura ambiente y se les adicionó una cantidad conocida de furosemida, la determinación de la exactitud del método se determinó por triplicado en los siguientes niveles de concentración: 80 %, 100 % y 120 %. La recuperación del método se calculó comparando las áreas de respuesta de los estándares con las áreas de respuesta de concentraciones iguales de furosemida en plasma de rata.

#### **4.7.3 Estabilidad**

La estabilidad de furosemida en las muestras se determinó bajo dos condiciones; la primera de ellas, muestras inmediatamente preparadas y un segundo grupo, muestras almacenadas en refrigeración ( $5^{\circ}$  a  $8^{\circ}\text{C}$ ) durante 24 horas.

Las muestras se prepararon de acuerdo a lo señalado en la metodología de evaluación farmacocinética *in vivo* (sección 4.6) la cual consistió en coleccionar la sangre de las ratas en sendos tubos de centrifugado estériles de polipropileno; de inmediato, se centrifugaron a 5000 r.p.m. para separar el plasma, el cual también se almacenó en tubos de centrifugado estériles de polipropileno a -20° C. Para realizar los análisis, cada una de las muestras de plasma, se acondicionó a temperatura ambiente, se diluyó con acetonitrilo en la proporción 1:3, y se sometió a un agitador tipo vórtice durante 60 segundos, se centrifugó a 5000 r.p.m. y se filtró el sobrenadante en volúmenes de 1 ml en viales ámbar para cromatografía. Una vez preparadas las muestras se dividieron en dos grupos, a las muestras del primer grupo se les determinó inmediatamente la concentración de furosemida y a las muestras del segundo grupo se le sometió a refrigeración durante 24 horas entre 5° y 8° C, antes de analizarse.

La cantidad de furosemida en el plasma se calculó de acuerdo de acuerdo a lo señalado en la metodología de evaluación farmacocinética *in vivo* (sección 4.6).

#### **4.8 Análisis estadístico**

El análisis estadístico del presente proyecto de investigación comprende la utilización de la estadística descriptiva e inferencial. Para analizar los resultados de cuantificación de furosemida, porcentaje de disolución, se utilizaron las medidas de tendencia central, media, desviación estándar y error estándar.

La disolución *in vitro* de furosemida a partir de la inclusión en P-SiO<sub>2</sub>, furosemida cristalina (materia prima) y comprimidos de furosemida (40 mg, Mylan®) en cada tiempo establecido en la prueba de disolución, se comparó estadísticamente con la prueba de Kruskal Wallis. La evaluación de la concentración de furosemida en las muestras de plasma de los animales, obtenidas luego de la administración de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> y furosemida cristalina (materia prima) en los diferentes tiempos de muestreo establecidos para la prueba, se analizó con la prueba de U Mann-Whitney. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software STATA R14® y con un nivel de significancia del 0.05.

## 5. RESULTADOS

En el presente capítulo se muestran los resultados obtenidos en los ensayos realizados para caracterizar la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>; así como los resultados de los estudios de disolución y farmacocinética *in vivo*.

La caracterización de la inclusión de furosemida se realizó mediante HPLC, TG, CDB, DRX, MEB y BET.

Los estudios de disolución se realizaron de acuerdo a lo establecido en la monografía <711> disolución y al método de disolución señalado para los comprimidos de furosemida de la USP 42-NF 37; y para los estudios *in vivo* se tomó como referencia la investigación desarrollada por Hasan Ali et ál. (2017).(43)

### 5.1 Caracterización de la inclusión de furosemida en en Parteck® SLC 500 USP, Ph. Eur - Dióxido de silicio mesoporoso

#### 5.1.1 Valoración de contenido de furosemida

La Tabla 5 muestra los resultados de cuantificación de furosemida a muestras de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, furosemida cristalina (materia prima) y comprimidos de furosemida (40 mg, Mylan ®). El análisis de cuantificación de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, realizado por triplicado (n=3) a 4 preparaciones de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, demuestra la presencia de 40.69 % en promedio de furosemida en la estructura de poros de P-SiO<sub>2</sub>; y la cuantificación en la materia

prima y en los comprimidos demuestra un contenido de furosemida de 100.50 % y 101.17 % respectivamente.

En la Figura 6 se observan los cromatogramas del estándar de furosemida, furosemida en P-SiO<sub>2</sub> y P-SiO<sub>2</sub>.

Tabla 5. Contenido de furosemida mediante HPLC

Muestra	Furosemida en P-SiO <sub>2</sub> *		Furosemida †	Comprimidos ‡	
	mg/g **	%	%	mg/comprimido **	%
1	399.52 ± 0.21	39.95	100.50	40.47 ± 0.36	101.17
2	401.47 ± 0.46	40.15	---	---	---
3	415.56 ± 0.14	41.56	---	---	---
4	410.42 ± 0.38	41.08	---	---	---

\* Muestras de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>;

† Muestra de furosemida cristalina (materia prima);

‡ Comprimidos de furosemida (40 mg, Mylan®);

\*\* Promedio ± desviación estándar (n=3)

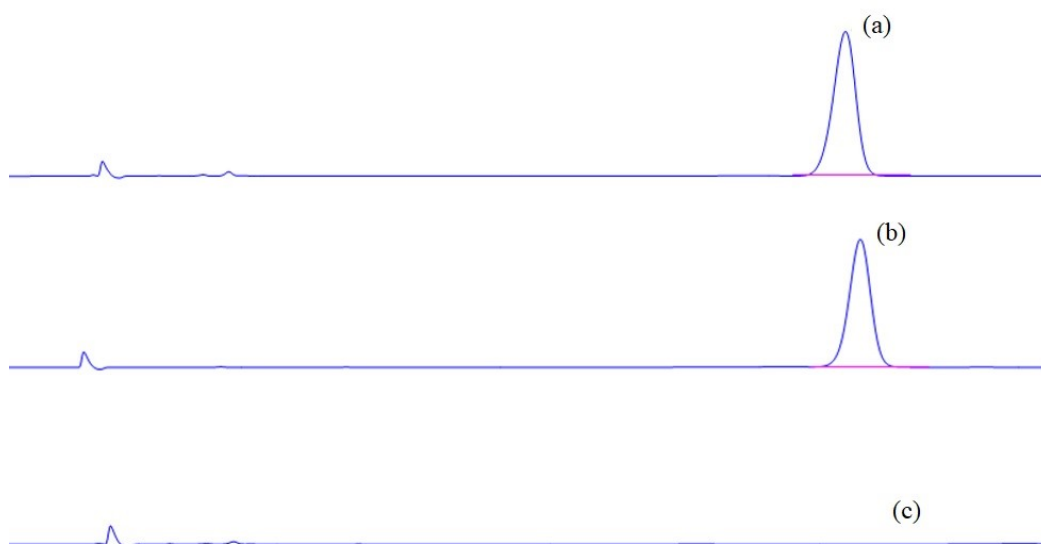


Figura 6. Cromatogramas de (a) estándar de furosemida, (b) furosemida en P-SiO<sub>2</sub> y (c) P-SiO<sub>2</sub>

### 5.1.2 Análisis termogravimétrico

Los ensayos de TG realizados a P-SiO<sub>2</sub> y a dos muestras de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> seleccionadas aleatoriamente se muestran en la Figura 7, la línea entrecortada de color azul corresponde al termograma de P-SiO<sub>2</sub>, presenta una pérdida de 6.44 % de humedad a los 100° C; las líneas roja y verde corresponden a las muestras de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, se evidencia una depresión de la curva a los 100° C por la pérdida de agua, 3.34 % y 1.08 % para las muestras 1 y 2 respectivamente. Luego, se observa una marcada caída a partir de los 200° C, temperatura próxima a la temperatura de fusión de furosemida la cual es de 206° C, esta caída corresponde al inicio de la degradación de furosemida, degradación que continúa hasta los 800° C obteniéndose una diferencia de masa de 40.40 % para la muestra 1 y de 41.10 % para la muestra 2, porcentajes que corresponden a la cantidad de furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub> (Tabla 6).

*Tabla 6. Contenido de furosemida mediante TG*

No	Furosemida en P-SiO <sub>2</sub> *
1	40.40%
2	41.10%

\* Muestras de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>

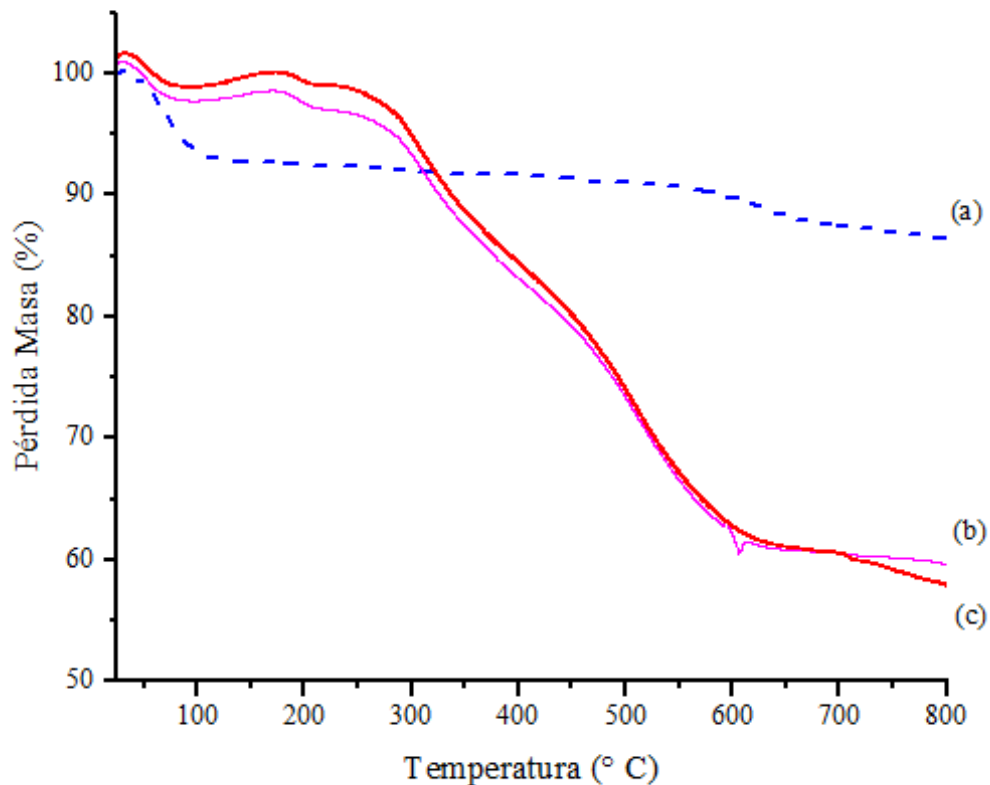


Figura 7. Termogramas de (a) P-SiO<sub>2</sub>, (b) y (c) inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>.

### 5.1.3 Análisis por calorimetría diferencial de barrido

Los resultados de la prueba CDB realizadas a furosemida y a dos muestras de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> seleccionadas aleatoriamente, se muestran en la Figura 8. Para la muestra de furosemida, línea de color azul, se observa un pico endotérmico alrededor de los 206° C, temperatura que corresponde al punto de fusión del fármaco. Las líneas de color verde para la muestra 1 y rojo para la muestra 2, corresponden a las muestras de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, en ambas no se observa el pico endotérmico en el punto de fusión del fármaco.

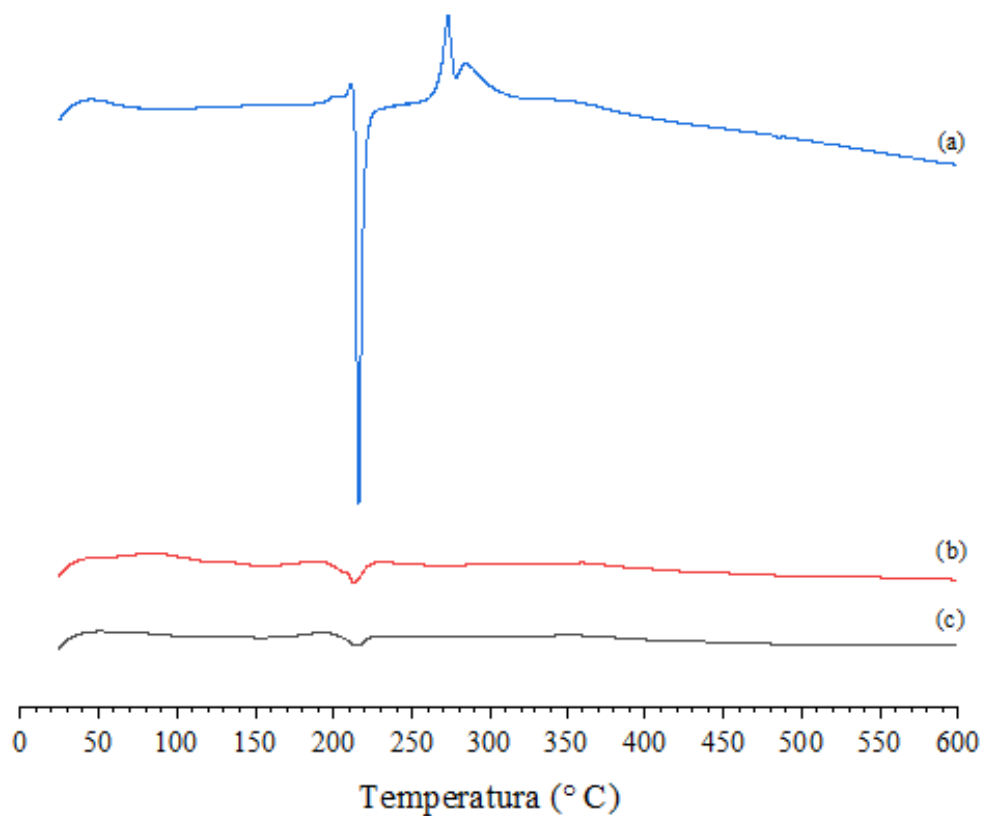


Figura 8. Termogramas de (a) furosemida, (b) y (c) inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>.

#### 5.1.4 Análisis por difracción de rayos X

La DRX realizada a la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> muestra presencia de picos en 9°, 11°, 16° y en la región entre 19° a 22° (ver Figura 9), los cuales no se observan en el difractograma de furosemida.

