



DISEÑO Y DESARROLLO DE NUEVOS COMPLEJOS SUPRAMOLECULARES DE FLUORQUINOLONAS Y SULFAMIDAS ANTIBACTERIANAS

Autora:
Farm. Cecilia Daniela AVILA

Directora de Tesis:
Dra. Graciela PINTO VITORINO (FCNyCS-UNPSJB)

Co-directora de Tesis:
Dra. María Rosa MAZZIERI (FCQ-UNC)

Tesis presentada para optar al título de:
DOCTORA EN FARMACIA

2025





Secretaría de
Ciencia y Tecnología
Gobierno del Chubut

Autora:

Farm. Cecilia Daniela AVILA (CRIDECIT FCNyCS-UNPSJB)

Directora de Tesis:

Dra. Graciela PINTO VITORINO (CRIDECIT FCNyCS-UNPSJB)

Co-directora de Tesis:

Dra. María Rosa MAZZIERI (FCQ-UNC)

Jurado de Tesis:

Dr. Diego E. KASSUHA (IMBECU CONICET, UCCuyo)

Dra. Ariana ZOPPI (UNITEFA CONICET, UNC)

Dr. Alfio Ariel ZAMBÓN (CRIDECIT FCNyCS-UNPSJB)

Lugar de Trabajo:

Departamento de Farmacia GQM-CRIDECIT, FCNyCS, UNPSJB



*“Nunca abandones un sueño
solo por el tiempo que te llevará lograrlo.
El tiempo pasará de todas formas.”*

Earl Nightingale

A mi abuela Ascención, que era conocida como SUSANA.

AGRADECIMIENTOS

Contra todo pronóstico, este sueño llegó a su fin. Siempre supe que concluiría esta etapa, porque en mi casa la ley fue siempre clara: lo que se empieza, se termina.

Por el medio pasaron los años, específicamente diez, en los que formé mi familia y crecí tanto profesional como laboralmente. Llegó el momento de cerrar esta etapa pendiente, y no puedo hacerlo sin expresar mi profundo agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer especialmente a mi directora de tesis, la Dra. Graciela Pinto Vitorino. Sin ella, nada de esto habría sido posible. A lo largo de este camino encontré en Graciela una guía fundamental, alguien en quien confiar y apoyarme, cuya generosidad y compromiso me acompañaron siempre. Recuerdo que en una clase descubrí una frase que me hizo reflexionar:

"Dime y lo olvido, enséñame y lo recuerdo, involúcrame y lo aprendo."

Benjamín Franklin.

Cada vez que la veo, pienso en Graciela, porque como buena profesora, no solo me enseñó, sino que me involucró activamente en su proyecto de investigación, haciendo que el aprendizaje fuera significativo y transformador. Por todo lo aprendido y el apoyo constante, estaré eternamente agradecida.

También quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi codirectora de tesis, la Dra. María Rosa Mazzieri, por su incondicional apoyo, sus acertadas correcciones y por ser una guía invaluable en este recorrido. Su dedicación y acompañamiento fueron esenciales para alcanzar esta meta.

A mis padres, que desde siempre me inculcaron el valor del estudio y me enseñaron que nunca hay que bajar los brazos, sino seguir adelante y superar cada obstáculo en la búsqueda de los objetivos deseados.

A mi esposo, mi memo, que siempre estuvo presente con palabras de aliento, brindándome el apoyo incondicional que necesitaba.

A mi hermano, mi familia y amigas, que con su compañía y mensajes de ánimo iluminaron los días más difíciles.

A Rosalía, mi gran compañera y amiga de laboratorio, por su generosidad y apoyo constante.

A mis compañeros de proyecto de investigación, Marcelo, Fernando y Carla, por el valioso intercambio de conocimientos y el trabajo en conjunto que hicieron de esta experiencia algo enriquecedor y colaborativo.

A Fabio y Pablo por su ayuda invaluable en la realización de este trabajo.

Al Dr. Octavio Fandiño y a la Dra. Norma Sperandeo de la Universidad de Córdoba, que me recibieron en su lugar de trabajo, me ayudaron y enseñaron.

A la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, a la Secretaría de Investigación y Posgrado y al Departamento de Farmacia, por brindarme el espacio y las herramientas necesarias para llevar a cabo esta investigación.

Al CONICET y a la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la provincia de Chubut, por el apoyo institucional que hizo posible el desarrollo de este trabajo.

Y en especial, a mis hijos, Joaquín y Valentina. A ustedes les debo mis más sinceras disculpas por el tiempo que les robé y la paciencia infinita que tuvieron conmigo. Los amo con todo mi corazón y mi alma, y este logro también es de ustedes.

Gracias a todos los que de alguna manera formaron parte de este camino, porque sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	7
RESUMEN	10
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN	12
1.1. INTRODUCCIÓN	13
1.2. FÁRMACOS EN SOLUCIÓN E INTERACCIÓN CON SOLVENTES	15
1.2.1. Espectroscopía UV-Vis	15
1.2.2. Estudio Termocrómico	16
1.2.3. Estudio Solvatocrómico	17
1.3. GENERALIDADES DE SÓLIDOS	18
1.3.1. Sólidos Amorfos	19
1.3.2. Sólidos Cristalinos	19
1.3.3. Polimorfos	20
1.3.4. Derivados No Covalentes	21
1.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS SÓLIDOS FARMACÉUTICOS	27
1.4.1. Caracterización morfológica	27
1.4.2. Estudio de propiedades térmicas	27
1.4.3. Caracterización molecular por métodos espectroscópicos	31
1.4.4. Determinación de estructuras cristalinas	32
1.5. PROPIEDADES BIOFARMACÉUTICAS	33
1.5.1. Coeficiente de partición	33
1.5.2. Solubilidad y velocidad de disolución	34
1.6. CONCLUSIONES	36
1.7. BIBLIOGRAFÍA	36
Capítulo 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	44
2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	45
2.2. OBJETIVO GENERAL	47

2.3. OBJETIVOS PARTICULARES	47
2.4. SELECCIÓN DE LOS IFA	47
2.5 BIBLIOGRAFÍA	50
Capítulo 3: FLUORQUINOLONAS	53
3.1. INTRODUCCIÓN	54
3.2. DESCUBRIMIENTO DE LAS QUINOLONAS	54
3.3. CLASIFICACIÓN	55
3.3.1. Primera generación	56
3.3.2. Segunda generación	56
3.3.3. Tercera generación	57
3.3.4. Cuarta generación	57
3.3.5. Nuevas generaciones	57
3.4. MECANISMO DE ACCIÓN	58
3.5. RESISTENCIA BACTERIANA A LAS FLUORQUINOLONAS.....	61
3.6. RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA- ACTIVIDAD BIOLÓGICA	62
3.6.1. Farmacóforo	62
3.6.2. Influencia de la sustitución en las diferentes posiciones del Farmacóforo	63
3.7 NORFLOXACINO Y CIPROFLOXACINO	65
3.7.1. Estructura Química.....	65
3.7.2. Propiedades Fisicoquímicas.....	65
3.7.3. Comportamiento ácido-base	65
3.7.4. Solubilidad	66
3.8. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS.....	68
3.9. EFECTOS ADVERSOS – TOXICIDAD	68
3.10. ESPECTRO ANTIMICROBIANO – APLICACIONES TERAPÉUTICAS.....	69
3.11. CONCLUSIONES.....	71
3.12. BIBLIOGRAFÍA	71
Capítulo 4: SULFONAMIDAS ANTIBACTERIANAS	75
4.1. INTRODUCCIÓN	76
4.2. DESCUBRIMIENTO DE LAS SULFONAMIDAS	77

4.3. MECANISMO DE ACCIÓN	78
4.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA A LAS SULFONAMIDAS	80
4.5. CLASIFICACIÓN	81
4.6. RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA- ACTIVIDAD BIOLÓGICA	82
4.6.1 Farmacóforo	82
4.6.2. Influencia de la sustitución en las diferentes posiciones del farmacóforo.....	82
4.7. SULFANILAMIDA Y SULFAMETOXAZOL	83
4.7.1. Estructura Química.....	83
4.7.2. Comportamiento ácido base.....	84
4.7.3. Solubilidad	84
4.8. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS.....	85
4.9. ESPECTRO ANTIMICROBIANO – APLICACIONES TERAPÉUTICAS.....	86
4.10. EFECTOS ADVERSOS – TOXICIDAD	88
4.10.1 Efecto toxicológico.....	88
4.10.2 Efecto ambiental.....	88
4.11. CONCLUSIONES.....	89
4.12. BIBLIOGRAFÍA	89
Capítulo 5: CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE NOR Y SMX	92
5.1. INTRODUCCIÓN	93
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	95
5.2.1. Control de Materia Prima Comercial y Material de Referencia.....	95
5.2.2. Calibrado de equipos y materiales, entrenamiento del personal	96
5.2.3. Preparación de soluciones estándar	96
5.2.4. Realización de curvas de calibración	97
5.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO	97
5.3.1. Linealidad	97
5.3.2. Límite de detección y Límite de cuantificación	98
5.3.3. Rango Lineal y Dinámico.....	99
5.3.4. Precisión.....	99
5.3.5. Especificidad	100