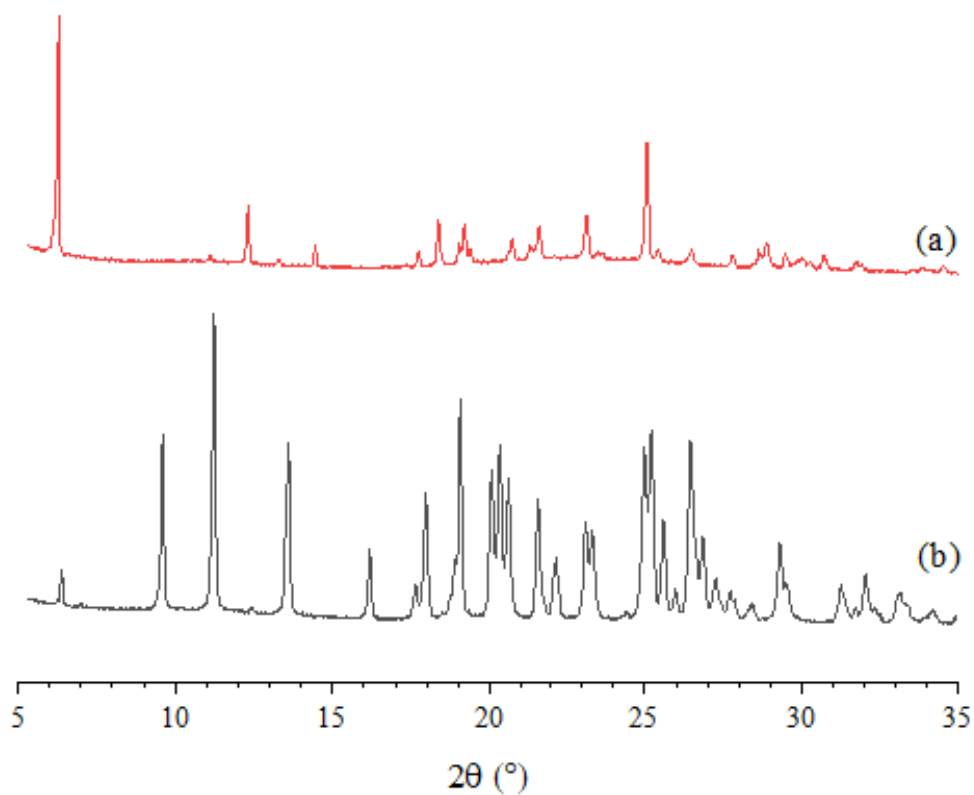


Figura 9. Difractogramas de (a) furosemida, (b) inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>.

### 5.1.5 Análisis por microscopía electrónica de barrido

Las imágenes mediante MEB se realizaron a P-SiO<sub>2</sub> y a la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>. En la Figura 10 (a) y (b), se observan los poros de P-SiO<sub>2</sub>, estos presentan aberturas con tamaños que van desde 0.87 μm hasta 5.47 μm. Y la Figura 10 (c) y (d), corresponden a la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, se observa al fármaco incrustado en los poros de P-SiO<sub>2</sub>.

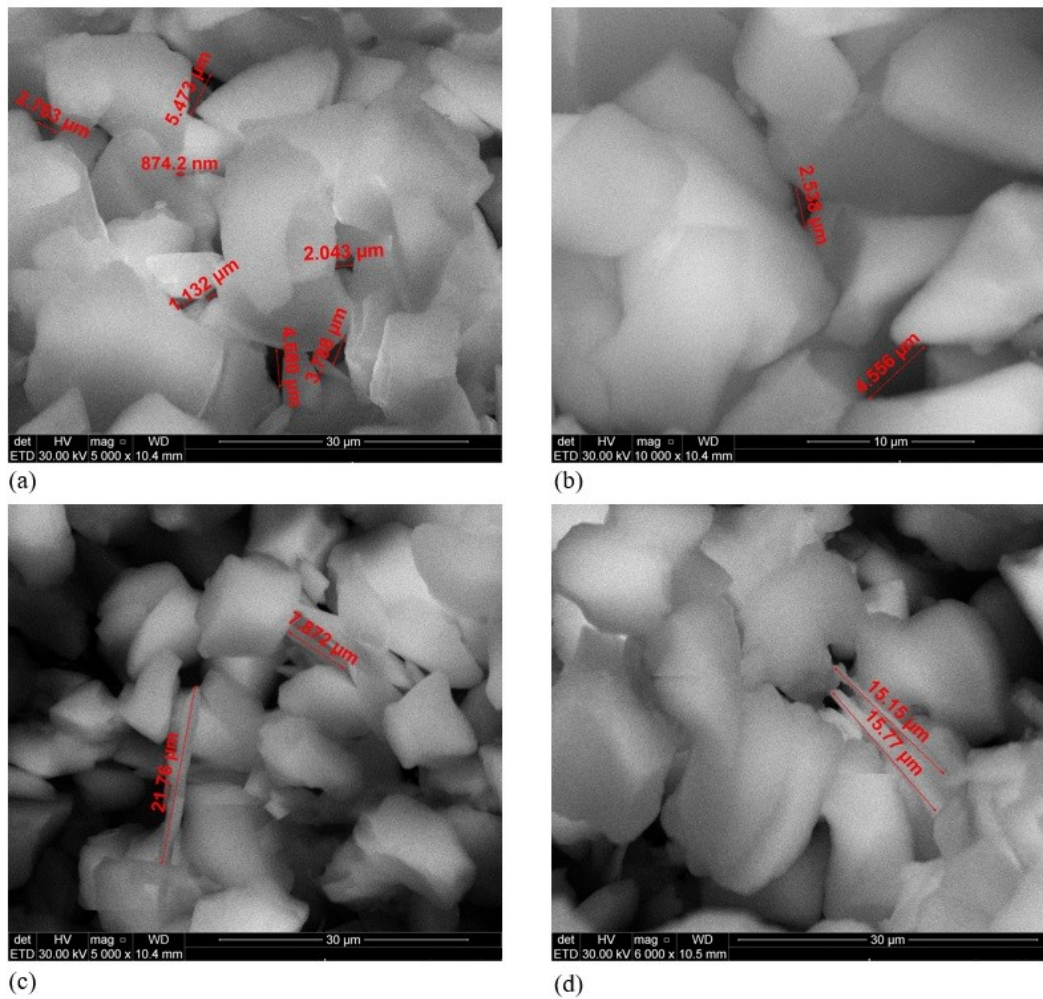


Figura 10. Imagen SEM de (a), (b) de P-SiO<sub>2</sub> y de (c), (d) de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>.

### 5.1.6 Análisis de área superficial específica

En la Figura 11, se muestra el análisis del área superficial específica ( $S_{BET}$  m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) realizado a P-SiO<sub>2</sub> y la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, mediante BET, este determinó que P-SiO<sub>2</sub> tiene una superficie específica de 500 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> y la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> presentó una superficie de 194 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> (Tabla 7).

Tabla 7. Superficie específica mediante BET

No	Furosemida en P-SiO <sub>2</sub> *	P-SiO <sub>2</sub> †
1	194 ¶	500 ¶

\* Muestra de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>;

† Muestra de Parateck® SLC 500 UPS, Ph. Eur – dióxido de silicio mesoporoso, sílice mesoporosa

¶ Resultados en m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>

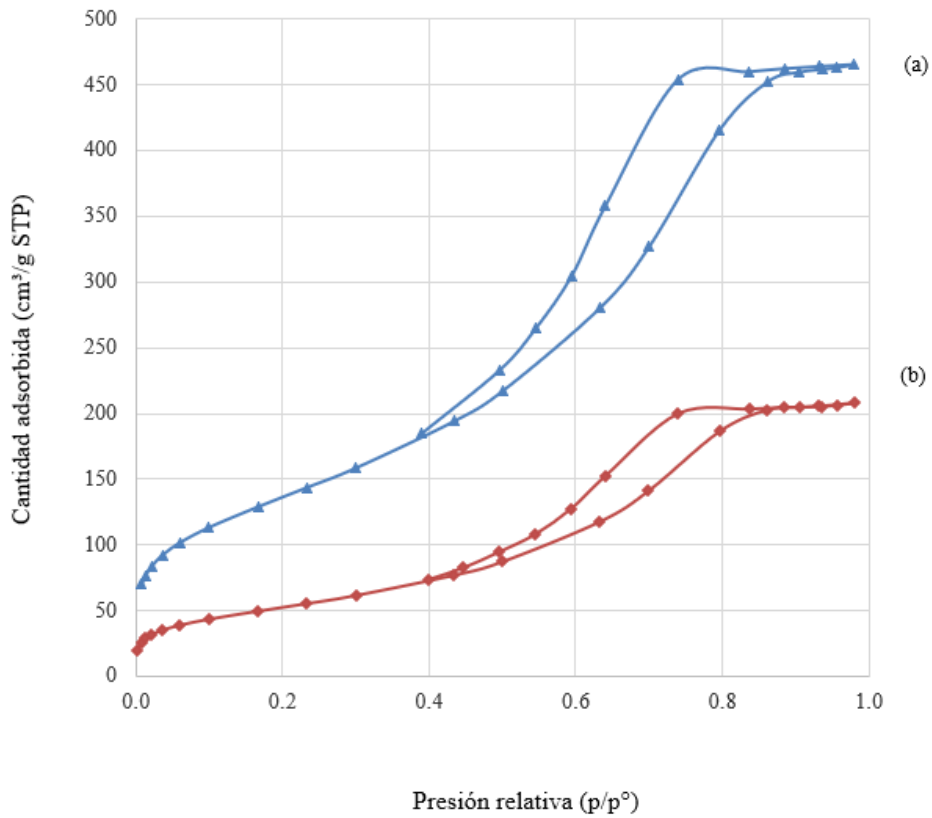


Figura 11. Isothermas de adsorción-desorción de (a) P-SiO<sub>2</sub> y (b) Inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>.

## 5.2 Evaluación de disolución

Mediante la prueba de disolución se determinó la cantidad liberada de furosemida desde la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, furosemida cristalina (materia prima) y de comprimidos de furosemida (40 mg, Mylan®). Los resultados se muestran en la Tabla 8, Figura 12 y Figura 13.

Tabla 8. Promedio del porcentaje de disolución de furosemida (promedio  $\pm$  desviación estándar, n=3)

Tiempo (min)	Furosemida *	Furosemida en P-SiO <sub>2</sub> †	Comprimidos ‡
0	0.00	0.00	0.00
5	32.28 $\pm$ 0.95	85.03 $\pm$ 1.34	52.23 $\pm$ 1.75
10	33.43 $\pm$ 1.46	94.90 $\pm$ 2.36	80.39 $\pm$ 1.16
15	35.26 $\pm$ 2.81	96.70 $\pm$ 2.08	81.19 $\pm$ 1.15
20	34.30 $\pm$ 0.67	100.16 $\pm$ 2.73	89.76 $\pm$ 2.38
40	36.43 $\pm$ 2.12	99.76 $\pm$ 0.81	91.28 $\pm$ 1.71
60	35.98 $\pm$ 1.59	101.65 $\pm$ 0.64	92.37 $\pm$ 1.25
90	34.89 $\pm$ 0.95	102.67 $\pm$ 1.06	94.08 $\pm$ 1.99

\* Furosemida cristalina (materia prima);

† Inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>;

‡ Comprimidos de furosemida (40 mg, Mylan®)

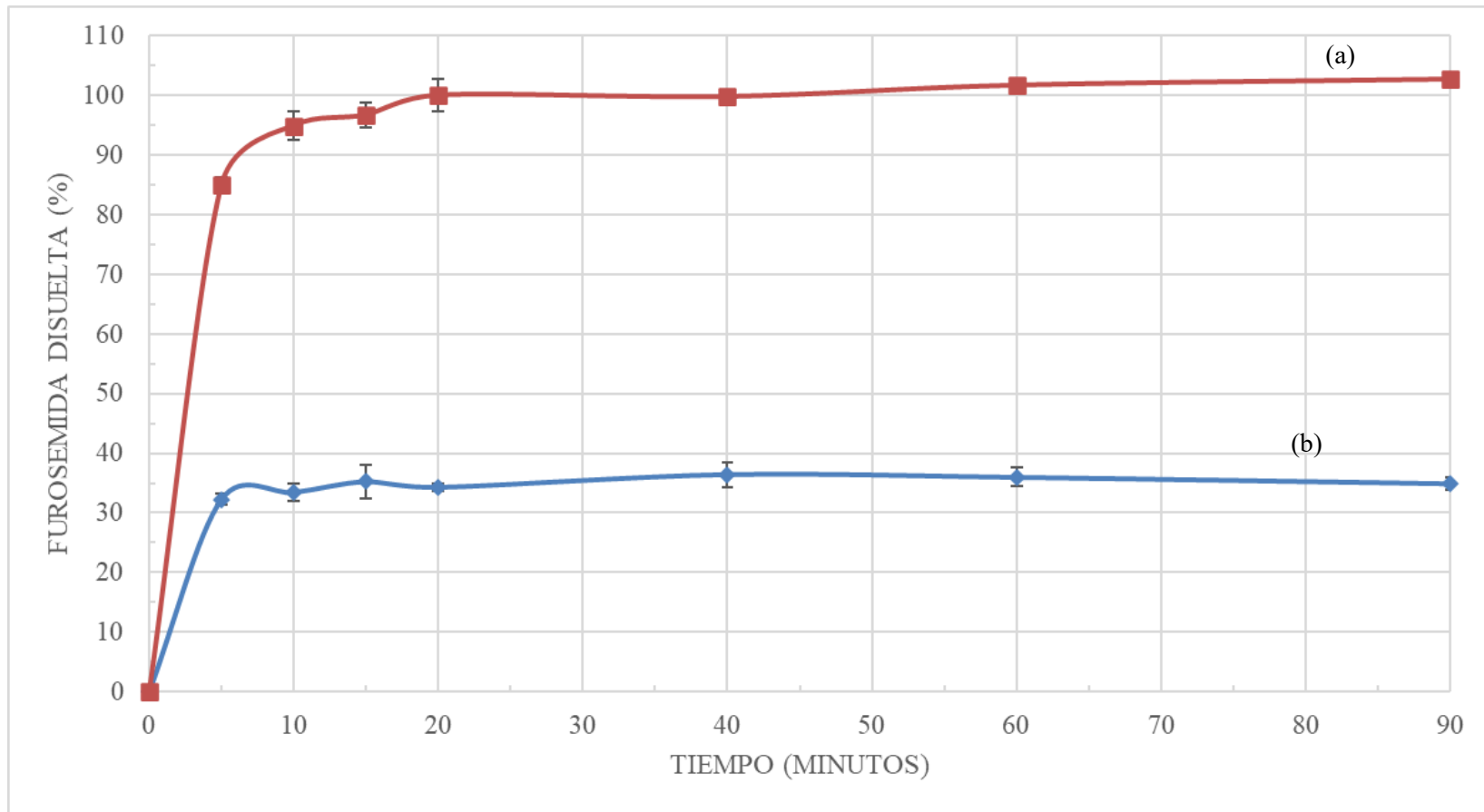


Figura 12. Porcentaje de disolución de furosemida a pH 5.8,  $37^{\circ} C \pm 0.5$  de (a) inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> y (b) furosemida cristalina (materia prima). Promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3)

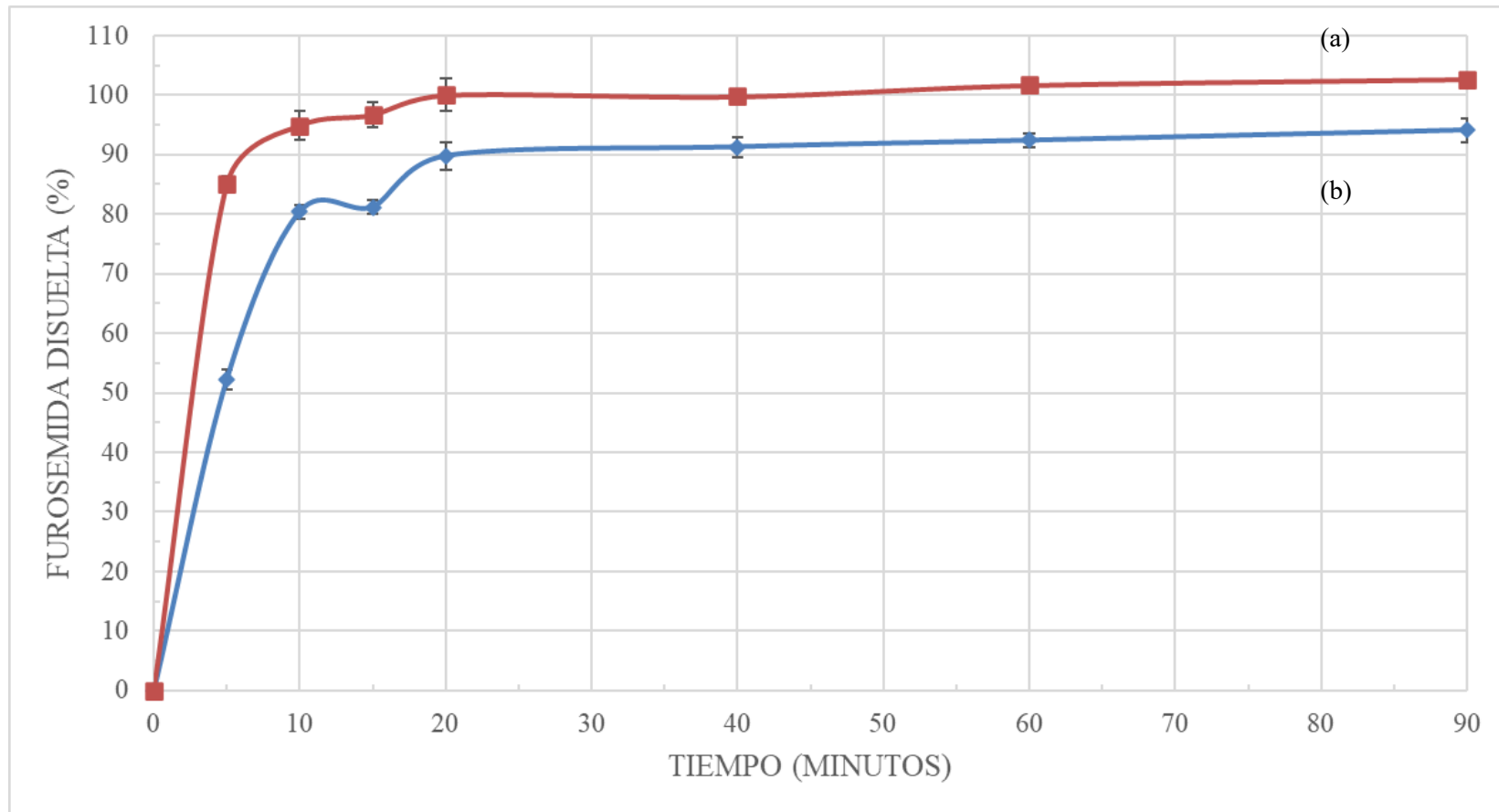


Figura 13. Porcentaje de disolución de furosemida a pH 5.8,  $37^{\circ} C \pm 0.5$  de (a) inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> y (b) comprimidos de furosemida (40 mg, Mylan®). Promedio  $\pm$  desviación estándar, (n=3).

### 5.2.1 Análisis estadístico

Los resultados de la prueba de Kruskal Wallis muestran que en todos los tiempos analizados las medianas de los porcentajes disueltos de furosemida a partir de las muestras de furosemida cristalina (materia prima) son menores que las medianas de los porcentajes disueltos de las muestras de furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub> y frente a las medianas de los porcentajes disueltos de los comprimidos de furosemida (40 mg, Mylan ®). Sin embargo, los resultados señalan que solo hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de los porcentajes disueltos de furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub> y de furosemida cristalina (materia prima) en todos los tiempos evaluados (Tabla 9). Las medianas de los porcentajes disueltos de furosemida son menores en las muestras de materia prima que en las muestras de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> (p<0.05).

Tabla 9. Medianas de los porcentajes disueltos y vapor p de la prueba de Kruskal Wallis

Tiempo (min)	Medianas de los porcentajes disueltos			Valor p
	Furosemida *	Furosemida en P-SiO <sub>2</sub> †	Comprimidos ‡	
0	0	0	0	-
5	31.56	85.41	52.28	0.0273
10	33.74	93.85	80.58	0.0275
15	34.84	96.44	81.79	0.0273
20	34.57	101.38	90.93	0.0273
40	36.34	99.30	91.38	0.0273
60	36.76	101.69	92.44	0.0273
90	34.86	102.63	93.11	0.0273

\* Furosemida cristalina (materia prima);

† Inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>;

‡ Comprimidos de furosemida (40 mg, Mylan®)

### 5.3 Evaluación farmacocinética *in vivo*

Mediante las pruebas *in vivo* se determinó la concentración plasmática de furosemida ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en ratas, para la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> y furosemida. Los resultados se muestran en la Tabla 10 y Figura 14.

Tabla 10. Concentración plasmática en  $\mu\text{g/mL}$  de furosemida (promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ )

Tiempo (horas)	Furosemida * ( $\mu\text{g/mL}$ )	Furosemida en P-SiO <sub>2</sub> † ( $\mu\text{g/mL}$ )
0.0	0.00	0.00
0.5	3.70 $\pm$ 0.03	1.18 $\pm$ 0.54
1.0	3.83 $\pm$ 0.37	14.41 $\pm$ 4.69
2.0	3.55 $\pm$ 0.02	3.70 $\pm$ 1.07
4.0	3.38 $\pm$ 0.71	2.94 $\pm$ 0.09
6.0	0.00	2.68 $\pm$ 0.52
12.0	0.00	0.00
24.0	0.00	0.00

\* Furosemida cristalina (materia prima);

† Inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>.

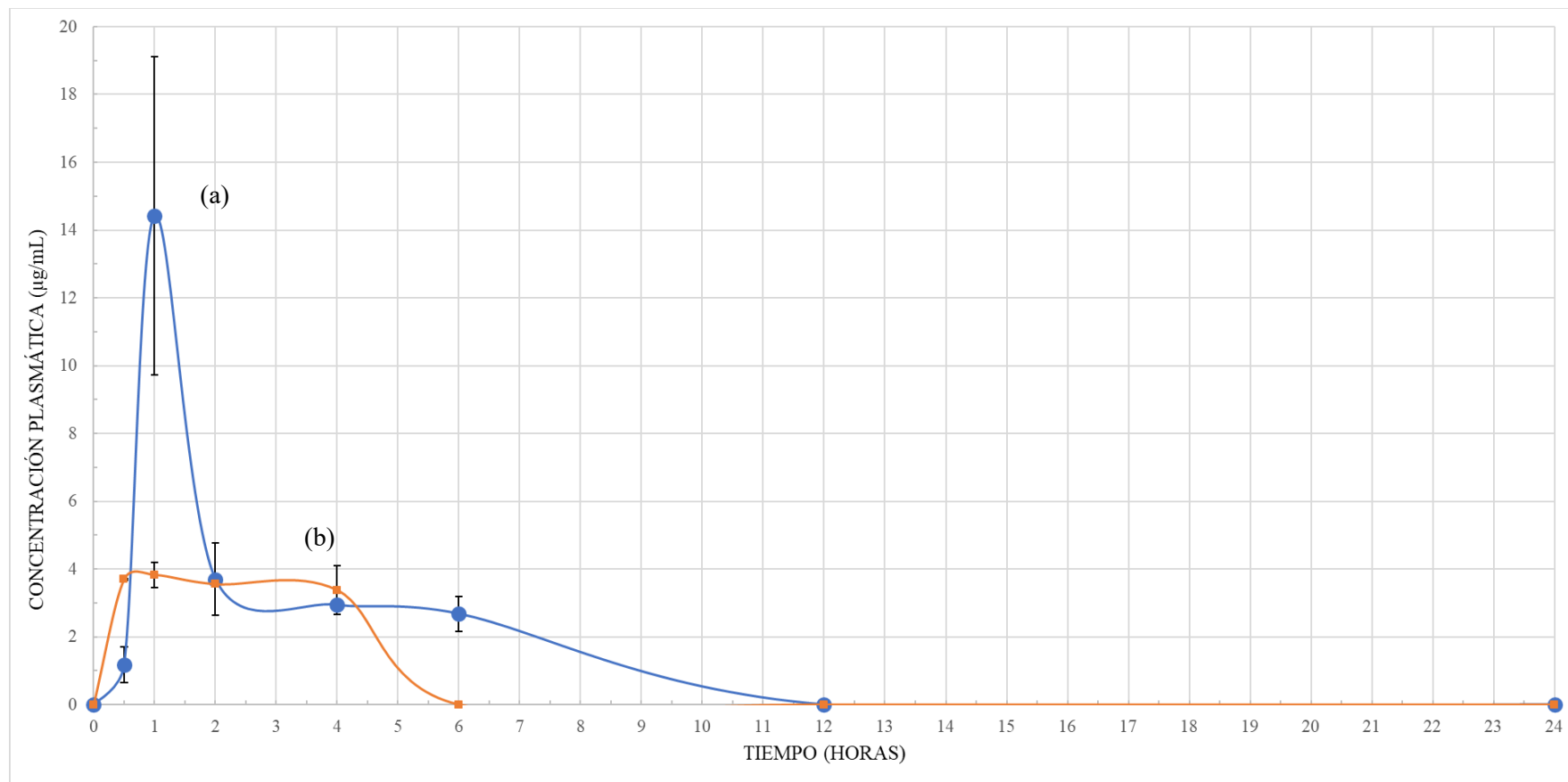


Figura 14. Concentración plasmática de (a) inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, (b) furosemida cristalina (materia prima), n=3, promedio ± desviación estándar.

Los parámetros farmacocinéticos calculados con los resultados *in vivo* fueron  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $t_{m\acute{a}x}$  los cuales se muestran en la Tabla 11 y ABC el cual se muestra en la Tabla 12.

*Tabla 11. Parámetros farmacocinéticos  $C_{m\acute{a}x}$  y  $T_{m\acute{a}x}$*

<b>Parámetros farmacocinéticos</b>	<b>Furosemida *</b>	<b>Furosemida en P-SiO<sub>2</sub> †</b>
<b><math>C_{m\acute{a}x}</math> (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>) ¶</b>	3.83 ± 0.37	14.41 ± 4.69
<b><math>T_{m\acute{a}x}</math> (horas)</b>	1.00	1.00

\* *Furosemida cristalina (materia prima);*

† *Furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub>;*

¶ *Promedio ± desviación estándar, n=3.*

Tabla 12. Área bajo la curva

Tiempo (horas)	Furosemida *			Furosemida en P-SiO <sub>2</sub> †		
	Furosemida (µg/mL) ¶	Áreas **	ABC ** (µg h mL <sup>-1</sup> )	Furosemida (ug/mL) ¶	Áreas **	ABC ** (µg h mL <sup>-1</sup> )
0.00	0.00	0.93	16.81	0.00	0.29	33.56
0.50	3.70	1.88		1.18	3.90	
1.00	3.83	3.69		14.41	9.06	
2.00	3.55	6.93		3.70	6.65	
4.00	3.38	3.38		2.94	5.62	
6.00	0.00	0.00		2.68	8.04	
12.00	0.00	0.00		0.00	0.00	
24.00	0.00	0.00		0.00	0.00	

\* Furosemida cristalina (materia prima);

† Furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub>;

¶ Promedio, n=3;

\*\* ABC calculado mediante la regla de trapecios

### 5.3.1 Análisis estadístico

En la evaluación de la concentración de furosemida en el plasma de ratas Sprague-Dawley, mediante la prueba de U Mann - Whitney, se determinó diferencias estadísticamente significativas a las 0.5 ( $p = 0.495$ ) y 1 hora ( $p = 0.495$ ) luego de la administración de las muestras de furosemida; estas diferencias evidencian una mayor concentración de furosemida en el plasma de los animales tratados con furosemida cristalina (materia prima) a las 0.5 horas; por otra parte, se determinó una mayor concentración plasmática en los animales a los que se administró la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> a la hora de aplicación. Además, los animales a los que se les administró la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, presentan concentraciones plasmáticas de furosemida hasta las 6 horas luego de la aplicación el fármaco mientras que en los animales tratados con la furosemida cristalina (materia prima) ya no presentan concentración alguna a partir de las 6 horas, esta diferencia es estadísticamente significativas ( $p = 0.037$ ). Ver Tabla 13.