5.3.6. Exactitud.....	101
5.4. RESULTADOS	102
5.4.1. Espectros de Absorción.....	102
5.4.2. Validación del método	103
5.5. CONCLUSIÓN	110
5.6. BIBLIOGRAFÍA	110
Capítulo 6: FLUORQUINOLONAS Y SULFONAMIDAS EN SOLUCIÓN	113
6.1. INTRODUCCIÓN	114
6.1.1. Espectroscopía UV-Vis.....	114
6.1.2. Termocromismo.....	115
6.1.3. Solvatocromismo	115
6.1.4. Solvatación preferencial	119
6.2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS DE ESTUDIOS DE INTERACCIONES ENTRE FLUORQUINOLONAS EN SOLUCIÓN.....	121
6.3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS DE ESTUDIOS DE INTERACCIONES ENTRE SULFONAMIDAS EN SOLUCIÓN	122
6.4. MATERIALES Y MÉTODOS	122
6.4.1. Espectrofotometría UV-Visible: Efecto del aumento de concentración.....	122
6.4.2. Estudio Termocrómico.....	123
6.4.3. Estudio Solvatocrómico	124
6.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	129
6.5.1. Fluorquinolonas en solución.....	129
6.5.2. Sulfonamidas en solución.....	142
6.5.3. Mezclas de FQ-SA en solución	152
6.6. CONCLUSIONES.....	163
6.7. BIBLIOGRAFÍA	164
Capítulo 7: ESTUDIO DEL ESTADO SÓLIDO	168
7.1. INTRODUCCIÓN	170
7.2. REPORTES DEL ESTADO SÓLIDO DE NOR.....	172
7.2.1. Polimorfos y fase amorfa de NOR	172
7.2.2. Hidratos y Solvatos de NOR.....	172

7.2.3. Sales de NOR.....	173
7.2.4. Cocristales de NOR.....	174
7.2.5. NOR con metales	174
7.3. ESTADO SÓLIDO DE CIPROFLOXACINO	175
7.3.1. Polimorfos de CIP.....	175
7.3.2. Hidratos y Solvatos de CIP.....	175
7.3.3. Sales de CIP	176
7.3.4. Cocristales de CIP.....	177
7.3.5. CIP con metales	177
7.4. ESTADO SÓLIDO DE SULFANILAMIDA.....	177
7.4.1. Polimorfos de SNA	178
7.4.2. Hidratos y Solvatos de SNA	179
7.4.3. Sales de SNA	179
7.4.4. Cocristales de SNA	179
7.4.5. SNA con metales.....	179
7.5. ESTADO SÓLIDO DE SULFAMETOXAZOL.....	179
7.5.1. Polimorfos de SMX.....	179
7.5.2. Hidratos y Solvatos de SMX.....	179
7.5.3. Sales de SMX.....	180
7.5.4. Cocristales de SMX.....	180
7.5.5. SMX con metales	180
7.6. MATERIALES Y MÉTODOS	181
7.6.1. Técnicas utilizadas en la identificación y Caracterización	181
7.6.2. Procedimiento para la identificación y determinación de pureza de IFA y COF	183
7.6.3. Obtención de nuevas formas sólidas.....	184
7.6.4. Métodos de caracterización de sólidos multicomponentes.....	189
7.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	191
7.7.1. Identificación de los diferentes polimorfos.....	191
7.7.2. Análisis de los sólidos multicomponentes obtenidos	205
7.8. CONCLUSIÓN	224

7.7. BIBLIOGRAFÍA	225
Capítulo 8: OPTIMIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOFARMACÉUTICAS	237
8.1. INTRODUCCIÓN	238
8.2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS DE FLUORQUINOLONAS	239
8.3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS DE SULFONAMIDAS ANTIBACTERIANAS.....	240
8.4. MATERIALES Y MÉTODOS	240
8.4.1. Determinación del logaritmo del Coeficiente de Partición aparente	240
8.4.2. Solubilidad en equilibrio.....	241
8.4.3. Velocidad de disolución.....	242
8.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	243
8.5.1. Determinación del log P_{ap}	243
8.5.2. Solubilidad en equilibrio.....	245
8.5.3. Velocidad de disolución.....	248
8.6. CONCLUSIONES.....	252
8.7. BIBLIOGRAFÍA	252
Capítulo 9: CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.....	257
9.1. CONCLUSIONES.....	257
9.2. PROYECCIONES	259
ANEXO	260
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	269
ÍNDICE DE FIGURAS.....	273
ÍNDICE DE TABLAS.....	279

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A₀	Propiedad del soluto a correlacionar
AB	Antibacterianos
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
A_f	Absorbancia de la fase acuosa después de la partición
A_i	Absorbancia de la fase acuosa antes de la partición
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
ANT	Ácido Antranílico
ASP	Área de Superficie Polar
AT	Análisis Térmico
ATD	Análisis Térmico Diferencial
ATM	Análisis Termomecánico
BD	Biodisponibilidad
BP	Farmacopea Británica
ButOH	n-Butanol
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
CCDC	Cambridge Crystallographic Data Center
CCI	Cocristales Iónicos
CCM	Cocristales Moleculares
CIP	Ciprofloxacino
CIT	Ácido Cítrico anhidro
CV	Coefficiente de Variación
Cy	Ciclohexano
DHFR	Dihidrofolato Reductasa
DHPS	Dihidropteroato Sintasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNC	Derivado No Covalente
DRIFT	Espectroscopía Infrarroja de Reflectancia Difusa con Transformada de Fourier (del inglés <i>Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy</i>)
DRX	Difracción de Rayos X
DRXM	Difracción de Rayos X de Monocristal
DRXP	Difracción de Rayos X de Polvo
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido (del inglés <i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DTG	Análisis Termogravimétrico Derivado (del inglés <i>Derivative Thermogravimetric Analysis</i>)
E₁₂	Energía de transición
EA	Efectos Adversos
EP	Farmacopea Europea
ES	Espectrometría de Masas
E_T	Energía de transición molar
EtOH	Etanol
FA	Farmacopea Argentina
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos (del inglés <i>Food and Drug Administration</i>)
FE	Fase Estacionaria
FM	Fase Móvil
FQ	Fluorquinolonas
FT-IR	Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (del inglés <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GRAS	Sustancias generalmente reconocidas como seguras (del inglés <i>Generally Regarded As Safe</i>)
h	Hora

Hex	n-Hexano
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
HPLC-MS	Cromatografía Líquida de Alto Eficacia con la espectrometría de masas (del inglés <i>High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>)
HSM	Microscopia de Platina Calentable (del inglés <i>Hot Stage Microscopy</i>)
ICH	Conferencia Internacional sobre armonización (del inglés <i>International conference on harmonisation</i>)
IFA	Ingrediente Farmacéutico Activo
IR	Infrarrojo
ITU	Infecciones del Tracto Urinario
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (del inglés <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LAG	Molienda asistida por solvente (del inglés <i>Liquid-assisted grinding</i>)
LD	Límite de Detección
Log P	Logaritmo del coeficiente de Partición
Log P_{ap}	Logaritmo del coeficiente de Partición aparente
LQ	Límite de Cuantificación
X^L_{svte}	Fracción molar del solvente en la región cibotáctica
M	Concentración Molar
MAL	Ácido DL Málico
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
MeOH	Metanol
MF	Mezcla Física
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
MLP	Microscopía de Luz Polarizada
MO	Microscopía Óptica
MPC	Materia Prima Comercial
MPP	Materia Prima Procesada
n.s.	no soluble
NEC	Nuevas Entidades Químicas
NIC	Nicotinamida
NOR	Norfloxacino
OcOH	1-Octanol
OMS	Organización Mundial de la Salud
PABA	Ácido p-aminobenzoico
PF	Punto de Fusión
pKa	Log de la constante de disociación ácida
PM	Peso molecular
PrOH	1-Propanolol
QSAR	Relaciones cuantitativas estructura actividad (del inglés <i>Quantitative structure activity relationship</i>)
R²	Coefficiente de determinación
REA	Relación Estructura Actividad
RL	Rango Lineal
RLEL	Relaciones Lineales de Energía Libre
RLES	Relaciones Lineales de Energía de Solventes
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
¹³C-RMN-ES	Resonancia Magnética Nuclear en Estado Sólido de Carbono 13
¹H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear protónica
SA	Sulfonamidas Antibacterianas
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a la Meticilina
Sc.	Solución
SCB	Sistema de Clasificación Biofarmacéutico
SMX	Sulfametoxazol
SNA	Sulfanilamida
SPr	Solvatación Preferencial
Std.	Estandar
Svte.	Solvente

χ_{svte}	Fracción molar del solvente
TART	Acido L+ tartárico
T°	Temperatura
TF	Temperatura de fusión
TG	Termogravimetría
T_{ie}	Temperatura de inicio extrapolada
TMA	Análisis termomecánico (del inglés <i>Thermomechanical Analysis</i>)
TMP	Trimetroprima
T_p	Temperatura de pico
USP	Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (del inglés <i>United States Pharmacopeia</i>)
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta- Visible
V_{ac}	Volumen de la fase acuosa
V_{oct}	Volumen de la fase octanólica
Vol	Volumen
β	Velocidad de calentamiento
ΔH	Cambio de entalpía
λ	Longitud de onda
μ	Fuerza iónica
μD	Momento Dipolar
ν	Número de onda

RESUMEN

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue optimizar las propiedades biofarmacéuticas y farmacéuticas de Fluorquinolonas (FQ) y Sulfonamidas Antibacterianas (SA), utilizando las posibilidades que ofrece la ingeniería de cristales y la química supramolecular, se optó por abordar la formación de cocristales farmacéuticos dado que constituye un área emergente, de importancia tecnológica estratégica y en pleno proceso de crecimiento. Para ello se trabajó con las FQ, Norfloxacin (NOR) y Ciprofloxacino (CIP), que se eligieron por su importancia farmacológica, sumado a que son compuestos que han sido objeto de varios estudios dada su relevancia en términos de aplicaciones y la necesidad de mejorar algunas de sus propiedades, concretamente la baja solubilidad acuosa y permeabilidad. Se optó, además, por las SA, Sulfanilamida (SNA) y Sulfametoxazol (SMX) por su conocida capacidad como Coformadores (COF) de cristales, así como su potencial como agente antibacteriano.