Tabla 13. Medianas de las concentraciones plasmáticas y valor p para la prueba de U Mann - Whitney

Tiempo (horas)	Mediana de las concentraciones plasmáticas		Valor p
	Furosemida *	Furosemida en P-SiO <sub>2</sub> †	
0	0	0	-
0.5	3.720	1.187	0.049
1	3.830	14.413	0.049
2	3.560	3.719	0.513
4	3.500	2.950	0.513
6	0	2.677	0.037
12	0	0	-
24	0	0	-

\* Furosemida cristalina (materia prima);

† Inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>

## 5.4 Validación del método *in vivo*

La validación del método de cuantificación de furosemida en plasma se realizó mediante la curva de calibración, exactitud y estabilidad de furosemida en las muestras de plasma.

### 5.4.1 Curva de calibración

Mediante el método de la extrapolación de la recta a concentración cero (Figura 15) se determinó el límite de cuantificación ( $0.3628 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y el límite de detección ( $0.1366 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y un  $R^2$  de 0.9965.

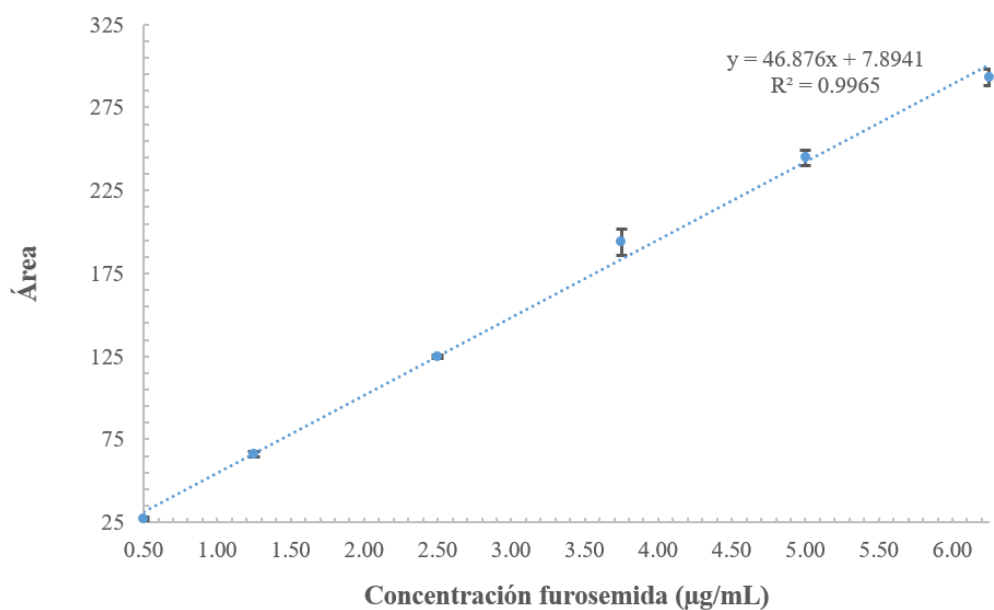


Figura 15. Curva de calibración de concentración plasmática de furosemida en plasma de rata (promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ )

### 5.4.2 Exactitud

La Tabla 14 muestra los porcentajes de recuperación de furosemida desde el plasma de ratas para concentraciones al 80 %, 100 % y 120 %, la recuperación se encuentra entre 99.10 % y 101.30 %.

*Tabla 14. Porcentajes promedio de recuperación de furosemida para concentraciones de 80 %, 100 % y 120 %.*

<b>Niveles</b>	<b>Porcentaje *</b>
<b>80.00 %</b>	99.50 ± 0.91
<b>100.00 %</b>	101.30 ± 0.12
<b>120.00 %</b>	99.10 ± 0.67

\* Promedio ± desviación estándar, n=3.

### **5.4.3 Estabilidad**

La determinación de la estabilidad de las muestras de furosemida en plasma, a temperatura ambiente y en refrigeración durante 24 horas (ver Tabla 15), demuestra la estabilidad de furosemida debido a que el nivel de cuantificación se encuentra entre el 97.77 y 99.02 %.

*Tabla 15. Porcentajes promedio de concentración de furosemida a temperatura ambiente y refrigeración (promedio ± desviación estándar, n=3)*

<b>No</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Concentración final *</b>
<b>1</b>	97.83 ± 0.48	99.02 ± 0.68
<b>2</b>	97.77 ± 0.69	98.78 ± 0.96

\* Muestra en refrigeración (2 a 8° C) durante 24 horas

## 6. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que mediante la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> se ha alcanzado un notable incremento en la velocidad de disolución *in vitro* y en el ABC en el estudio *in vivo*. Estos resultados pueden explicarse por la modificación del estado cristalino de furosemida al estar confinada en los poros de P-SiO<sub>2</sub>, estos poros tienen un tamaño entre 2 a 50 nm, por tanto, mantienen al principio activo bajo un estado amorfo. Asimismo, otro factor que contribuyó a incrementar la velocidad de disolución del fármaco es el aumento de la humectabilidad de furosemida por la gran hidrofiliidad y la elevada área superficial de P-SiO<sub>2</sub>. (44)

Para la incorporación de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> mediante el método de IHI utilizado en la presente investigación se preparó una solución al 2 % de furosemida en etanol (p/v), concentración que representa el doble de la concentración utilizada en trabajos previos realizados por Feliczak-Guzik et al. (2015), y Ambrogi et al. (2012), los cuales tienen concentraciones de 1 % y 1.15 % respectivamente. Sin embargo, en la investigación realizada por Ambrogi et al. (2012), utilizando dimetilsufoxico se alcanzan concentraciones de hasta 6 % de furosemida; solvente que presenta inconvenientes por la toxicidad, dificultad para su evaporación y presenta interferencia con las pruebas de caracterización por TG.(10,27)

Es importante señalar que en diversas investigaciones anteriores el tiempo de agitación utilizado para incorporar furosemida en P-SiO<sub>2</sub> estuvo entre 16 y 24

horas, sin considerar el tiempo necesario para la evaporación del solvente; por ejemplo, podemos citar las investigaciones de Feliczak-Guzik et al. (2016), el cual utilizó un tiempo de 24 horas o los estudios llevados a cabo por J. Salonen et al. (2005), y Kaokonen et al. (2007), quienes tuvieron períodos de agitación de hasta 16 horas; sin embargo, en la presente investigación al haber utilizado un sistema continuo de IHI se realizó la aplicación controlada de la solución etanólica de furosemida mediante una bomba de infusión con un caudal de 30 a 35 mL h<sup>-1</sup> y la evaporación simultánea del etanol en baño maría en un tiempo entre 6 y 7 horas.(27,36)

En la presente investigación, el sistema continuo de IHI utilizado para la aplicación de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, administra de forma controlada la solución etanólica de furosemida mediante una bomba de infusión sobre el lecho de partículas de P-SiO<sub>2</sub> el cual está bajo agitación constante para garantizar una distribución homogénea de furosemida y a una temperatura entre 78 y 80° C para evaporar inmediatamente el etanol; este proceso es similar al método de granulación húmeda, ampliamente utilizado en la industria farmacéutica para transformar partículas en gránulos mediante la adición controlada de una solución aglutinante. Por esta razón presenta mayores ventajas para proyectar su reproducción a escala piloto e industrial que el método de inmersión en solvente utilizado por Feliczak-Guzik et al. (2016), Ambrogi et al. (2012), J. Salonen et al. (2005) y Kaokonen et al. (2007) (10,27,35,36,45)

Los resultados de los estudios de cuantificación de furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub> muestran que no hay diferencia entre los resultados obtenidos entre HPCL (40.69 % ± 0.76 % (p/p)) y TG (40.75 % ± 0.49 %). Se realizó la determinación de furosemida mediante ambos métodos para comparar los resultados debido a que la exactitud de cuantificación por HPLC depende de la extracción de la totalidad de furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub>, el método de comparación utilizado fue TG, en el cual la determinación de furosemida se realiza mediante la cuantificación de masa perdida por descomposición térmica del fármaco, esta descomposición se inicia a partir de los 206° C (temperatura de fusión de furosemida) y se cuantificó hasta los 800° C, temperatura en que todo material orgánico ha sido eliminado. (3,22)

La TG para P-SiO<sub>2</sub> muestra una depresión de la curva a los 100° C por la pérdida 6.44 % de humedad; sin embargo, en las muestras de la adsorción de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> analizadas mediante TG se determinó 2.21±1.60 % de humedad debido a que el material se secó a 100° C durante 4 horas, antes de realizar la aplicación de la solución de furosemida. El resultado de 6.44 % de humedad puede explicarse debido a la adsorción de humedad por la gran área superficial de P-SiO<sub>2</sub>, que de acuerdo a lo indicado por el fabricante Merck Millipore, Alemania es de hasta 1000 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>. (46)

Los resultados de cuantificación de furosemida mediante TG muestran una disminución de masa, entre los 200° C y 800° C, de 40.75 % ± 0.49 %, cantidad que corresponde a la masa pérdida por pirólisis de furosemida. El perfil de degradación de furosemida de estos resultados coincide con los estudios llevados

a cabo por diversos investigadores en diferentes tipos de MPSiO<sub>2</sub>; sin embargo, difiere en el contenido de furosemida; por ejemplo, en la investigación realizada por Ambroggi et al. (2012), prepararon muestras al 20 %, 30 % y 35 % de furosemida incluida en MPSiO<sub>2</sub> SBA-15, y evaluaron mediante TG la cantidad de furosemida, desde los 220° C hasta 600° C, la cantidad de furosemida determinada fue de 30.0 ± 0.2 %. En otro estudio de Ambroggi et al. (2012), se evaluó mediante TG la cantidad de furosemida incluida en mesoporos, desde los 200° C hasta 600° C, en tres tipos de MPSiO<sub>2</sub> sintetizados mediante métodos diferentes, la cantidad determinada de furosemida en cada uno de ellos fue de 9.4 %, 9.0 % y 3.0 %. En otro estudio, Kaukonen et al. (2007), determinaron mediante TG un 43.0 % de furosemida incluida a MPSiO<sub>2</sub> hasta los 650° C. Finalmente, en una publicación de Salonen et al. (2007), determinaron 43 % de furosemida en partículas de MPSiO<sub>2</sub>. (10,35,47)

Los resultados variables en el contenido final de furosemida de los trabajos de investigación indicados, pueden explicarse por varias razones; en primer lugar, por el hecho de que utilizan soluciones de furosemida en etanol de concentraciones no mayores a 1.15 % mientras que en esta investigación se utilizó una concentración de furosemida de 2 %; luego, por el método de aplicación de furosemida, el cual en todos los casos consistió en sumergir a MPSiO<sub>2</sub> en la solución etanólica de furosemida, para luego proceder a filtrar y secar, en contraste con lo realizado en el presente proyecto en el cual se aplicó la solución de furosemida de forma controlada y continua sobre P-SiO<sub>2</sub> obteniendo una concentración final de 40.75 % ± 0.49 %. Esta diferencia en el método de

aplicación resulta crucial para evitar que durante el secado se formen cristales de furosemida en la superficie, obstruyan la abertura de los poros e impidan la disolución de la furosemida confinada en su interior; la aplicación de la solución de furosemida mediante un flujo controlado sobre P-SiO<sub>2</sub> favoreció el ingreso de la solución al interior por capilaridad y el secado simultáneo de etanol, evitando la obstrucción de los poros por cristalización de furosemida en la superficie de las partículas P-SiO<sub>2</sub>. (6)

Los resultados de este estudio muestran que la cantidad de furosemida incorporada a P-SiO<sub>2</sub> es de alrededor de 40 %, cantidad que está dentro de lo esperado debido a que según la información proporcionada por el fabricante Merck Millipore, Alemania, este es capaz de adsorber hasta el 50 % de su peso.(46)

Los resultados de CDB de este estudio muestran los característicos picos de fusión (endotérmico) y descomposición (exotérmico) en el rango de 200-220° C para furosemida y la ausencia del pico de fusión para las muestras de furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub>; estos resultados pueden explicarse por la transformación de furosemida del estado cristalino al estado amorfo debido a su incorporación en la trama de poros de P-SiO<sub>2</sub>. (6)

Los hallazgos de este estudio son consistentes con los de resultados del estudio llevado a cabo por Ambrogi et al. (2012), en las que mediante el CDB se confirmó la ausencia de cristales de furosemida en la inclusión de furosemida en MPSiO<sub>2</sub>

SBA 15; y en la inclusión de furosemida en MPSiO<sub>2</sub> ya no se observa el pico de fusión de furosemida.(10)

Los resultados observados en este estudio son similares a los encontrados en otro estudio previo que desarrolló Ambroggi et al. (2012), en el que se evidenció el cambio en la forma cristalina de furosemida por su interacción con la matriz inorgánica de MPSiO<sub>2</sub> MCM-41, de acuerdo a esto los termogramas del CDB muestran el típico pico endotérmico por la fusión de furosemida alrededor de los 220° C y la ausencia de los picos de fusión en la inclusión de furosemida en MPSiO<sub>2</sub> MCM-41.(35)

Estos resultados coinciden con los indicados en estudios anteriores como los de Kaukonen et al. (2007) y Salonen et al. (2005), en los que los resultados del CDB demuestran la ausencia de furosemida en estado cristalino en la superficie de las partículas de MPSiO<sub>2</sub>. (47,48)

Los difractogramas para furosemida y para la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> muestran que los picos característicos para furosemida a 6°, 14° y 25°, no aparecen en la muestra de la adsorción de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, debido a que las características cristalinas de furosemida se han suprimido al estar confinada en la estructura mesoporosa. Estos resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos en un estudio previo desarrollado por Ambroggi et al. (2012), en que realizaron análisis de DRX a MPSiO<sub>2</sub> y a inclusiones de furosemida en MPSiO<sub>2</sub> de 20 %, 30 % y 35 %, los hallazgos muestran la ausencia de los picos

característicos de furosemida en las concentraciones de 20 % y 30 %; sin embargo, la concentración de 35 % presenta respuestas típicas para furosemida, lo cual indica la presencia de cristales de furosemida en la superficie de las partículas de MPSiO<sub>2</sub>. Este resultado podría explicarse por el método utilizado por Ambrogio et al. (2012), para la incorporación de furosemida en sílice mesoporoso, este consistió en suspender las partículas de MPSiO<sub>2</sub> en una solución etanólica de furosemida, luego, aplicar vacío para la eliminación del aire de la trama de poros, agitar durante 30 minutos y secar en un rotavapor; en contraste, en nuestro estudio la incorporación de furosemida a la red de poros de P-SiO<sub>2</sub> se realizó mediante la adición de una solución etanólica con un flujo de 30 a 35 mL h<sup>-1</sup> mientras el material mesoporoso se mantiene en baño maría a una temperatura de 78 a 80° C, rango de temperatura que comprende a la temperatura de ebullición del etanol, que es de 78.4° C. (10)

La MEB muestra al P-SiO<sub>2</sub>, con tamaños de partícula entre 5 a 25 μm y con aberturas de poros entre 2 a 7 nm, datos que concuerdan con la información proporcionada por el fabricante, Meck Millipore. Además, de acuerdo a lo establecido por Internacional Union of Pure and Applied Chemistry of Porous Media sobre la clasificación de los materiales porosos, estos resultados corroboran que P-SiO<sub>2</sub> está dentro del rango de materiales mesoporosos con un diámetro promedio de poros entre 2 y 50 nm. (25,46)

En las muestras de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido revelan dos detalles importantes; en

primer lugar, la presencia de cristales aciculares insertados en los poros, además, la ausencia de furosemida cristalizada en la superficie de las partículas; estos resultados demuestran la efectividad del método de confinamiento utilizado para incorporar furosemida a la red de poros de P-SiO<sub>2</sub>. Los resultados de MEB mostrados por Feliczak-Guzik et al. (2016), revela partículas de MPSiO<sub>2</sub> de tipo SBA-16 de forma esférica con un tamaño entre 0.5 – 8 µm. Sin embargo, es un estudio orientado solo a la observación y descripción de la morfología de las partículas. (27)

Las isothermas BET de P-SiO<sub>2</sub> y de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> muestran de forma clara y de acuerdo a lo esperado, la reducción de la superficie específica de 500 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> a 194 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> respectivamente. Los resultados del área superficial específica realizada en P-SiO<sub>2</sub> y de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> que las isothermas de adsorción y desorción de Nitrógeno obtenidas son de tipo IV; es decir, presentan la histéresis propia de un material mesoporoso; además, la superficie específica determinada es de 500 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, especificación que está de acuerdo a lo señalado por Merk Millipore, fabricante de P-SiO<sub>2</sub>, de hasta 1000 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> de área superficial específica; ambos resultados coinciden con los observados en la investigación llevada a cabo por Feliczak-Guzik et al. (2016), en donde se analiza la superficie específica de MPSiO<sub>2</sub> (tipo SBA-16) y dos modificaciones, uno modificado con grupos amino y el otro con Quitosano; y se determinó que las isothermas BET obtenidas son de tipo IV; es decir, presentan la histéresis propia de un material mesoporoso; además, que la superficie específica determinada está entre 600 y 940 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>. (27,46)

La reducción del área superficial específica de  $500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  a  $194 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , correspondiente a P-SiO<sub>2</sub> y de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> respectivamente, puede explicarse por la presencia de furosemida en los poros, la inclusión del fármaco ha reducido el área superficial a solo el 38.8 % del área superficial inicial. Los resultados de esta prueba coinciden parcialmente con los obtenidos en la investigación de Ambrogi et al. (2012), en donde la reducción del área superficial específica fue de  $791 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  a  $213 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  para MPSiO<sub>2</sub> SBA-15 y la correspondiente muestra de inclusión de furosemida respectivamente; es decir la presencia del fármaco ha reducido el área superficial al 26.9 % del área superficial inicial. Esta diferencia en los resultados podría explicarse porque en la investigación de Ambrogi et al. (2012), se realiza la incorporación de furosemida a MPSiO<sub>2</sub> mediante el método de inmersión en solventes, procedimiento por el cual se sumerge el material mesoporoso a una solución etanólica de furosemida y luego se evapora el solvente mediante una estufa al vacío; a diferencia de la metodología utilizada en la presente investigación en la cual se realiza la adición de la solución etanólica de furosemida de forma muy controlada con la bomba de infusión y la evaporación simultánea del solvente durante la adición de la solución. Esta diferencia en la metodología facilita la incorporación de una mayor cantidad de fármaco a los poros. (10,49)

Los resultados del estudio *in vitro* demostraron, bajo las condiciones establecidas en la sección de métodos, que la inclusión de furosemida en la trama de poros de P-SiO<sub>2</sub> incrementó de forma notable su velocidad de disolución en la muestra de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> frente a furosemida y a comprimidos de furosemida (40mg,

Mylan®); así a los 5 minutos se alcanzó una liberación de  $85.03 \pm 1.34$ , frente a  $32.28 \pm 0.95$  y  $52.23 \pm 1.75$  respectivamente; tendencia que se acentúa hasta los 90 minutos. Estos resultados muestran una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los resultados de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> frente a furosemida y a comprimidos de furosemida (40 mg, Mylan®).

Los resultados de disolución de la presente investigación demuestran que la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> presenta un notable incremento en la cantidad disuelta de furosemida, un 85 % a los 5 minutos y 100.16 % a los 20 minutos, mientras que furosemida alcanza un 34.80 % a los 20 minutos. Estos resultados son superiores a los encontrados en la investigación de Feliczak-Guzik et al. (2016), estudio en el que, en primer lugar, realizaron la síntesis del material mesoporoso a tres temperaturas distintas, 80°, 90° y 100° C. En el estudio señalado se observa que la cantidad disuelta de furosemida en el material mesoporoso sintetizado a 80° C se alcanza el 5 %, 55 % en el sintetizado a 100° C y 60 % en el sintetizado a 90° C y la cantidad disuelta de furosemida en estado cristalino fue de 30 %. Estas disimilitudes pueden explicarse en parte por la diferencia entre en el área superficial de las muestras, el sintetizado a 90° C presentó un área superficial de  $940 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , mientras que el sintetizado a 80° C mostró un área superficial de  $600 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  y el sintetizado a 100° C tuvo un área superficial de  $930 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . Sin embargo, en el presente estudio el área superficial de P-SiO<sub>2</sub> fue de  $500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  y presentó una liberación de furosemida de 100.16 % a los 20 minutos, esta discrepancia con los resultados señalados por Feliczak-Guzik et al. (2016), puede explicarse en parte porque se ha reducido la

variabilidad propia de la síntesis a escala de laboratorio al haber utilizado para la preparación de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, un material mesoporoso obtenido a escala industrial y diseñado para solubilización de fármacos en la industria farmacéutica.(27)

En la investigación desarrollada por Ambrogi et al. (2012), luego de transcurridos 5 minutos la cantidad de furosemida liberada de la inclusión fue de 65 % frente al 11 % de furosemida; y a los 60 minutos la cantidad de furosemida liberada de la inclusión fue de 80 % frente al 60 % de furosemida. En nuestra investigación luego de 5 minutos la cantidad de furosemida liberada de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> fue de 85 % frente al 32 % de furosemida; y a los 60 minutos la cantidad de furosemida liberada de la inclusión fue de 101.65 % frente al 35.98 % de furosemida. Los resultados obtenidos proporcionan evidente soporte del incremento de la velocidad de disolución de furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub> frente a furosemida este cambio en la velocidad de disolución se puede explicar por el incremento del área superficial del fármaco y ocurre mediante las etapas señaladas por Ambrogi et al. (2012), las cuales son, i) el ingreso del medio de disolución al sistema de poros debido a la presión osmótica originada por los gradientes de concentración, ii) la disolución del fármaco, iii) la difusión del fármaco a través de los poros debido al gradiente de concentración, iv) el transporte difusivo y convectivo del fármaco; siendo este cambio de trascendental importancia en los fármacos de clase biofarmacéutica IV (insolubles e impermeables) debido a que tienen que disolverse para estar disponibles para la absorción.(10)

En el estudio realizado por Ambroggi et al. (2012), se incorporó alrededor de 9 % de furosemida en MPSiO<sub>2</sub> (MCM-41) y se alcanzó una liberación de aproximadamente 80 % a los 30 minutos frente a furosemida cristalina que se disuelve 50 % en el mismo tiempo; estos resultados difieren de los encontrados en el presente estudio en donde se alcanzó una disolución de furosemida de 100.16 % a los 20 minutos y esto puede explicarse por el método utilizado para realizar la incorporación de furosemida a P-SiO<sub>2</sub>, en el caso del estudio de Ambroggi et al. (2012), realizaron la incorporación del fármaco por el método de inmersión en solventes, mediante este procedimiento se sumergen las partículas del material mesoporoso en una solución del fármaco y luego se elimina el solvente por un método apropiado; durante la evaporación del solvente, parte del fármaco cristaliza en la superficie de las partículas produciendo la obstrucción de la abertura de los poros, por tanto, al momento de la disolución el fármaco cristalizado en la superficie impide que el medio de disolución alcance la red de poros y disuelva a la droga; además, los cristales formados en la superficie van a disolverse de forma muy lenta debido a que no fueron incluidos en el sistema de poros y en consecuencia mantienen su estructura cristalina. En el presente estudio la incorporación de furosemida se realizó, de acuerdo a lo explicado en la sección de métodos, mediante una aplicación controlada de la solución de furosemida sobre las partículas de P-SiO<sub>2</sub> para facilitar la incorporación de la solución del fármaco al interior de los poros y la inmediata evaporación del solvente mediante el baño maría para impedir la obstrucción de los poros y la cristalización del fármaco en la superficie. (35) (4)

Este estudio arroja resultados que superan las conclusiones obtenidas por sendas investigaciones desarrolladas por Kaukonen et al. (2007), y Salonen et al. (2005), en donde la cantidad de furosemida liberada fue de 80 % a los 60 minutos, a partir de furosemida incluida en MPSiO<sub>2</sub>; y en la presente investigación la cantidad libera de furosemida desde su inclusión en P-SiO<sub>2</sub> fue de 85 % y 100.16 % a los 5 y 60 minutos respectivamente. Estas diferencias pueden explicarse por causas como el método de inclusión del fármaco en los poros del material mesoporoso, la síntesis de MPSiO<sub>2</sub> a nivel de laboratorio; ambas explicadas líneas arriba. (36,47)

Diversas investigaciones dan cuenta de las estrategias utilizadas para optimizar la disolución en agua de furosemida, entre ellas podemos citar la realizada por Codruta et ál. (2008), en la cual desarrollaron un estudio para determinar la concentración plasmática de furosemida en ratas, a partir de complejos de furosemida con ciclodextrina. Los resultados muestran que el ABC y C<sub>máx</sub> de furosemida y del complejo furosemida-ciclodextrina fueron de 35.998, 16.15 y de 52.29 y 22.34 respectivamente. Las evidencias de la presente investigación muestran una tendencia semejante en cuanto a incrementar estos parámetros; sin embargo, aunque el estudio de Codruta et ál. (2008) no describe el método utilizado para la formación del complejo, la literatura especializada indica que uno de los métodos más utilizados es el de coprecipitación, método que consiste en disolver por separado el fármaco y ciclodextrina en un solvente orgánico; luego, se mezclan ambas soluciones y se procede a evaporar el solvente hasta obtener el complejo formado en polvo; de acuerdo a lo descrito, este método requiere de tiempos de proceso prolongados debido a la necesidad de evaporar todo el

solvente orgánico utilizado. El método de IHI utilizado en nuestra investigación si bien disuelve al fármaco en etanol, tiene un proceso más corto debido a que la adición de la solución de furosemida se realiza sobre P-SiO<sub>2</sub> bajo agitación constante y sumergido en un baño maría a la temperatura de evaporación de etanol (78 a 80° C) (50)

El estudio farmacocinético desarrollado por Katayoun et ál. (2016), mostró que mediante la encapsulación de furosemida en microesferas de ácido láctico co-glicólico obtenidas por el método de emulsificación- evaporación de solvente se logró incrementar el ABC y C<sub>máx</sub> en 3.5 y 1.95 veces, frente a los resultados obtenidos con furosemida; y los resultados en nuestra investigación muestran una tendencia similar al estudio citado, la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, permitió acrecentar la C<sub>máx</sub> en 3.8 veces y el ABC (24 horas) en 1.9 veces más, frente a furosemida. Sin embargo, en el método empleado por Katayoun et ál. (2016), podemos señalar las siguientes limitantes; en primer lugar, la toxicidad de diclorometano utilizado en el proceso y la complejidad que representaría su eliminación; además, la inestabilidad propia que presentan los sistemas dispersos heterogéneos de tipo emulsión. (8,20)

Para el estudio farmacocinético *in vivo* desarrollado por Hasan Alí et ál. (2017), se realizó la incorporación de furosemida en nanopartículas sólido lipídicas a base de Cremophor RH 40 mediante el método de temperatura de inversión de fases, mediante el cual alcanzó un ABC de 17.1 µg h mL<sup>-1</sup> y C<sub>máx</sub> de 3.6 µg mL<sup>-1</sup>, con una dosis de 15 mg kg<sup>-1</sup>, frente a un ABC de 10.1 µg h mL<sup>-1</sup> y C<sub>máx</sub> de 2.3 µg mL<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>. Los resultados alcanzados en la presente investigación muestran una tendencia mucho mayor a los resultados del estudio mencionado, la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, permitió alcanzar un ABC de 33.54  $\mu\text{g h mL}^{-1}$  y C<sub>máx</sub> de 14.41  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , comparado con un ABC de 16.80  $\mu\text{g h mL}^{-1}$  y C<sub>máx</sub> de 3.83  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para furosemida, con una dosis de 10 mg kg<sup>-1</sup>. La discrepancia entre los resultados de nuestro estudio y la investigación farmacocinética de Hasan Alí et ál. (2017), podría explicarse por los resultados obtenidos en la caracterización de las nanopartículas sólido lipídicas de un estudio previo de Hasan Alí et ál. (2017), en donde determinan que el tamaño de partícula de las nanopartículas sólido lipídicas está entre 10 y 100 nm, frente a las partículas de P-SiO<sub>2</sub>, las cuales según el fabricante Merck Alemania, tienen un tamaño de partícula entre 5 a 25  $\mu\text{m}$ ; de acuerdo a estos resultados, se espera que las partículas de menor tamaño presenten una mayor velocidad de disolución según la ecuación de Noyes-Whitney, sin embargo, el estudio de Hasan Alí et ál. (2017), no reporta la superficie específica de las nanopartículas sólido lipídicas, la cual es de 500 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> en P-SiO<sub>2</sub> y es el factor que puede explicar los resultados descritos líneas arriba, debido a que la enorme superficie específica de las partículas de P-SiO<sub>2</sub> puede ayudar a comprender la mayor liberación del fármaco desde las partículas de P-SiO<sub>2</sub> y por tanto su mayor absorción. (20,43,51)