Con la finalidad de exponer los resultados obtenidos en el transcurso de la Tesis, la presentación se organizó de la siguiente manera:

En el **Capítulo 1** se describen los desafíos actuales en el diseño y desarrollo de fármacos, la relevancia del estado sólido de los mismos y su manejo, a través de la creación de nuevas formas sólidas multicomponentes. Además, se resumen las generalidades del estado sólido y las técnicas empleadas en la tesis para identificación y caracterización de los Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA), COF y sólidos multicomponentes. Por último, se presenta una breve explicación de las propiedades biofarmacéuticas.

En el **Capítulo 2** se presentan los objetivos y la hipótesis planteada en este trabajo de Tesis Doctoral.

En el **Capítulo 3** se describen las generalidades de las FQ respecto al descubrimiento, clasificación, mecanismo de acción, relaciones estructura-actividad, propiedades farmacocinéticas, efectos adversos, toxicidad, espectro antibacteriano y usos terapéuticos. Se particularizó en la descripción de NOR y CIP.

En el **Capítulo 4** se describen las generalidades de las SA abordando los mismos ítems que los enumerados para FQ. Se particularizó en la descripción de SNA y SMX.

En el **Capítulo 5** se describe la validación del método de espectrofotometría UV-Vis de derivadas para la cuantificación simultánea de FQ y SA, particularmente NOR y SMX.

En el **Capítulo 6** se analizan las interacciones intra e intermoleculares que establecen los IFA en estudio. Dentro de estas últimas se estudian las interacciones entre IFA-IFA e IFA-solvente o mezcla de solventes.

En el **Capítulo 7** se describe el diseño, desarrollo y caracterización de los sólidos multicomponentes obtenidos.

En el **Capítulo 8** se informan los ensayos desarrollados para evaluar las propiedades biofarmacéuticas de los sistemas multicomponentes seleccionados.

En el **Capítulo 9** se exponen las conclusiones generales y las proyecciones del trabajo.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES	13
1.2. FÁRMACOS EN SOLUCIÓN E INTERACCIÓN CON SOLVENTES	15
1.2.1. Espectroscopía UV-Vis.....	15
1.2.2. Estudio Termocrómico.....	16
1.2.3. Estudio Solvatocrómico	17
1.3. GENERALIDADES DE SÓLIDOS	18
1.3.1. Sólidos Amorfos	19
1.3.2. Sólidos Cristalinos.....	19
1.3.3. Polimorfos	20
1.3.4. Derivados No Covalentes.....	21
1.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS SÓLIDOS FARMACÉUTICOS	27
1.4.1. Caracterización morfológica	27
1.4.2. Estudio de propiedades térmicas	27
1.4.3. Caracterización molecular por métodos espectroscópicos.....	31
1.4.4. Determinación de estructuras cristalinas.....	32
1.5. PROPIEDADES BIOFARMACÉUTICAS.....	33
1.5.1. Coeficiente de partición	33
1.5.2. Solubilidad y velocidad de disolución	34
1.6. CONCLUSIONES.....	36
1.7. BIBLIOGRAFÍA	36

1.1. GENERALIDADES

En la actualidad, se emplean en terapéutica un gran número de medicamentos en estado sólido, constituidos por Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA) y excipientes sólidos que integran una forma farmacéutica, por ejemplo, comprimidos, cápsulas y grageas entre otras. Los sólidos proporcionan un formato conveniente, compacto y generalmente estable para almacenar un IFA. Comprender y controlar la química del estado sólido de los IFA, es un aspecto importante del proceso de desarrollo de medicamentos. Los IFA pueden existir en una variedad de formas sólidas distintas, incluidos polimorfos, solvatos, hidratos, sales, cocristales y sólidos amorfos (Morissette et al., 2004).

Para los fármacos con escasa solubilidad acuosa, la velocidad a la que se disuelven (velocidad de disolución) suele ser el paso más lento y, por lo tanto, ejerce un efecto limitante en su Biodisponibilidad (BD) (Fael et al., 2021). La eficacia limitada de la solubilidad de la formulación es un obstáculo importante para la industria farmacéutica. Más del 80 % de los IFA se administran por vía oral; el 40% de los medicamentos que se comercializan y el 90 % de las nuevas entidades en el sector farmacéutico presentan baja solubilidad (Gunnam et al., 2023). Las sustancias con solubilidad acuosa limitada suelen ser el objetivo de diversas investigaciones porque exhiben una disolución lenta en fluidos biológicos, una exposición sistémica insuficiente y una eficacia reducida en los pacientes (Gomes et al., 2023). Para superar este problema se han desarrollado diversas estrategias, estas incluyen el cambio de la forma cristalina (polimorfos, hidratos, etc.), la formación de una fase amorfa, la formación de sales, la formulación de dispersiones sólidas con polímeros hidrófilos, la inclusión en complejos con ciclodextrinas, los nanocristales, las formulaciones autoemulsificantes o la encapsulación de soluciones orgánicas (Byrn, 1999; Fael et al., 2022; Liu et al., 2020; Thakuria et al., 2013). Uno de los enfoques más recientes en la industria es la formulación de sólidos farmacéuticos multicomponentes, tales como cocristales y sales moleculares. La ingeniería de cristales reconoce y diseña sintones con el objetivo de un rápido desarrollo de cocristales, procurando mejorar las propiedades del IFA sin afectar su estructura y funciones intrínsecas.

En particular, la formación de cocristales farmacéuticos constituye un área emergente, de importancia tecnológica estratégica y en pleno proceso de crecimiento. Los cocristales son materiales cristalinos estructuralmente homogéneos formados por

al menos dos compuestos neutros que se encuentran en cantidades estequiométricas definidas y son sólidos a temperatura ambiente (Gomes et al., 2023). Están formados por un IFA iónico o molecular y una o más sustancias sólidas llamadas Coformadores (COF), los que se unen en el retículo cristalino por interacciones no covalentes (Shan et al., 2014). La generación de cocrystal requiere del análisis estructural del IFA y de los grupos funcionales capaces de establecer interacciones con los COF (Saucedo-Balderas et al., 2014). Con frecuencia, aunque no exclusivamente, se emplean como COF excipientes o sustancias seguras para uso humano como aditivos en alimentación (GRAS por sus siglas en inglés, *Generally Recognized as Safe*) una lista de las cuales ha sido publicada por la Administración de Medicamentos y Alimentos de EEUU (FDA por sus siglas en inglés, *Food and Drug Administration*) (Desiraju, 2013). Todas estas actividades demandan tanto tecnologías emergentes como tradicionales.

Los Antibacterianos (AB) son una amplia categoría de IFA, dentro de los antibióticos, que tienen la capacidad de detener el crecimiento bacteriano o matar bacterias. Se clasifican por mecanismo de acción, espectro de actividad o estructura química. Al igual que otros IFA, la mayoría de los AB presentan problemas de solubilidad, absorción y estabilidad, además de aumentar la capacidad de desarrollar resistencia por parte de las bacterias. Debido al mal uso de antibióticos para tratar infecciones bacterianas en humanos, así como en animales y plantas, es necesaria una búsqueda urgente de formas de superar la resistencia microbiana. Es por ello, que las investigaciones actuales se orientan tanto a desarrollar nuevas moléculas como a la manipulación de moléculas de antibacterianos ya conocidas. La ingeniería de cristales se ha aplicado a los AB para superar los problemas mencionados anteriormente, al convertir la molécula AB en sal, hidrato, solvato, cocrystal o incluso utilizando diferentes polimorfos (Bashimam et al., 2022).

Los IFA seleccionados para el presente estudio son Fluorquinolonas (FQ) y Sulfonamidas Antibacterianas (SA), ambas de origen sintético. Las FQ: Norfloxacin (NOR) y Ciprofloxacino (CIP), son antibióticos de amplio espectro que se emplean en terapéutica ampliamente para tratar infecciones bacterianas (O'Malley et al., 2022). Poseen probada eficacia terapéutica, presentan rápida acción bactericida, amplio espectro, buena penetración tisular, aceptable BD y efectos adversos tolerables. Se utilizan principalmente para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio, urinario, de piel, de tejidos blandos y septicemia (Jacobi et al., 2012). Estas cualidades explican el hecho de que constituyan, en la actualidad, uno de los grupos de antimicrobianos de mayor prescripción, tanto en humanos como en veterinaria. Dada su naturaleza zwitteriónica, presentan baja solubilidad a pH fisiológico.

Las SA se utilizan en medicina humana y veterinaria, aunque en algunos casos sean fármacos de segunda elección. La solubilidad limitada de las SA influye negativamente en su eficacia, mientras que pueden producirse efectos adversos, toxicidad y resistencia debido a una administración excesiva, hechos que pueden minimizarse empleando estrategias que permitan utilizar dosis menores (por ejemplo, combinaciones de SA) (Fischbach, 2011; Pogue et al., 2011; Wang et al., 2021). Hoy en día, las SA se usan debido a su actividad de amplio espectro, su costo reducido y su fácil acceso, constituyendo compuestos de elección para ser modificados en pos de mayor solubilidad y actividad (Wang, et al. 2021). La Sulfanilamida (SNA) es el prototipo de este grupo farmacológico. El Sulfametoxazol (SMX) es el más empleado debido a su acción eficiente frente a infecciones bacterianas comunes (respiratorias, urinarias y dérmicas) y también a las oportunistas en pacientes con SIDA (Ahmad et al., 2013).