En el estudio desarrollado por Xin Xia et al. (2012), se utilizó tres tipos de MPSiO<sub>2</sub> (NFM-1, AMS-6 y STA-11) para incorporar atazanavir, fármaco antirretroviral de clase biofarmacéutica II (insoluble, permeable), demostrando que mediante la inclusión del fármaco en MPSiO<sub>2</sub> se logró incrementar la C<sub>máx</sub> en

4.6 y el ABC (8 horas) en 4.1 veces frente al fármaco en estado cristalino. Los resultados del presente estudio muestran que la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, permitió acrecentar la C<sub>máx</sub> en 3.8 veces y el ABC (24 horas) en 1.9 veces más, frente a furosemida. Los resultados hallados en ambos estudios demuestran el impacto positivo de MPSiO<sub>2</sub> en incrementar la concentración plasmática de ambos fármacos; sin embargo, nuestros resultados de ABC y C<sub>máx</sub> difieren en magnitud con los resultados de Xin Xia et al. (2012), estas diferencias en los resultados pueden explicarse en parte porque ambos fármacos presentan distinta permeabilidad a las membranas biológicas; atazanavir es un fármaco insoluble y permeable (SCB II), mientras que furosemida es un fármaco de clase biofarmacéutica IV, es decir insoluble e impermeable. (52)

Feng Wang et al. (2013), realizaron el confinamiento de celecoxib, analgésico inhibidor de la ciclooxigenasa 2 perteneciente a la clase biofarmacéutica II (insoluble y permeable), en MPSiO<sub>2</sub>; en el estudio *in-vivo* efectuado en ratas compararon los parámetros farmacocinéticos donde demostraron que mediante la inclusión de celecoxib en sílice mesoporoso se logró incrementar el C<sub>máx</sub> en 1.8 veces más y el ABC en 51.2 % más para celecoxib incluido en MPSiO<sub>2</sub> respecto a celecoxib. Los resultados de la presente investigación muestran una tendencia semejante en cuanto a incrementar estos parámetros, pero con valores marcadamente más altos, el C<sub>máx</sub> se incrementó en 3.8 veces y ABC en 99.6 % para furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub> frente a furosemida. Esta evidente diferencia en los resultados de ambos estudios se puede explicar por las características del material mesoporoso utilizado, en el estudio desarrollado por Feng Wang et al.

(2013), se utilizaron partículas mesoporosas producidas a escala de laboratorio con una superficie específica de  $310.20 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  frente al material mesoporoso utilizado en el presente estudio (P-SiO<sub>2</sub>) fabricado por Merck, Alemania, el cual tiene una superficie específica  $500.00 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ; la característica de área superficial en los materiales mesoporosos es primordial para la rápida disolución del fármaco debido a que está relacionada con la porosidad del mismo, la trama de poros evita una cristalización ordenada del fármaco en el interior; mantiene al fármaco “amorfizado” facilitando su rápida disolución. (11,53)

En el estudio *in vivo* realizado por Van Speybroeck et al. (2010), se realizó la comparación de ABC, C<sub>máx</sub> y T<sub>máx</sub> de la inclusión de fenofibrato, hipolipemiante prácticamente insoluble en agua e indicado en cuadros de hipertrigliceridemia, dislipidemia e hipercolesterolemia, en tres tipos de MPSiO<sub>2</sub>, de distintos valores de diámetro de poros y área superficial SBA-15-A: 7.3 nm;  $862 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , SBA-15-B: 4.4 nm;  $518 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  y MCM-41: 2.7 nm;  $1028 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  respectivamente; frente a un comprimido conteniendo fenofibrato (Lipanthyl). Los resultados muestran que MPSiO<sub>2</sub> (MCM-41) presenta un incremento del 35 % en el ABC frente al ABC de comprimidos conteniendo Fenofibrato (Lipanthyl). Los resultados de nuestra investigación, en donde se utilizó P-SiO<sub>2</sub> con diámetro de poros de 3 - 8 nm y área superficial de  $500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , muestran un incremento del 99.64 % del ABC sobre furosemida. Estas diferencias pueden explicarse en parte por el método de inclusión del fármaco en el material mesoporoso utilizado; mientras que en el estudio desarrollado por Van Speybroeck et al. (2010), se utilizó el método de impregnación con solvente mediante, en donde la solución conteniendo el

fármaco se aplicó en gotas sobre el material mesoporoso y se mezcló de forma manual con una espátula, luego del cual se procedió a secar; en nuestro estudio se la solución conteniendo el fármaco se aplicó con un caudal controlado de 30 a 35 mL h<sup>-1</sup> mediante una bomba de infusión, sobre P-SiO<sub>2</sub> bajo un mezclado constante con un agitador vertical y evaporación simultánea del solvente con un baño maría, además, del control de todos los otros parámetros especificados en la sección de métodos, la metodología aplicada evitó la cristalización del fármaco en la superficie de las partículas y por consiguiente la obstrucción de la abertura de los poros que impidieran al fármaco ingresar al interior. Además, otra posible explicación para esto es que la síntesis de los materiales mesoporosos a base de SiO<sub>2</sub> en el estudio de Van Speybroeck et al. (2010), es a nivel de laboratorio y en nuestro estudio es un producto producido a escala industrial por Merck, Alemania y comercializado como un excipiente de grado farmacéutico, condición que reduce la variabilidad, en especificaciones tales como, diámetro de poros y área superficial. (54)

Las investigaciones de la farmacocinética *in vivo* de la inclusión de furosemida en MPSiO<sub>2</sub> es limitada aún; la mayoría de estudios está orientada a la caracterización de la inserción del fármaco en la trama de poros y al estudio de la cinética de liberación *in vitro*.

Los resultados *in vitro* obtenidos en el presente estudio tienen correspondencia con los resultados del estudio farmacocinético *in vivo*, sin embargo, no se ha establecido una correlación *in vitro-in vivo*. El estudio de los parámetros

farmacocinéticos ABC,  $C_{\text{máx}}$  y  $t_{\text{máx}}$  para furosemida y para la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> bajo las condiciones establecidas en la sección de métodos; demostró que el ABC se incrementó de 16.80  $\mu\text{g h mL}^{-1}$  a 33.54  $\mu\text{g h mL}^{-1}$ , la  $C_{\text{máx}}$  de 3.83  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 14.41  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; mientras que el  $t_{\text{máx}}$  se mantuvo en 1 hora para ambos casos. Estos resultados ilustran que la inmediata sobresaturación de furosemida producida por la rápida disolución a partir de la trama de poros de P-SiO<sub>2</sub> es suficiente para establecer una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) frente a furosemida.

En la curva de concentraciones plasmáticas versus tiempo para la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> y furosemida se pueden establecer tres momentos importantes; el primero de ellos, a los 30 minutos en que la cantidad absorbida de furosemida supera al de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub>; luego, a los 60 minutos, se alcanza la máxima absorción de ambas muestras; sin embargo, la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> supera en 3.8 veces a furosemida y finalmente, a las 6 y 12 horas en que furosemida y la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> respectivamente, alcanzan los límites de cuantificación. Una posible explicación para estos resultados puede estar en la rápida absorción de furosemida en los primeros 30 minutos, porque estas partículas empiezan su proceso de disolución inmediatamente ingresan al lumen gastrointestinal, a diferencia de la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> en donde de acuerdo a lo señalado por Wang et ál. (2009), para el inicio de disolución del fármaco se requiere de las siguientes etapas, i) el ingreso del medio de disolución al sistema de poros debido a la presión osmótica originada por los gradientes de concentración, ii) la disolución del fármaco, iii) la

difusión del fármaco a través de los poros debido al gradiente de concentración, iv) el transporte difusivo y convectivo del fármaco hacia el tracto gastrointestinal, luego del cual se inicia la absorción. Luego, la máxima absorción de furosemida se alcanza a los 60 minutos y está limitada, de acuerdo a lo señalado por la ecuación de Noyes-Whitney, por el área superficial de las partículas; en contraste, la inclusión de furosemida en P-SiO<sub>2</sub> alcanza una concentración máxima de 3.8 veces más al mismo tiempo transcurrido, una explicación para este resultado está en el sustancial incremento del área superficial de furosemida por su inclusión en P-SiO<sub>2</sub>. Finalmente, ambas situaciones (las etapas necesarias para la disolución del fármaco y el incremento del área superficial del fármaco) parecen explicar la permanencia de furosemida hasta las 12 horas para la inclusión en P-SiO<sub>2</sub> a diferencia de furosemida cuya cantidad cuantificable desaparece a las 6 horas. (20,55)

Existen varias explicaciones posibles para estos resultados, la rápida disolución de furosemida desde la red de poros de P-SiO<sub>2</sub> está asociada al confinamiento del fármaco dentro de la red de poros con dimensiones que oscilan entre 3 a 8 nm; de esta forma, evita que grandes porciones de furosemida cristalicen de forma ordenada. Por lo tanto, al interior de la trama de poros el fármaco se mantiene estabilizado bajo una forma amorfa, siendo esta estructura desordenada de las moléculas la que favorece su rápida disolución. Otra explicación que favorece la comprensión de la mayor absorción de furosemida, es el incremento del área superficial del fármaco al ser incluido en la red de poros de P-SiO<sub>2</sub>, estas partículas tienen una superficie específica de 500 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, comparado con

furosemida en estado cristalino, este cambio físico del fármaco también favorece su disolución. (2,4,11,56)

Estos resultados también pueden explicarse por el hecho de que, la elevada energía superficial de P-SiO<sub>2</sub> reduce la energía libre de Gibbs y de esta forma mantiene la estabilidad de la estructura amorfa de furosemida generada luego de su inclusión en la red de poros de P-SiO<sub>2</sub>. Mantener la estabilidad de la forma amorfa es necesaria para alcanzar los niveles requeridos de solubilidad y disolución de furosemida. (4,20)

Los hallazgos de la presente investigación, de acuerdo a las condiciones del estudio, confirman la capacidad y potencialidad de P-SiO<sub>2</sub> en incrementar la velocidad de disolución y biodisponibilidad de furosemida motivada por el cambio de furosemida cristalina a una configuración molecular amorfa y estable, además, por el incremento del área superficial del fármaco debido a su adsorción en la trama de poros de P-SiO<sub>2</sub>. La modificación en la morfología de furosemida, fármaco utilizado en este estudio como modelo de la clase biofarmacéutica IV, tiene implicancias trascendentales en el desarrollo de formas farmacéuticas sólidas porque es necesario que estas cumplan adecuadamente con la biodisponibilidad y eficacia.

Sin embargo, debido a que la investigación se desarrolló a nivel de laboratorio; son necesarios otros estudios para reafirmar y consolidar nuestros resultados; tales como, la caracterización reológica de las partículas de P-SiO<sub>2</sub> conteniendo

furosemida, los estudios de desarrollo y formulación de un comprimido o cápsula utilizando furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub>. Además, sobre las pruebas *in vivo*, debido a la mayor absorción de furosemida sería importante ampliar el estudio para determinar los efectos tóxicos y evaluar una posible reducción de la dosis.

## 7. CONCLUSIONES

- a. Los estudios de caracterización demuestran que se alcanzó el confinamiento de furosemida en la red de poros de P-SiO<sub>2</sub> y la supresión de la cristalinidad del fármaco. Se logró una inclusión de 40.69 % y 40.75 % de furosemida en la trama de poros de P-SiO<sub>2</sub> mediante HPLC y TG respectivamente. Además, los estudios de DRX y CDB muestran con precisión la modificación de la morfología de furosemida de cristalina a amorfa.
- b. La evaluación de la disolución revela una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en la velocidad de disolución de furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub> frente a furosemida cristalina (materia prima). La cantidad de furosemida liberada a los 5 minutos fue de 85.03 % para furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, frente a 32.28 % de furosemida cristalina; y a los 60 minutos fue de 101.65 % para furosemida en P-SiO<sub>2</sub>, frente a 35.95 % de furosemida cristalina.
- c. La evaluación de los parámetros farmacocinéticos evidencia un incremento en el ABC del 99.6 % de furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub> frente a furosemida cristalina (materia prima). Además, se revela una evidencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) para el C<sub>máx</sub> de furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub> frente a furosemida cristalina.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Davies P. Oral Solid Dosage Forms. In: Gibson M, editor. *Pharmaceutical Preformulation and Formulation*. 2nd ed. New York: Informa Healthcare USA, Inc.; 2009. p. 367–430.
2. Xia X. *Dissolving the Rocks Solubility Enhancement of Active Pharmaceutical Ingredients using Mesoporous Silica*. Stockholm University; 2014.
3. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, editors. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 6th ed. *Handbook of pharmaceutical excipients, Sixth edition*. Washington, DC: Pharmaceutical Press; 2009. 917 p.
4. Monsuur F, Hoefler H, McCarthy W, Choudhari Y, Libanati C. *Mesoporous Silica Drug Delivery Systems*. 2014. 665–693 p.
5. Vialpando M. *Oral dosage form development of mesoporous silica for enhanced release of poorly soluble compounds*. 2013;
6. Choudhari Y, Hoefler H, Libanati C, Monsuur F, McCarthy W. *Mesoporous Silica Drug Delivery Systems (Chapter 23)*. In: Shah N, Sandhu H, Soon D, Malick HC, Waseem A, editors. *Amorphous solid dispersions: theory and practice*. Londres: Springer; 2014. p. 699.
7. Hasan A, Prasad Verma PR, Kumar Sunil D, Venkatesan J, Seo Y, Kim S-K, et al. *In vitro-in vivo and pharmacokinetic evaluation of solid lipid nanoparticles of furosemide using Gastroplus*. *R Soc Chemistry*. 2018;7:33314–26.

8. Derakhshandeh K, Karimi M, Azandaryani AH, Bahrami G, Ghanbari K. Pharmacokinetic study of furosemide incorporated PLGA microspheres after oral administration to rat. Iran J Basic Med Sci [Internet]. 2016 Oct [cited 2019 Oct 15];19(10):1049–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27872700>
9. Nielsen LH, Gordon S, Holm R, Selen A, Rades T, Müllertz A. Preparation of an amorphous sodium furosemide salt improves solubility and dissolution rate and leads to a faster T<sub>max</sub> after oral dosing to rats. Eur J Pharm Biopharm [Internet]. 2013;85(3 PART B):942–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.09.002>
10. Perioli L, Pagano C, Ambrogi V, Sagnella A, Marmottini F, Rossi C, et al. Use of SBA-15 for furosemide oral delivery enhancement. Eur J Pharm Sci [Internet]. 2012;46(1–2):43–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.02.004>
11. Linnell T. Mesoporous silica- and silicon-based materials as carriers for poorly water soluble drugs. University of Helsinki; 2011.
12. Shargel L, Yu ABC, editors. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. 2012th ed. Londres: McGrawHill Education; 2012. 910 p.
13. Newman A, Zografi G. Pharmaceutical Amorphous Solid Dispersions. In: Newman A, editor. 2015th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2015. p. 505.
14. Nair AS, Nair SC, Author C. Pharmaceutical Solid Dispersion Technology:

- a Promising Tool To Enhance Oral Bioavailability. *Int Res J Pharm Appl Sci*. 2013;3(35):214–8.
15. Tsume Y, Mudie DM, Langguth P, Amidon GE, Amidon GL. The Biopharmaceutics Classification System: Subclasses for in vivo predictive dissolution (IPD) methodology and IVIVC. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2014;57(1):152–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2014.01.009>
  16. Strachan CJ, Grohgan H, Löbmann K, Laitinen R, Rades T. Emerging trends in the stabilization of amorphous drugs. *Int J Pharm* [Internet]. 2013;453(1):65–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.04.066>
  17. Wei Q, Keck CM, Müller RH. CapsMorph® technology for oral delivery - Theory, preparation and characterization. *Int J Pharm* [Internet]. 2014;482(1–2):11–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.068>
  18. Van Speybroeck M, Mellaerts R, Do Thi T, Martens JA, Van Humbeeck J, Annaert P, et al. Preventing Release in the Acidic Environment of the Stomach via Occlusion in Ordered Mesoporous Silica Enhances the Absorption of Poorly Soluble Weakly Acidic Drugs. *J Pharm Sci*. 2011;100:4864–76.
  19. Saffari M, Ebrahimi A, Langrish T. A novel formulation for solubility and content uniformity enhancement of poorly water-soluble drugs using highly-porous mannitol. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2016;83:52–61.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.12.016>

20. Alexander FT, Attwood D. *Physicochemical Principles of Pharmacy*. 4th ed. Alexander FT, Attwood D, editors. Londres: Pharmaceutical Press; 2006. 513 p.
21. Vo CLN, Park C, Lee BJ. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2013;85(3 PART B):799–813. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.09.007>
22. Xu W, Riikonen J, Lehto VP. Mesoporous systems for poorly soluble drugs. *Int J Pharm* [Internet]. 2012;453(1):181–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.09.008>
23. Waters LJ, Hussain T, Parkes G, Hanrahan JP, Tobin JM. Inclusion of fenofibrate in a series of mesoporous silicas using microwave irradiation. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2013;85(3 PART B):936–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.08.002>
24. Siepmann J, Siepmann F. Mathematical modeling of drug dissolution. *Int J Pharm*. 2013;453(1):12–24.
25. Monsuur F, Hoefler H, McCarthy W, Choudhari Y, Libanati C. Mesoporous Silica Drug Delivery Systems. In: Shah N, Sandhu H, Soon Choi D, Chokshi H, Malick AW, editors. 2014th ed. Londres; 2014. p. 665–93.
26. Planinšek O, Kovačič B, Vrečer F. Carvedilol dissolution improvement by preparation of solid dispersions with porous silica. *Int J Pharm* [Internet].

- 2011 Mar 15 [cited 2019 Apr 10];406(1–2):41–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219991>
27. Jadach B, Nowak I, Lulek J, Murias M, Feliczak-Guzik A, Piotrowska H. Synthesis and characterization of SBA-16 type mesoporous materials containing amine groups. *Microporous Mesoporous Mater* [Internet]. 2015;220:231–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.09.006>
  28. Takeuchi H, Nagira S, Yamamoto H, Kawashima Y. Solid dispersion particles of tolbutamide prepared with fine silica particles by the spray-drying method. *Powder Technol* [Internet]. 2004 Mar [cited 2019 Apr 10];141(3):187–95. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032591004001202>
  29. Liao CC, Jarowski CI. Dissolution rates of corticoid solutions dispersed on silicas. *J Pharm Sci* [Internet]. 1984 Mar [cited 2019 Apr 10];73(3):401–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6325660>
  30. Speybroeck M Van, Barillaro V, Thi T Do, Mellaerts R, Martens J, Humbeeck J Van, et al. Ordered Mesoporous Silica Material SBA-15: A Broad-Spectrum Formulation Platform for Poorly Soluble Drugs. *J Pharm Sci* [Internet]. 2009 Aug 1 [cited 2019 Apr 10];98(8):2648–58. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916330283>
  31. Watanabe T, Wakiyama N, Usui F, Ikeda M, Isobe T, Senna M. Stability of amorphous Indomethacin compounded with silica. *Int J Pharm* [Internet]. 2001 Sep 11 [cited 2019 Apr 10];226(1–2):81–91. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11532573>

32. Pan X, Julian T, Augsburger L. Increasing the Dissolution Rate of a Low-Solubility Drug Through a Crystalline-Amorphous Transition: A Case Study with Indomethicin. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2008 Jan 11 [cited 2019 Apr 10];34(2):221–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18302042>
33. Trevor A, Katzung BG, Kruidering-Hall M, editors. *Pharmacology, examination & board review*. 2015.
34. Le T-T, Elzhry Elyafi AK, Mohammed AR, Al-Khattawi A. Delivery of Poorly Soluble Drugs via Mesoporous Silica: Impact of Drug Overloading on Release and Thermal Profiles. *Pharmaceutics* [Internet]. 2019 Jun 10 [cited 2019 Aug 28];11(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31185610>
35. Ambrogi V, Perioli L, Pagano C, Latterini L, Marmottini F, Ricci M, et al. MCM-41 for furosemide dissolution improvement. *Microporous Mesoporous Mater* [Internet]. 2012;147(1):343–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2011.07.007>
36. Kaukonen AM, Laitinen L, Salonen J, Tuura J, Heikkilä T, Linnell T, et al. Enhanced in vitro permeation of furosemide loaded into thermally carbonized mesoporous silicon (TCPSi) microparticles. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;66(3):348–56.
37. Perioli L, D’Alba G, Pagano C. New oral solid dosage form for furosemide oral administration. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2012;80(3):621–9.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.12.011>

38. Granero GE, Longhi MR, Mora MJ, Junginger HE, Midha KK, Shah VP, et al. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Furosemide. *J Pharm Sci* [Internet]. 2010;99(5):2386–2398. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jps.22007/full%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19967780>
39. Van Speybroeck M, Mellaerts R, Mols R, Thi T Do, Martens JA, Van Humbeeck J, et al. Enhanced absorption of the poorly soluble drug fenofibrate by tuning its release rate from ordered mesoporous silica. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2010 Dec 23 [cited 2019 Apr 10];41(5):623–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20850527>
40. Wang F, Hui H, Barnes TJ, Barnett C, Prestidge CA. Oxidized Mesoporous Silicon Microparticles for Improved Oral Delivery of Poorly Soluble Drugs. *Mol Pharm* [Internet]. 2010 Feb 9 [cited 2019 Apr 10];7(1):227–36. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/mp900221e>
41. [www.diosna.com](http://www.diosna.com) [Internet]. 2020. Available from: <https://www.diosna.com/uk/the-pharma-experts/products/single-pot-processor/>
42. Convention USP, editor. *United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 42-NF 37)*. 42nd ed. Rockville (MD): Convention, United States Pharmacopeial; 2018.
43. Ali H, Prasad Verma PR, Dubey SK, Venkatesan J, Seo Y, Kim S-K, et al.

In vitro–in vivo and pharmacokinetic evaluation of solid lipid nanoparticles of furosemide using Gastroplus™. RSC Adv [Internet]. 2017 Jun 29 [cited 2019 Apr 10];7(53):33314–26. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7RA04038E>

44. García-Benett A, Feiler A. Mesoporous Silica Drug Delivery Systems. In: Shah N, Sandhu H, Soon D, Chokshi H, Waseem A, editors. Amorphous Solid Dispersions Theory and Practice. 1st ed. New York; 2014.
45. Cantor SL, Ausburger LL, Hoag SW. Pharmaceutical Granulation Processes, Mechanism, and the Use of Binders. In: Ausburger LL, Hoag SW, editors. Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Volume 1: Unit Operations and Mechanical Properties. 3rd ed. Informa Healthcare; 2008. p. 532.
46. Thekedar B. Solving the bioavailability challenge : The key success factor of pharmaceutical formulations. In: Solving the bioavailability challenge : The key success factor of pharmaceutical formulations. Merck Millipore; 2014.
47. Heikkilä T, Björkqvist M, Laitinen L, Salonen J, Vähä-Heikkilä K, Lehto V-P, et al. Mesoporous silicon microparticles for oral drug delivery: Loading and release of five model drugs. J Control Release. 2005;108(2–3):362–74.
48. Linnell T, Riikonen J, Salonen J, Kaukonen AM, Laitinen L, Hirvonen J, et al. Surface chemistry and pore size affect carrier properties of mesoporous silicon microparticles. Int J Pharm. 2007;343(1–2):141–7.

49. VEERABADRAN NG, PRICE RR, LVOV YM. Clay Nanotubes for Encapsulation and Sustained Release of Drugs. *Nano*. 2007;02(02):115–20.
50. Codruta S, Vari C, Imre S, Gyeresi Á, Dehelean C, Dogaru M. HPLC analysis of furosemide in rat plasma. Bioavailability study. Note 2. *Farmacia*. 2008;LVI(513–520).
51. Ali H, Singh SK. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles of furosemide using quality by design. *Part Sci Technol*. 2018;36(6):695–709.
52. Xia X, Zhou C, Ballell L, Garcia-Bennett AE. In vivo Enhancement in Bioavailability of Atazanavir in the Presence of Proton-Pump Inhibitors using Mesoporous Materials. *ChemMedChem* [Internet]. 2012 Jan 2 [cited 2019 Oct 8];7(1):43–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cmdc.201100500>
53. Wang S, Sun C, Jiang H, Zhang J, Jiang T, Zhi Z, et al. Inclusion of celecoxib into fibrous ordered mesoporous carbon for enhanced oral bioavailability and reduced gastric irritancy. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2012;45(5):639–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.01.003>
54. Van Speybroeck M, Mellaerts R, Mols R, Thi T Do, Martens JA, Van Humbeeck J, et al. Enhanced absorption of the poorly soluble drug fenofibrate by tuning its release rate from ordered mesoporous silica. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2010;41(5):623–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2010.09.002>

55. Wang S. Ordered mesoporous materials for drug delivery. *Microporous Mesoporous Mater* [Internet]. 2009 Jan [cited 2019 Oct 16];117(1–2):1–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387181108003302>
56. Wang F, Barnes TJ, Prestidge CA. Celecoxib confinement within mesoporous silicon for enhanced oral bioavailability. *Open Mater Sci* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2019 Aug 28];1(1). Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/oms.2014.1.issue-1/mesbi-2013-0001/mesbi-2013-0001.xml>

## **ANEXOS**

SULESHVARI PHARMA				
FACTORY: - 6012/1, GIDC indl. Estate, Near Panama Petrochem, Ankleshwar-393002, Dist. Bharuch				
<b>QUALITY CONTROL DEPARTMENT</b>				
<b>FINISHED PRODUCT CERTIFICATE OF ANALYSIS</b>				
Product Name	FUROSEMIDE USP			
Batch No.	17/FRS/005	Product Code	FRS	
QC Reference No.	FP-03-011	Quantity released	400.00 KG	
Analysis Completed on	08.03.2017	Retest Date/Expiry Date	FEB, 2022	
Specification No.	SPE/API/FRS/00	Date of Mfg.	MAR, 2017	
Revision No.	00			
Sr. No.	TEST	SPECIFICATION	OBSERVATION	
1	Appearance	White to Slightly Yellow, Odorless, Crystalline Powder	Almost White Crystalline Powder	
2	Solubility	Parcially in soluble in water, Freely soluble in Acetone in dimethyl formamide and in alkali hydroxide, soluble in methanol, sparingly soluble in alcohol, slightly soluble in ether, very slightly soluble in chloroform,	Complies	
3	Identification	A. By UV	Absorptivities at 271 nm should not differ by more than 3.0 %	Complies
		B. By IR	The infrared absorption spectrum of the sample should be concordant with the spectrum of Furosemide WS	Complies
		C. By color Test	Formation of a red to red-violet color should be produced	Red-violet color formation
4	Loss on drying	NMT 1.0 % w/w	0.21 %	
5	Heavy Metals	NMT 20 ppm	Less than 20 ppm	
6	Residue on ignition	NMT 0.10 % w/w	0.04 w/w	
7	Related substance by HPLC	The sum of the response at 254 nm of those peaks eluting before Furosemide	Not More Than 0.25 %	0.08 %
		The sum of the response at 272 nm of those peaks eluting after Furosemide	Not More Than 0.25 %	0.10 %
8	Assay	98.00 % - 102.0 % on dry basis	99.52 %	
9	Residual solvent	Acetic Acid :- NMT 5000 ppm	1130 ppm	
Remark: The material complies/does not comply as per above specification				
Prepared by/date		Reviewed by/date	Approved by/date	
Format No.: QC/GMP/14/F5-00				

Figura 16. Certificado de análisis de furosemida (Suleshvare pharma, India)




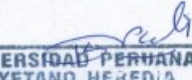

	<b>SULESHVARI PHARMA</b> FACTORY: - 6012/1, GIDC Indl. Estate, Near Panama Petrochem, Ankleshwar-393002, Dist. Bharuch		
	<b>QUALITY CONTROL DEPARTMENT</b> <b>FINISHED PRODUCT CERTIFICATE OF ANALYSIS</b>		
<b>Product Name</b>	FUROSEMIDE USP		
<b>Source of Material</b>	Plant	<b>Batch No.</b>	17/FRS/001
<b>Mfg Date</b>	JAN-2017	<b>Date Of Qualification</b>	10.01.2017
<b>Working Std. No.</b>	FRS/WS/009	<b>Do not use after</b>	01.01.2020
<b>Storage Condition</b>	Store in tightly closed containers, protected from light		
<b>TESTS</b>	<b>SPECIFICATIONS</b>		<b>OBSERVATIONS</b>
Description	White or almost white crystalline powder		White crystalline Powder
Identification by IR	The FT-IR spectrum of the test sample concordant with that of in-house FT-IR standard spectrum.		Complies
Loss on drying (hot air oven at 105 °C for 3 hrs)	NMT 0.50 % W/W		0.22 %
Related substance by HPLC	The sum of the response at 254 nm of those peaks eluting before Furosemide	Not More Than 0.50 %	0.10 %
	The sum of the response at 272 nm of those peaks eluting after Furosemide	Not More Than 0.50 %	0.09 %
Assay	98.00 % - 101.0 % on dry basis		99.43 %
Remark: Use for Related substances and Identification test			
Prepared by/date	Reviewed by/date	Approved by/date	
			