Para abordar el análisis del estado sólido de los aductos producidos en esta Tesis Doctoral, se propone inicialmente examinar las interacciones entre IFA-IFA e IFA-solvente en solución, con el objetivo de identificar las posibles interacciones que se pueden establecer entre los grupos funcionales (posibles formadores de sintones), tal como se detalla en el **Capítulo 6**. Por lo tanto, se hizo imprescindible, en primera instancia, validar un método analítico para la cuantificación de los pares de IFA estudiados en solución, seleccionando para ello la espectrofotometría UV-Vis de derivada de primer orden (**Capítulo 5**). Luego se procedió a la obtención de los sólidos multicomponentes y su caracterización (**Capítulo 7**), y por último se seleccionaron los sólidos multicomponentes con mejores resultados para realizar ensayos de propiedades biofarmacéuticas (**Capítulo 8**).

1.2. ANÁLISIS DE LOS FÁRMACOS EN SOLUCIÓN E INTERACCIÓN CON SOLVENTES

1.2.1. ESPECTROSCOPÍA UV-VIS

Todos los átomos y moléculas son capaces de absorber energía, de acuerdo con ciertas limitaciones, las cuales dependen de la estructura de la sustancia. La energía se puede proporcionar en forma de radiación electromagnética (luz). El tipo y cantidad de radiación absorbida por una molécula guarda relación con la estructura de la molécula; la cantidad de radiación absorbida depende del número de moléculas que interaccionan con la radiación. El estudio de estas dependencias se conoce como

Espectroscopía de Absorción. Indudablemente es una de las técnicas analíticas más útiles, sus ventajas incluyen rapidez, sencillez, especificidad y sensibilidad (Volonté, 2013).

En la tesis se utilizó la Espectroscopía UV-Vis como método de cuantificación y para estudiar la asociación molecular. Se midió la absorción de soluciones de los IFA en un intervalo espectral comprendido entre 200 y 400 nm. En el caso de la cuantificación de los IFA, se realizaron las respectivas curvas de calibrado. Para la cuantificación de los sólidos multicomponentes se utilizó la Espectroscopía de derivadas de primer orden, en donde los picos y valles de un espectro de orden (n-1), se transforman en ceros en el espectro de orden (n), mientras que, por otra parte, los puntos de inflexión de un espectro de orden (n-1) se transforman en máximos y mínimos del espectro de orden (n). Esta técnica consiste en medir la amplitud de uno de los componentes en la mezcla, mientras el otro no da señal a la longitud de onda de trabajo y en ese orden de derivada y luego medir el otro componente a la inversa, este procedimiento se denomina de ceros cruzados.

1.2.2. ESTUDIO TERMOCRÓMICO

El **termocromismo** es una transformación reversible de una estructura molecular o de un sistema que se produce como resultado de cambios en la temperatura de una solución y que provoca una variación espectral (McNaught et al., 2003). Entre muchos factores, los dos que determinan la forma y el ancho de cada banda espectral son el efecto Doppler y el efecto de colisión. Ambos son el resultado del movimiento caótico de las moléculas, que depende directamente de la temperatura. A medida que aumenta la temperatura, aumenta la dispersión de las velocidades moleculares, así como el número total de colisiones y ello se ve reflejado en un ensanchamiento térmico de la banda espectral. Debido al calentamiento o al enfriamiento, el entorno cercano y lejano de las moléculas en cuestión evoluciona y, por lo tanto, la energía y el carácter de las interacciones de corto y largo alcance varían, lo que da lugar al desplazamiento de los máximos de banda. Este fenómeno se conoce como desplazamiento termocrómico. La tendencia habitual para las moléculas que no interactúan específicamente con un disolvente (u otras moléculas presentes en una solución) es un aumento de la energía de transición de los electrones con el aumento de la temperatura. Se observa entonces el “desplazamiento azul” inespecífico de las bandas de absorción, causado por la disminución de la permitividad ϵ y del índice de refracción n (Kalka et al., 2021).

1.2.3. ESTUDIO SOLVATOCRÓMICO

El solvente juega un papel importante en los procesos físicos y químicos, y en este marco, las interacciones entre el disolvente y las moléculas del soluto son responsables del cambio en varias propiedades como la geometría molecular, estructura electrónica y momento dipolar del soluto. Estas interacciones afectan el espectro de absorción electrónica del soluto y el fenómeno se conoce como **solvatocromismo** (Almondoz et al., 2014). Los desplazamientos solvatocrómicos son indicativos de interacciones entre el solvente y el soluto en la proximidad inmediata del soluto. Esta región se denomina región cibotáctica del soluto. Las interacciones se pueden clasificar en: (1) interacción soluto-disolvente no específica causada por efectos de polaridad-polarizabilidad y (2) interacción soluto-disolvente específica generada por enlaces de puente de hidrógeno o interacciones de tipo donador-aceptor de electrones.

Los métodos más ampliamente utilizados para estudiar las interacciones soluto-disolvente son los estudios espectrales de absorción óptica y emisión de fluorescencia ya que los cambios de los máximos de absorción/fluorescencia se deben a las interacciones soluto-disolvente. Actualmente, existe un gran número de escalas empíricas de disolventes monoparamétricas y multiparamétricas desarrolladas para describir y cuantificar las interacciones soluto-disolvente a nivel molecular. De todas ellas, en este trabajo utilizamos la escala solvatocrómica empírica de Kamlet y Taft, la de Catalán y la de Laurence. En estos métodos se utilizan parámetros empíricos, como por ejemplo el máximo de absorción al UV-Vis de una solución de la sustancia en estudio, para cuantificar interacciones específicas y diferenciarlas de las interacciones no específicas. El efecto de la dipolaridad/polarizabilidad del disolvente y los enlaces de hidrógeno en los cambios espectrales se pueden interpretar mediante relaciones lineales de energía de solvatación (Almondoz et al., 2014). Otra metodología para el estudio de las interacciones soluto-disolvente es el uso de mezclas binarias de disolventes. En las mezclas de disolventes puede observarse un comportamiento muy diferente del soluto respecto a solventes puros y un enriquecimiento preferencial por uno de los componentes del disolvente en la región cibotáctica de un compuesto. El hecho de que la capa de disolvente que rodea al soluto presente una composición molecular distinta a la macroscópica se denomina **solvatación selectiva o preferencial** (Umadevi et al., 2008). El estudio del comportamiento espectral de los fármacos en mezclas de disolventes es particularmente útil para recabar información respecto a la formación de interacciones intra e intermoleculares de los IFA y su entorno.

Esta información es muy valiosa para interpretar los procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos de los IFA, para desarrollar procesos de purificación, realizar estudios de cosolvencia, de cristalización a partir de una solución, de preformulación y de dosificación farmacéutica (Cárdenas et al., 2016).

1.3. GENERALIDADES DE SÓLIDOS

Los sólidos se pueden clasificar, según la estructura interna, en amorfos o cristalinos (**Fig. 1.1**).

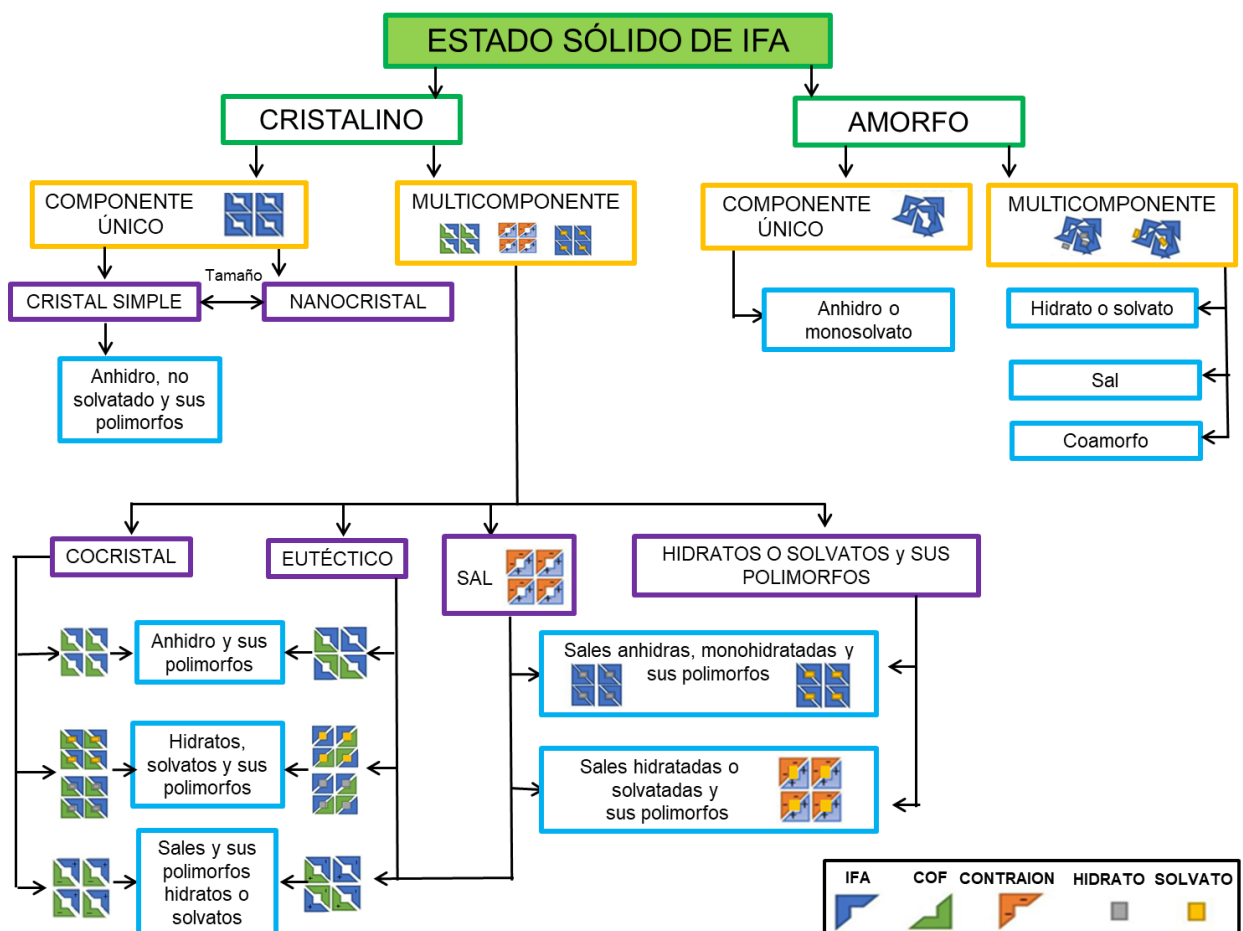


Figura 1.1. Clasificación del estado sólido de IFA en base a su estructura y composición (Adaptado de Aitipamula et al., 2011; Bashimam et al., 2022).

1.3.1. SÓLIDOS AMORFOS

Los sólidos amorfos no contienen ordenamiento espacial a larga distancia, carecen del orden y la simetría translacional-orientacional. Suelen ser más energéticos que los cristalinos y generalmente tienen propiedades diferentes de solubilidad y mayor velocidad de disolución. El aumento de la solubilidad y la disolución puede justificar el uso de IFA amorfos en las formulaciones. Sin embargo, los sólidos amorfos generalmente tienen menos estabilidad física y química, por lo tanto, son menos utilizados en las formulaciones debido a su tendencia a la cristalización y degradación. Los materiales amorfos pueden existir como dispersiones sólidas amorfas: anhidros o solvatos y formas multicomponentes: anhidro, solvato o coamorfos (Prado, 2015; Shaikh et al., 2018).

1.3.2. SÓLIDOS CRISTALINOS

Los sólidos cristalinos son aquellos en los que los átomos, iones o moléculas tienen una disposición periódica, es decir, que se repite regularmente en tres dimensiones. Están formados por celdas unitarias que consisten en la unidad estructural básica, y el apilamiento de estas células mediante repeticiones traslacionales conforman el cristal. Las dimensiones de la celda unitaria se pueden caracterizar mediante parámetros de red, que son tres ejes cristalográficos, a , b y c , y los ángulos entre los ejes, α , β , γ . Estos parámetros describen la forma y el tamaño de la celda unitaria (**Figura 1.2**) (Prado, 2015). Cada cristal se puede clasificar como miembro de uno de los siete posibles sistemas cristalinos o clases de cristales que se definen por las relaciones entre las dimensiones individuales, a , b y c , de la celda unitaria y entre los ángulos individuales de la celda unitaria (Vippagunta et al., 2001). Estos sistemas pueden ser: cúbicos, tetragonales, ortorrómbicos, hexagonales, monoclinicos, triclinicos y romboédricos.

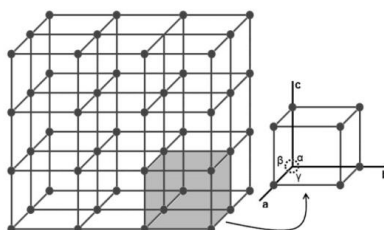


Figura 1.2. Representación esquemática de la red cristalina y la celda unitaria (Vippagunta et al., 2001).

Las formas cristalinas se pueden subdividir en compuestos de un solo componente y de múltiples componentes, ambos tipos pueden formar diferentes estructuras, y a su vez estas estructuras pueden presentar diferentes polimorfos. Los sólidos cristalinos multicomponentes contienen al menos dos moléculas dentro de la estructura de la red cristalina y pueden ser hidratos (IFA y agua), solvatos (IFA y disolvente orgánico), cocristales (IFA y COF) o sales cristalinas (IFA ionizado y contraión). Proporcionan propiedades físicas que son significativamente diferentes de las de sus homólogos de un solo componente que pueden influir significativamente en la BD, estabilidad, higroscopicidad y compactación del fármaco (Shaikh et al., 2018). En la actualidad, las patentes especifican: sales, solvatos, cocristales y complejos, además de sistemas de un solo componente, como polimorfos, para un IFA determinado (Kavanagh, 2024).

1.3.3. POLIMORFOS

Los polimorfos son formas cristalinas en las que el mismo compuesto químico o la asociación de dos componentes, pueden existir en dos o más disposiciones diferentes de la molécula de ese compuesto en estado sólido. Las fases amorfas y los productos de solvatación o hidratación, a veces conocidos como pseudopolimorfos, pueden entrar en esta categoría (Tupe et al., 2023). Tienen propiedades físicas distintas entre sí, aunque la magnitud de esta diferencia suele ser pequeña. También muestran una jerarquía de estabilidad, donde la estructura de energía libre más baja es la más estable y, por tanto, la menos soluble de los posibles polimorfos.

El polimorfismo puede ser una oportunidad, pero también un problema. De hecho, diferentes polimorfos de un IFA determinado tienen diferentes propiedades físicas y químicas, lo que puede provocar cambios en la solubilidad, estabilidad, disolución, BD y eficacia final de los fármacos. Por ello, el polimorfismo es especialmente estudiado en el caso de los IFA y su importancia está ampliamente reconocida tanto desde el punto de vista académico como industrial (Guerain, 2020).

Según las diferencias en las propiedades termodinámicas, los polimorfos se clasifican como enantiótropos o monótropos, dependiendo de si una forma puede transformarse reversiblemente a otra o no. En un sistema enantiotrópico, una transición reversible entre polimorfos es posible, se observa como temperatura por debajo del Punto de Fusión (PF). En un sistema monotrópico, no se observa ninguna transición reversible (por debajo del PF). Una vez que está definido si el polimorfo es enantiotrópico o monotrópico, entonces el siguiente objetivo es definir el dominio

termodinámicamente estable o metaestable de cada fase cristalina de una sustancia en función de temperatura (Vippagunta et al., 2001).

1.3.4. DERIVADOS NO COVALENTES

Un Derivado No Covalente (DNC), se forma cuando una (o más) molécula(s) coformadora(s) se incorporan a la matriz de la molécula objetivo mediante fuerzas no covalentes. Estas pueden incluir fuerzas iónicas y de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, interacciones lipofílicas-lipófilas e interacciones π - π . Los DNC se autoensamblan de acuerdo con el reconocimiento molecular mutuo basado en la topografía cooperativa de los COF. Suelen mostrar diferencias significativas en comparación con sus moléculas originales. Estas diferencias pueden incluir cambios drásticos en la solubilidad, el PF, las propiedades ópticas, la BD o la estabilidad, son un complemento viable y poderoso a las metodologías tradicionales de derivatización sintética para alterar las propiedades físicas de un material. Los solvatos e hidratos, sales, cocristales y eutécticos que caen bajo el paraguas de los DNC (Stoler et al., 2015).

1.3.4.1. *Solvatos e hidratos*

Los hidratos y solvatos son sólidos multicomponentes en los cuales un componente es sólido a temperatura ambiente (IFA) y el otro líquido (agua o disolvente). Se ha estimado que aproximadamente un tercio de las sustancias farmacéuticamente activas son capaces de formar hidratos.

Los hidratos son el tipo más frecuente de compuestos orgánicos solvatados y pueden formarse mediante diferentes relaciones estequiométricas entre el IFA y el agua. La presencia de moléculas de agua afecta las interacciones intermoleculares y el grado de desorden cristalino, impactando en la energía libre, los parámetros termodinámicos, la solubilidad, la velocidad de disolución, la estabilidad del estado sólido y la BD de los IFA hidratados (Pinto Vitorino et al., 2019). La molécula de agua, debido a su pequeño tamaño y su capacidad de formación de enlaces de hidrógeno multidireccionales, puede llenar fácilmente huecos estructurales. La mera presencia de agua en un sistema no es razón suficiente para esperar la formación de hidratos, porque algunos compuestos, aunque son solubles en agua, no forman hidratos. Es la actividad del agua en el medio la que determina si se formará una determinada estructura de hidrato. Se pueden formar solvatos cuando se usa un disolvente orgánico puro o una mezcla de disolventes para cristalizar el compuesto (Bashimam et al., 2022; Vippagunta et al., 2001). La formación de solvatos suele ser indeseable,

especialmente con disolventes que produzcan toxicidad. Los hidratos y los solvatos también pueden presentar diferentes formas polimórficas, fenómeno denominado como solvatomorfismo (Byrn et al., 1999).