			

Figura 17. Certificado de análisis de ET de furosemida (Suleshvari pharma, India)



# Analysenzertifikat

1.20091.0300 Parateck® SLC 500 USP, Ph.Eur.  
Charge TA1982991

	Spezifikation		Chargenwerte		Methode
Aussehen	entspricht		entspricht		
Identität	entspricht		entspricht		
Gehalt	98.0 - 100.5	%	99.9	%	Ph.Eur.
Gehalt	≥ 99.0	%	99.9	%	NF
pH-Wert	4.0 - 7.0		4.4		Ph.Eur.
pH - Wert	4 - 8		6		NF
Chlorid (Cl)	≤ 0.1	%	< 0.1	%	Ph.Eur.
Chlorid (Cl)	≤ 0.1	%	< 0.1	%	NF
Sulfat (SO <sub>4</sub> )	≤ 1	%	< 1	%	Ph.Eur.
Sulfat (SO <sub>4</sub> )	≤ 0.5	%	< 0.5	%	NF
Schwermetalle (als Pb)	≤ 25	ppm	< 25	ppm	Ph.Eur.
Al (Aluminium)	≤ 100	ppm	34	ppm	
As (Arsen)	≤ 1.50	ppm	< 0.10	ppm	
Cd (Cadmium)	≤ 0.5	ppm	< 0.1	ppm	
Fe (Eisen)	≤ 300	ppm	< 300	ppm	Ph.Eur.
Hg (Quecksilber)	≤ 1.5	ppm	< 1.0	ppm	
Pb (Blei)	≤ 0.5	ppm	< 0.1	ppm	
Glühverlust	≤ 20	%	8	%	Ph.Eur.
Glühverlust	≤ 8.5	%	3.5	%	NF
Trocknungsverlust	≤ 5.0	%	4.4	%	NF
In Säure lösliche Anteile	≤ 2.0		0.7		Ph.Eur.
Wasseraufnahmevermögen	entspricht		entspricht		Ph.Eur.
Ethanol	≤ 5000	ppm	< 5000	ppm	
d 50 (Laserbeugung, Kornanalyse)	9.0 - 11.5	µm	10.9	µm	

Datum der Prüfung (TT.MM.JJJJ) 15.04.2015  
mindestens verwendbar bis (TT.MM.JJJJ) 30.04.2017

Dr. Britta Blödmann  
Verantwortlicher Laborleiter Qualitätskontrolle

Dieses Dokument wurde maschinell erstellt und ist ohne Unterschrift gültig.

Figura 18. Certificado de análisis de Parateck® SLC 500 USP, Ph. Eur - dióxido de silicio mesoporoso, sílice mesoporoso (P-SiO<sub>2</sub>)

```

. kwallis2 t5,by( PresentaciónFarmaco )

One-way analysis of variance by ranks (Kruskal-Wallis Test)

PresentaciónFarmacoObs   RankSum   RankMean
-----
  1           3         6.00         2.00
  2           3        24.00         8.00
  3           3        15.00         5.00

Chi-squared (uncorrected for ties) =    7.200 with    2 d.f. (p = 0
> .02732)
Chi-squared (corrected for ties)   =    7.200 with    2 d.f. (p = 0
> .02732)

Multiple comparisons between groups
-----
(Adjusted p-value for significance is 0.008333)

Ho: t5(PresentaciónFarmaco==1) = t5(PresentaciónFarmaco==2)
RankMeans difference =    6.00 Critical value =    5.35
Prob = 0.003645 (S)

Ho: t5(PresentaciónFarmaco==1) = t5(PresentaciónFarmaco==3)
RankMeans difference =    3.00 Critical value =    5.35
Prob = 0.089856 (NS)

Ho: t5(PresentaciónFarmaco==2) = t5(PresentaciónFarmaco==3)
RankMeans difference =    3.00 Critical value =    5.35
Prob = 0.089856 (NS)

. kwallis2 t10 ,by( PresentaciónFarmaco )

One-way analysis of variance by ranks (Kruskal-Wallis Test)

PresentaciónFarmacoObs   RankSum   RankMean
-----
  1           3         6.00         2.00
  2           3        24.00         8.00
  3           3        15.00         5.00

Chi-squared (uncorrected for ties) =    7.200 with    2 d.f. (p = 0
> .02732)
Chi-squared (corrected for ties)   =    7.200 with    2 d.f. (p = 0
> .02732)

Multiple comparisons between groups
-----
(Adjusted p-value for significance is 0.008333)

Ho: t10(PresentaciónFarmaco==1) = t10(PresentaciónFarmaco==2)
RankMeans difference =    6.00 Critical value =    5.35
Prob = 0.003645 (S)

```

Figura 19. Análisis estadístico para evaluación de disolución

```
. ranksum t05, by(Tratamiento)
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tratamiento	obs	rank sum	expected
1	3	6	10.5
2	3	15	10.5
combined	6	21	21

unadjusted variance            5.25  
adjustment for ties            0.00

---

adjusted variance            5.25

Ho:  $t05(\text{Tratam} \sim o == 1) = t05(\text{Tratam} \sim o == 2)$   
z = -1.964  
Prob > |z| = 0.0495

```
. ranksum t1, by(Tratamiento)
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tratamiento	obs	rank sum	expected
1	3	15	10.5
2	3	6	10.5
combined	6	21	21

unadjusted variance            5.25  
adjustment for ties            0.00

---

adjusted variance            5.25

Ho:  $t1(\text{Tratam} \sim o == 1) = t1(\text{Tratam} \sim o == 2)$   
z = 1.964  
Prob > |z| = 0.0495

```
. ranksum t2 , by(Tratamiento)
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tratamiento	obs	rank sum	expected
1	3	12	10.5
2	3	9	10.5
combined	6	21	21

unadjusted variance            5.25  
adjustment for ties            0.00

---

adjusted variance            5.25

Ho:  $t2(\text{Tratam} \sim o == 1) = t2(\text{Tratam} \sim o == 2)$   
z = 0.655  
Prob > |z| = 0.5127

*Figura 20. Análisis estadístico para evaluación farmacocinética in vivo*

Datos primarios de valoración de contenido de muestras de furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub>

Equipo: HPLC

	Áreas
Estandar A	22317.80
Estandar A	22247.10
Estandar A	22259.60
Estandar A	22331.80
Estandar A	22011.40
Estandar B	21806.60
Estandar B	22011.40
Estandar B	21926.60
Estandar B	22008.20
Estandar B	21926.60
Muestra 1 - 1	28743.20
Muestra 1 - 2	28872.90
Muestra 2 - 1	28888.70
Muestra 2 - 2	28612.80
Muestra 3 - 1	29739.20
Muestra 3 - 2	29655.70
Muestra 4 - 1	29126.90
Muestra 4 - 2	29358.20

Tabla 16. Datos primarios de las áreas obtenidas en la cuantificación de furosemida en las muestras de furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub>.

Datos primarios de resultados de disolución de furosemida cristalina (materia prima), furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub> y comprimidos de furosemida (40 mg, Myland ®)

Furosemida cristalina (materia prima)

Furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub>

Comprimidos de furosemida (40 mg, Myland ®)

Equipo: Espectrofotómetro uv visible

Equipo: Espectrofotómetro uv visible

Equipo: Espectrofotómetro uv visible

	Absorbancia
Blanco	0.0001
Estandar A	0.127740
Estandar A	0.127410
Estandar A	0.127370
Estandar A	0.127640
Estandar A	0.127800
Estandar A	0.127640
Estandar B	0.126500
Estandar B	0.126490
Estandar B	0.126580
Estandar B	0.126650
Estandar B	0.126600
Estandar B	0.126610

	Absorbancia
Blanco	0.0001
Estandar A	0.13428
Estandar A	0.13467
Estandar A	0.13473
Estandar A	0.13483
Estandar A	0.13484
Estandar A	0.13491
Estandar B	0.12254
Estandar B	0.12263
Estandar B	0.12272
Estandar B	0.12295
Estandar B	0.12298
Estandar B	0.12328

	Absorbancia
Blanco	0.0001
Estandar A	0.13118
Estandar A	0.13178
Estandar A	0.13187
Estandar A	0.13201
Estandar A	0.13205
Estandar A	0.13232
Estandar B	0.1227
Estandar B	0.12311
Estandar B	0.12314
Estandar B	0.12342
Estandar B	0.12343
Estandar B	0.12367

Furosemida cristalina (materia prima)

Furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub>

Comprimidos de furosemida (40 mg, Myland ®)

Tiempo (min)	Absorbancia de Muestra			Tiempo (min)	Absorbancia de Muestra			Tiempo (min)	Absorbancia de Muestra		
	1	2	3		1	2	3		1	2	3
5	0.093510	0.090027	0.089430	5	0.094957	0.093598	0.095277	5	0.061138	0.058892	0.057253
	0.094080	0.089853	0.088585		0.099351	0.093812	0.096198		0.060787	0.059355	0.056887
	0.094147	0.089815	0.088606		0.096006	0.094143	0.096374		0.060888	0.058930	0.056810
10	0.098300	0.090140	0.095304	10	0.106040	0.104940	0.109510	10	0.094382	0.093319	0.089545
	0.098334	0.090194	0.095516		0.105950	0.105460	0.110280		0.092790	0.092437	0.090051
	0.098247	0.090161	0.095745		0.106060	0.105600	0.110980		0.092738	0.091762	0.090073
15	0.108130	0.092886	0.098958	15	0.111900	0.109040	0.107430	15	0.100110	0.095577	0.093469
	0.108750	0.093044	0.099320		0.112930	0.109710	0.107520		0.100260	0.092518	0.093594
	0.109830	0.093226	0.099315		0.112220	0.109930	0.107990		0.100580	0.092195	0.093618
20	0.099110	0.099236	0.095592	20	0.115090	0.116340	0.110350	20	0.104260	0.104170	0.099472
	0.099817	0.099272	0.095973		0.115310	0.116900	0.111150		0.105660	0.104560	0.100250
	0.099949	0.098467	0.096526		0.115120	0.116560	0.111030		0.104760	0.104640	0.100170
40	0.103870	0.110870	0.098899	40	0.113910	0.115440	0.113110	40	0.107410	0.103700	0.105540
	0.104650	0.111120	0.098780		0.114360	0.115830	0.114280		0.107500	0.103350	0.105660
	0.105430	0.111450	0.099191		0.114010	0.115810	0.114780		0.107180	0.103230	0.105490
60	0.106380	0.107070	0.098696	60	0.117710	0.116310	0.117260	60	0.108650	0.105390	0.107400
	0.106400	0.106970	0.098878		0.118220	0.117100	0.117740		0.108750	0.106110	0.107330
	0.106560	0.107640	0.099118		0.118570	0.116670	0.117520		0.108820	0.105990	0.107460
90	0.104380	0.101570	0.098781	90	0.118060	0.118910	0.119810	90	0.107760	0.111950	0.108200
	0.104570	0.101630	0.098909		0.118150	0.119320	0.120830		0.109520	0.112780	0.109120
	0.104400	0.101410	0.099056		0.118080	0.119590	0.121060		0.107910	0.113130	0.109080

Tabla 17. Datos primarios de las absorbancias obtenidas en la disolución de furosemida en las muestras de furosemida cristalina (materia prima), furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub> y comprimidos de furosemida (40 mg, Mylan®)

Datos primarios de resultados de cuantificación de furosemida en plasma de ratas para furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub> y furosemida cristalina (materia prima)

Equipo: HPLC

Estandar 1 5549.000  
Estandar 2 5588.000  
Estandar 3 5564.000

Furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub>

Tiempo (horas)	Áreas muestras Rata 1				Áreas muestras Rata 2				Áreas muestras Rata 3			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0.0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.5	31.3866	32.0436	36.6990	36.6438	25.3284	29.3105	28.9938	20.4416	8.8127	11.1827	11.5479	7.3260
1.0	291.3698	289.9418	290.6033	288.7809	145.9397	147.2918	149.2735	148.0177	209.8838	220.5162	235.7413	209.4889
2.0	72.5177	69.1776	73.9933	74.1292	38.0261	40.5093	40.5154	40.3268	57.1485	56.3588	56.5107	55.9184
4.0	44.8310	44.8319	44.7863	44.7560	39.9099	36.8284	38.5417	39.2422	58.5428	61.5690	58.6338	59.5226
6.0	32.9681	31.2197	31.5154	35.7086	52.9778	47.6575	43.8573	49.7813	40.7922	40.7770	40.5644	40.6555
12.0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
24.0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

Estandar 1 5594.200  
Estandar 2 5592.743  
Estandar 3 5586.500

Furosemida cristalina (materia prima)

Tiempo (horas)	Áreas muestras Rata 1				Áreas muestras Rata 2				Áreas muestras Rata 3			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0.0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.5	56.2769	51.5811	52.9927	61.9949	171.3708	176.6226	185.7905	174.7769	56.6263	54.1577	59.1885	56.1529
1.0	62.0340	61.6921	64.4482	67.1262	50.3368	52.2130	56.1408	51.6948	58.4005	57.9455	58.7039	57.3387
2.0	50.5754	53.9427	57.0516	54.9211	54.3626	52.9053	53.6540	53.6210	55.0634	54.4566	54.1532	53.1632
4.0	40.8045	41.7147	37.9224	38.5292	200.3933	206.2043	207.0586	207.8844	60.9793	61.5860	60.8276	60.8276
6.0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
12.0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
24.0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

Tabla 18. Datos primarios de las áreas obtenidas en la cuantificación de furosemida en plasma de ratas en las muestras de furosemida incluida en P-SiO<sub>2</sub> y furosemida cristalina (materia prima).