1.3.4.2. Sales de uso farmacéutico

Banerjee y col. (2005) definieron a las sales como sistemas de múltiples componentes en los que los protones son trasladados de un ácido a una base en un estado iónico. En las sustancias activas, la sal orgánica farmacéutica se compone de una sustancia activa o intermediaria de síntesis y un contraión apropiado. Las sales orgánicas son posibles de formar ya que gran cantidad de las sustancias activas tienen grupos funcionales de naturaleza ácida o base débil que son ionizables. La conversión de un ácido o base libre a su estado salino es un método frecuentemente empleado en el sector farmacéutico. El hecho de que aproximadamente la mitad de las sustancias activas estén comercializadas en forma de sal indica la importancia de esta forma sólida. La solubilidad de la sustancia activa en medio acuoso es muy importante para la absorción y en la práctica la mayoría de los fármacos no contienen los grupos adecuados para conferir una buena solubilidad en medio acuoso. Es aquí donde la salificación (formación de una sal orgánica) se presenta como una alternativa. La transformación de una sustancia activa en una sal farmacéutica puede impactar en diversos aspectos, como las propiedades fisicoquímicas y especialmente la solubilidad en medio acuoso. A semejanza de otras estructuras, las sales farmacéuticas pueden existir como polimorfos, solvatos, hidratos, etc., que deben ser caracterizadas adecuadamente (Ortiz Lara, 2017).

1.3.4.3. Cocristales farmacéuticos

La ingeniería de cristales comenzó en la década de 1970 con el estudio de las reacciones topoquímicas en estado sólido. En 1989 se publicó una definición química amplia de la ingeniería de cristales y en 1995 se propuso el concepto de sintón supramolecular, seguido por el de heterosintones y sus posibles aplicaciones para el diseño de cocristales farmacéuticos en 2004. La capacidad de un cocrystal para ajustar sistemáticamente las propiedades fisicoquímicas de un fármaco (es decir, solubilidad, permeabilidad, hidratación, color, compactación, BD) sin cambiar su estructura molecular es el sello distintivo y el foco de atención en los cocristales farmacéuticos. El período comprendido entre 2015 y la actualidad ha sido testigo del lanzamiento de varios fármacos de tipo sal-cocrystal con una eficacia mejorada y una alta BD, patentados y comercializados (Bolla et al., 2022).

Hay muchas definiciones de cocrystal que se pueden encontrar en la literatura. La definición más aceptada se ha desarrollado después de un debate que duró varios años, como un material cristalino homogéneo que está formado por dos o más moléculas en cantidades estequiométricas definidas, unidas por fuerzas no covalentes (Desiraju et al., 2013). La FDA define los cocrystal farmacéuticos como "materiales cristalinos compuestos de dos o más moléculas diferentes, típicamente IFA y COF de cocrystal, en la misma red cristalina (Tupe et al., 2023). Debido a que los cocrystal tienen un gran potencial para la industria farmacéutica y a que algunos ya están en el mercado, la FDA ha publicado una guía para la industria sobre la clasificación regulatoria de los cocrystal. Desde una perspectiva regulatoria, los productos farmacéuticos que están diseñados para contener un nuevo cocrystal se consideran análogos a un nuevo polimorfo del IFA. **Un cristal formado por dos o más IFA (con o sin la adición de un COF) será reconocido como un producto farmacéutico con una combinación de dosis fija y no un solo IFA nuevo** (Chakraborty et al., 2022).

Para evaluar qué tipo de COF seleccionar a la hora de desarrollar sólidos multicomponentes se deben considerar los sintones que se pueden formar. Los sintones supramoleculares fueron conceptualizados por primera vez por Desiraju (1995). Estos orientan y controlan la estructura del empaquetamiento de cristales para mejorar las propiedades biofarmacéuticas de fármacos poco solubles sin afectar su respuesta farmacológica. Desiraju (1995) describió los sintones supramoleculares como una disposición espacial de interacciones intermoleculares que sirven como base para cualquier síntesis supramolecular (Tupe et al., 2023). Estos sintones supramoleculares se clasifican como homosintones o heterosintones según los grupos funcionales complementarios en el fármaco y el coformador. Homosintón se refiere a la interacción molecular que ocurre entre dos grupos funcionales iguales presentes en el IFA y su COF, tales como grupos ácido-----ácido y amida-----amida; mientras que heterosintón se refiere a la interacción entre dos grupos funcionales distintos, tales como grupos ácido-----amida, ácido-----piridina y amida-----piridina. Se demostró que el heterosintón es clave para el diseño de sólidos multicomponentes, en los que las interacciones de ensamblaje son típicamente enlaces de hidrógeno (pero también pueden incluir otras interacciones intermoleculares) y, más particularmente, para el diseño de cocrystal farmacéuticos, que son aductos constituidos por un IFA y un COF farmacéuticamente aceptable (Gunnarn et al., 2023). La elección de los sintones se considera una estrategia eficaz y aceptable en el diseño de cocrystal farmacéuticos (Prashar et al., 2023) ya que permite mantener las propiedades farmacológicas de los IFA existentes intactas, mientras se adaptan sus propiedades

fisicoquímicas; como densidad, dureza, índice de refracción, temperatura de fusión, entalpía de fusión, presión de vapor, solubilidad, velocidad de disolución, entre otras (Stahl et al., 2002; Wouters et al., 2012).

Según la naturaleza de los COF, los cocristales se pueden clasificar como Cocristales Moleculares (CCM) o Cocristales Iónicos (CCI) (Chakraborty et al., 2022):

✓ CCM: este tipo de cocrystal se forma con dos o más sólidos y COF neutros principalmente, en una relación estequiométrica. El enlace de hidrógeno es la interacción más abundante encontrada en los CCM, aunque en ciertos casos ocurren interacciones π - π . BetaClor® llegó al mercado por primera vez como un producto de CCM que contienen betaína e hidrato de cloral.

✓ CCI: contienen enlaces de hidrógeno asistidos por carga o enlaces de coordinación que tienen menos probabilidades de verse afectados por los disolventes utilizados. En el caso de los CCI, existen al menos dos variables, mientras que la mayoría de los CCM ofrecen solo una variable y, como resultado, los CCI brindan mayor diversidad que los CCM en términos de composición y propiedades. En esta clasificación se encuentran los cocristales zwitteriónicos. Depakote® es el primer CCI comercializado que se compone de ácido valproico y valproato de sodio.

1.3.4.4. Eutécticos

Los eutécticos son sólidos cristalinos multicomponentes que han sido ampliamente observados en sistemas orgánicos y farmacéuticos, junto con soluciones sólidas y cocristales. En ciertos casos, se han propuesto como intermediarios en la formación de cocristales, siendo las constantes eutécticas de la solución factores clave en la estabilización y formación de estos en solución. Un ejemplo destacado es la composición eutéctica de los anestésicos locales lidocaína y prilocaína, utilizada para mejorar la penetración transdérmica. Las propiedades termodinámicas de los eutécticos, como la energía libre, la entalpía y la entropía, pueden conferir ventajas significativas en términos de solubilidad y disolución, especialmente en fármacos poco solubles, sólidos amorfos y dispersiones sólidas (Cherukuvada y Nangia, 2014).

Los productos eutécticos son el resultado de un delicado equilibrio entre las interacciones moleculares (adhesivas o cohesivas) y los factores de tamaño y forma de los componentes. Cuando las interacciones adhesivas (heteromoleculares) son suficientemente fuertes, se favorece la formación de cocristales, independientemente de los factores geométricos. Por el contrario, cuando las interacciones cohesivas

(homomoleculares) predominan, el sistema tiende a formar eutécticos (Cherukuvada y Guru Row, 2014; Cherukuvada y Nangia, 2014).

Desde un punto de vista termodinámico, un eutéctico se forma a partir de dos sólidos en una fase homogénea que aparece en un punto específico del diagrama de fases. Este punto, caracterizado por una relación molar y una temperatura concretas, representa la miscibilidad perfecta entre los dos componentes y corresponde al mínimo coherente del diagrama (Stoler et al., 2015).

Tradicionalmente, los eutécticos farmacéuticos se obtienen mediante técnicas como la fusión o la coprecipitación asistida por solvente. Sin embargo, se ha demostrado que métodos como la compactación y la molienda también pueden inducir la formación de eutécticos. La elucidación de la composición eutéctica exacta y su integridad estructural representa un desafío debido a su naturaleza heterogénea y, en ocasiones, no estequiométrica, a diferencia de los cocristales. Las técnicas rutinarias, como la Difracción de Rayos X en Polvo (DRXP), no son útiles para identificar eutécticos de manera efectiva. En cambio, el Análisis Térmico (AT), particularmente la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, se utiliza esta sigla en inglés, de “*Differential Scanning Calorimetry*”), han demostrado ser herramientas diagnósticas clave para caracterizar el comportamiento de fusión de los eutécticos (Cherukuvada y Guru Row, 2014).

1.3.4.5. Cocristales vs. sales, hidratos y solvatos, y eutécticos

Los solvatos y los cocristales se distinguen principalmente por la naturaleza de sus componentes. Mientras que en los solvatos uno de los componentes es un líquido y el otro un sólido, en los cocristales ambos componentes son sólidos. Por otro lado, la diferenciación entre sales y cocristales radica en la transferencia de protones. En la formación de sales, se produce una transferencia completa de protones entre los componentes, lo cual no ocurre durante la formación de cocristales. En cambio, los cocristales se estabilizan mediante interacciones no covalentes, tales como enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y apilamiento π - π (Chakraborty, 2022).

Desde el punto de vista estructural, los cocristales presentan un orden de corto alcance entre moléculas vecinas, un rasgo que también podría estar presente en los eutécticos. En ambos sistemas, este orden de corto alcance refleja una preferencia por las interacciones moleculares heteroméricas sobre las homoméricas. Sin embargo, los eutécticos y los cocristales se diferencian en términos de orden de largo alcance:

mientras que los cocristales exhiben una organización altamente ordenada, los eutécticos carecen de dicho orden, mostrando características más desordenadas.

La formación de un cocrystal o un eutéctico a partir de una derivatización no covalente depende de las fuerzas termodinámicas predominantes. Un cocrystal se formará cuando la ventaja entálpica asociada a las interacciones ordenadas supere la pérdida de entropía generada por el empaquetamiento cristalino. En cambio, un eutéctico será el producto predominante cuando la ganancia de entropía asociada al desorden molecular supere la ventaja entálpica del cristal ordenado. Estas condiciones de predominio entálpico o entrópico están influenciadas, en gran medida, por la topografía molecular de los componentes. En sistemas donde los grupos funcionales favorecen la formación de enlaces no covalentes eficaces y la compatibilidad geométrica permite un empaquetamiento cristalino óptimo, es probable que se genere un cocrystal. Por el contrario, si las moléculas presentan una compatibilidad limitada en términos de forma o empaquetamiento, las fuerzas no covalentes favorecerán la formación de un eutéctico como producto predominante (Stoler et al., 2015).

Con el creciente interés en el diseño y la formulación de cocristales, recientemente se ha propuesto una extensión de la regla del pKa para diferenciar cocristales de sales (Cruz Cabeza et al., 2012). Esta regla define que para: $\Delta pK_a < 1$ hay alta probabilidad (más del 90%) de formarse complejos ácido-base no ionizados (cocristales), mientras que para $\Delta pK_a > 3$ se producirán sales debido a la transferencia completa de protones (Bashimam et al., 2022). Estos rangos se ampliaron a $\Delta pK_a > 4$ para sales, $\Delta pK_a < -1$ para cocristales y -1 a 4 como el régimen intermedio de ΔpK_a (Gunnann et al., 2023). En la región intermedia de ΔpK_a , la estructura cristalina del complejo en sí tiene una fuerte influencia en la ubicación del protón del ácido y, a veces, la determinación experimental de la posición del protón puede ser un desafío (Cruz Cabeza et al., 2012). Existen muchos casos en los que la capacidad predictiva de ΔpK_a es en realidad pobre en el rango de -1 a 4 , denominada la región gris, donde todavía se pueden formar complejos entre ácidos y bases, aunque pueden ser sales o cocristales o pueden contener protones compartidos o ionización mixta, es decir estados que no pueden asignarse a ninguna de las categorías (Bashimam et al., 2022). El ΔpK_a no debería ser el único indicador al buscar la formación de cocristales, pero sirve como herramienta de apoyo para seleccionar COF y en las proyecciones iniciales.

1.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS SÓLIDOS FARMACÉUTICOS

1.4.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

La Microscopía Óptica (MO) proporciona información importante sobre la morfología o hábito, el tamaño, el color y la naturaleza cristalina o amorfa de las partículas. Se basa en la incidencia de una luz visible sobre una muestra (colocada en el portaobjeto del microscopio óptico) que puede reflejar o transmitir dicha luz para ser detectada después de amplificaciones mediante sistemas ópticos, por el ojo humano o por cámaras fotográficas o de video.

El uso de filtros polarizadores en un microscopio óptico permite diferenciar entre sustancias anisotrópicas e isotrópicas. La luz que vibra en un solo plano, conocida como luz polarizada, es utilizada en la Microscopía de Luz Polarizada (MLP). Las sustancias cuyas propiedades dependen de la orientación del cristal, como la velocidad de transmisión de la luz, se denominan anisotrópicas. La birrefringencia o doble refracción, que ocurre cuando un cristal separa un rayo de luz en dos rayos desigualmente refractados y polarizados debido a la diferencia en la velocidad de la luz, es una característica de muchas sustancias anisotrópicas. Por esta razón, al rotar la platina en un MLP, las partículas cristalinas cambian de color o se ven opacas. Las partículas amorfas y los cristales de simetría cúbica son isotrópicos (presentan independencia entre las propiedades y la dirección) y no se observan cambios al rotar la platina del microscopio.

1.4.2. ESTUDIO DE PROPIEDADES TÉRMICAS

La temperatura a la que la fase sólida y la fase líquida están en equilibrio se conoce como PF y es una propiedad física fundamental. Es un proceso termodinámico con una energía de transición libre nula. El PF de un compuesto se utiliza para clasificarlo y determinar su pureza, también es particularmente útil debido a sus relaciones con la solubilidad acuosa y la presión de vapor (Tupe et al., 2023). En el presente trabajo, la determinación inicial de la temperatura de fusión se llevó a cabo utilizando un fusiómetro. Posteriormente, los resultados obtenidos se refinaron mediante la aplicación de técnicas adicionales de AT, con el objetivo de obtener datos más precisos y fiables.

La definición generalmente aceptada de AT abarca al grupo de técnicas en las que se mide una propiedad física de un sistema (sustancia o un material) en función de la temperatura, mientras se lo somete a un programa de temperatura controlado. La

representación gráfica de la propiedad medida en función de la temperatura (o tiempo) se denomina termograma (Volonté, 2013). Se pueden evaluar cambios en la masa, calor o flujo de calor, entalpía y otras propiedades. En el campo de la investigación farmacéutica, se ha aplicado a menudo para investigar y caracterizar diferentes sustancias farmacéuticas, en lo que respecta a estabilidad física (pérdida de peso, pérdida de hidratación/ solvatación, degradación y/o descomposición), transiciones de fase (fusión, sublimación, conversión de polimorfo) y otros fenómenos complejos (reacción química, vitrificación, relajación, etc.) (Tupe et al., 2023; Lin, 2021).

En el AT, el cambio de peso que sufre una muestra en función de la temperatura constituye la base de la Termogravimetría (TG), mientras que la medida de los cambios de temperatura origina el Análisis Térmico Diferencial (ATD), y si en lugar de temperatura se miden cambios de energía la técnica se denomina DSC. Así, por ejemplo, la TG indica el momento y la magnitud de los cambios de peso de una muestra, mientras que el ATD y el DSC permiten determinar si una reacción o cambio físico es endotérmico o exotérmico, y, en el caso de DSC, también permite medir la variación de calor (Volonté, 2013).

Las técnicas más comunes utilizadas para el AT son:

- ✓ TG
- ✓ DSC
- ✓ ATD
- ✓ Análisis Termomecánico (ATM)
- ✓ Microscopía de Platina Calentable (HSM *del inglés* Hot Stage Microscopy)

Tabla 1.1. Técnicas convencionales y propiedades representativas medidas en AT (Lin, 2021)

TÉCNICA	PROPIEDADES
TG	Descomposición, oxidación, pérdida de disolvente.
ATD	Puntos de fusión, transiciones vítreas, cambios de fase.
DSC	Puntos de fusión, calores de reacción, transición vítrea, capacidad calorífica.
ATM	Expansión, contracción, penetración, ablandamiento, transición vítrea
HSM	Transición térmica, cambio de color visual

*TG: Termogravimetría, ATD: Análisis Térmico Diferencial; DSC: Calorimetría Diferencial de Barrido;
ATM: Análisis Termomecánico; HSM: Microscopía con Platina Calentable.*

Debido a su capacidad para capturar datos térmicos adicionales, la DSC y la HSM se consideran las técnicas preferidas para obtener datos del PF. En esta tesis se utilizaron las técnicas de DSC, TG, y para complementar estos datos, HSM.

En la **Tabla 1.1** se resumen las propiedades más representativas que se pueden determinar con cada técnica de AT. Análisis TG es una técnica apropiada para determinar las formas hidratos/solvatos de los cristales o cocristales o la presencia de componentes volátiles, así como la temperatura de descomposición o sublimación del sólido. El análisis TG puede predecir la estabilidad térmica, la compatibilidad y la pureza del cocrystal. La pérdida de peso de la masa de la muestra durante el análisis TG es un signo de pérdida de componentes volátiles o descomposición de cocristales (Tupe et al., 2023). La curva TG es la representación gráfica del resultado de un análisis TG. Se muestra la masa en función de la temperatura o el tiempo en valor absoluto o porcentaje. Una característica clave de la TG es que solo puede detectar procesos como la sublimación, la desorción, la absorción y la descomposición, que son los que conducen a la ganancia o pérdida de masa. Por otro lado, esta técnica no puede detectar cambios de masa no relacionados, como la fusión reversible y las transiciones sólido-sólido.

Generalmente se grafica la primera derivada del gráfico TG, conocida como curva DTG (del inglés *Derivative Thermogravimetric Analysis*) debido a que los cambios de masa (peso) se traducen en picos. La gráfica DTG, que representa la velocidad de cambio de masa en función de la temperatura (dm/dt), ayuda a identificar con mayor claridad la temperatura inicial y final de los procesos térmicos y permite detectar la presencia de eventos solapados. El valor máximo de pico, que representa la temperatura de máxima velocidad de reacción o el proceso en general, es un parámetro importante en las curvas DTG.

La DSC es la técnica analítica ampliamente utilizada en la industria farmacéutica para caracterizar cocristales, en la cual se compara el flujo de calor (dQ/dt) de una muestra contenida en un portamuestra con el de un portamuestra vacío, que actúa como referencia, en una atmósfera controlada y en un rango de temperatura predeterminado. La curva DSC, que representa la diferencia de energía (flujo calórico) entre la muestra y la referencia en función de la temperatura o el tiempo, es el resultado gráfico de este análisis. Por lo tanto, picos positivos o negativos en una curva característica se asocian con cambios en la línea de base y eventos endotérmicos o exotérmicos. Los procesos de fusión, ebullición, sublimación, transiciones de fase, desolvatación y degradación química son endotermas, por otro lado, la cristalización, la descomposición por oxidación o reducción, o las reacciones químicas que liberan calor son exotermas, estos procesos pueden verse reflejados en la gráfica DSC. La DSC tiene la ventaja de ser una técnica sensible y rápida que solo requiere unos miligramos de muestra. La Farmacopea de los Estados Unidos (USP,

del inglés United States Pharmacopeia) y la Farmacopea Argentina (FA) codifican tanto la DSC como la TG para caracterizar el estado sólido de IFA y excipientes. Tanto para el ATD como para DSC, el hecho de representar los procesos endotérmicos con picos hacia abajo y exotérmicos hacia arriba es una convención (**Fig. 1.3**). Los picos observados en los termogramas presentan varias temperaturas características que se emplean a la hora de describirlos. La **Figura 1.4** muestra un esquema donde se pueden observar a qué parte de la curva corresponden cada una de dichas temperaturas (su determinación es igual tanto para picos endo como exotérmicos). En esta tesis se optó por mostrar en los gráficos y tablas los valores experimentales de la temperatura extrapolada de inicio, que corresponde a la intersección entre la línea de base previa al pico y la línea que surge de extrapolar el primer segmento del pico. En el caso de picos anchos o poco definidos, resulta conveniente determinar la temperatura de pico como la intersección entre las líneas extrapoladas de las curvas laterales de dicho pico.

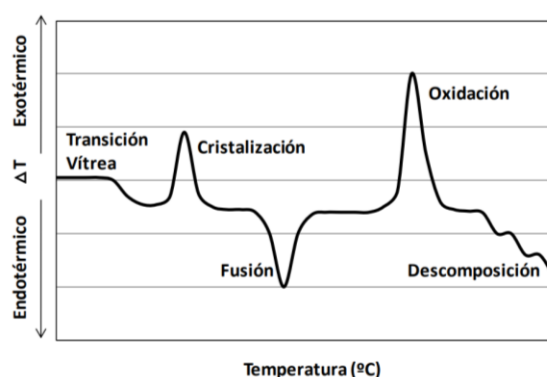


Figura 1.3. Termograma de Análisis Térmico Diferencial (Volonté, 2013).

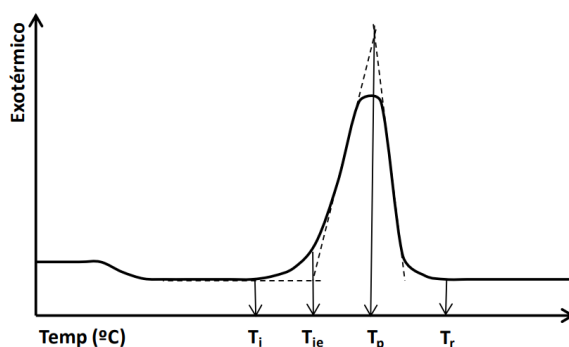


Figura 1.4. Curva de Análisis Térmico en la que se distinguen la Temperatura de inicio (T_i), de inicio extrapolado (T_{ie}), de pico (T_p) y de recuperación (T_r) (Volonté, 2013).

La HSM o también conocida como “método Kofler”, es una técnica que combina la microscopía con el análisis térmico para investigar las propiedades físicas

de materiales sólidos en función de la temperatura y el tiempo. Se pueden observar transiciones de fase en cristales y transiciones térmicas como el PF, rango de fusión, nucleación de cristales, crecimiento de cristales, transformaciones cristalinas, entre otras (Lin ,2021). Una vez iniciado el programa de temperatura, se puede observar directamente la muestra o grabar las imágenes con un software adecuado. Así, es posible correlacionar los cambios que se detectan por TG, ATD y/o DSC con las modificaciones de la muestra (Volonté, 2013). Se considera complementaria de la DSC y TG, siendo particularmente útil para confirmar transiciones y eventos térmicos detectados con esas técnicas analíticas (Tupe et al., 2023).

Cabe destacar que la cocrystalización no puede cambiar la temperatura de fusión de un IFA, cambia la temperatura de fusión de una nueva forma en la que se prepara el IFA, es decir, del cocrystal que contiene al IFA. Lo mismo se aplica a la solubilización y otras propiedades (Chakraborty, 2022).

1.4.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR POR MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Entre los métodos espectroscópicos utilizados para la caracterización molecular, se encuentran:

- ✓ Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)
- ✓ Espectroscopía Infrarroja de Reflectancia Difusa con Transformada de Fourier (DRIFT).
- ✓ Espectroscopía Raman.
- ✓ Resonancia Magnética Nuclear del Estado Sólido (RMN-ES)

La FT-IR, es un método muy utilizado para predecir y determinar la conformación química, las interacciones intermoleculares y los estudios de interacción entre IFA y COF. Su principio básico es la medición de la cantidad de radiación IR absorbida o transmitida por una muestra, lo cual puede ser efectuado en el modo transmisión o reflectancia. La energía de esta radiación es baja, provocando sólo cambios vibracionales en los enlaces moleculares. El espectro IR de un sólido se puede medir suspendiéndolo en aceite mineral (nujol, por ejemplo) o mortereando la muestra con KBr y formando una pastilla mediante la aplicación de presión. Este método es rápido, no destructivo, sensible a cambios en la estructura molecular y puede detectar grupos funcionales (Tupé et al., 2023). Una variante de la técnica de FT-IR es la DRIFT. Como consecuencia de la interacción con las partículas de un sólido, el haz de luz IR incidente puede sufrir absorción, reflexión y dispersión. La

parte de la luz dispersada dentro de la muestra y que retorna a la superficie es considerada reflexión difusa, la que, al ser captada por el detector, da lugar al correspondiente espectro DRIFT. Aquí, el sólido a analizar se dispersa en un medio no absorbente, sin ser sometido a energía mecánica (no es comprimido, sino dispersado en KBr), ni térmica durante su preparación. La espectroscopía DRIFT es más adecuada que la FT-IR para diferenciar entre polimorfos, porque se necesita mínima manipulación de la muestra, y fue la que se utilizó en esta tesis.

La RMN-ES ofrece información sobre la movilidad molecular, las diferencias en los enlaces de hidrógeno y la cristalinidad de los sólidos y permite obtener información estructural a partir de polvos de cocristales difíciles de caracterizar mediante análisis de Difracción de Rayos X de Monocristal (DRXM). Esta técnica también se emplea para diferenciar cocristales y sales ya que puede detectar el grado de transferencia de protones (Tupe et al., 2023).

1.4.4. DETERMINACIÓN DE ESTRUCTURAS CRISTALINAS

La Difracción de Rayos X (DRX) es una técnica no destructiva utilizada en la química del estado sólido para caracterizar materiales cristalinos tanto orgánicos como inorgánicos en diversos campos. Tiene un enorme potencial para el análisis de fármacos en estado sólido en todas las etapas, desde el descubrimiento, desarrollo, fabricación y control de calidad de productos farmacéuticos. Proporciona información sobre estructura cristalina, polimorfismo, grado de cristalinidad, carácter amorfo de formulaciones sólidas, compatibilidad con excipientes, detección de impurezas, estudios de estabilidad, uniformidad de dosificación y control del proceso de fabricación. Los patrones DRX resultan de ondas electromagnéticas que inciden en una matriz regular de dispersiones y constituyen la huella digital de los arreglos atómicos periódicos en un material determinado. Los patrones DRX de sólidos cristalinos se pueden obtener a partir de muestras policristalinas (polvos) y/o de un solo cristal (monocristal). El método que emplea Monocristales se llama DRXM, mientras que el método que emplea Polvos se llama DRXP. La DRXM es factible de utilizar cuando se logra la obtención de monocristales de alta calidad y tamaño adecuado. La DRXP se emplea para caracterizar las propiedades estructurales de polvos o materiales sólidos microcristalinos, identificar la formación de nuevas fases sólidas y diferenciar nuevas fases sólidas en los aductos, respecto a los compuestos originales en función de sus diferentes picos de difracción; mientras que la DRXM permite determinar la disposición tridimensional de los átomos en una sustancia química cristalina (Chakraborty et al., 2022; Lin, 2021).

1.5. PROPIEDADES BIOFARMACÉUTICAS

El desarrollo de nuevos fármacos y la optimización de los existentes suponen desafíos significativos relacionados con sus propiedades biofarmacéuticas. Entre estas, el Coeficiente de Partición aparente (P_{ap}), la solubilidad y la velocidad de disolución son factores determinantes en la absorción, BD y eficacia terapéutica de un IFA. Mejorar estas propiedades es esencial, especialmente para fármacos clasificados como poco solubles y/o poco permeables según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB). Este sistema constituye un marco científico para clasificar las sustancias farmacológicas en función de su solubilidad acuosa relacionada con la dosis a tres pH relevantes, y la permeabilidad intestinal (Amidon et al., 1995). De acuerdo con el SCB todos los IFA se encuadran en una de cuatro categorías (I, II, III o IV) (**Fig. 1.5**): clase I (alta solubilidad-alta permeabilidad), clase II (baja solubilidad-alta permeabilidad), clase III (alta solubilidad-baja permeabilidad) y clase IV (baja solubilidad-baja permeabilidad) (Breda et al., 2009). Los principales factores que afectan la absorción oral de un IFA son la solubilidad y permeabilidad (Rodríguez Hornedo, 2009) y, en consecuencia, la baja solubilidad y escasa permeabilidad se encuentran entre las principales causas de fallos durante el desarrollo de nuevos fármacos (Azevedo Barbosa et al., 2020).

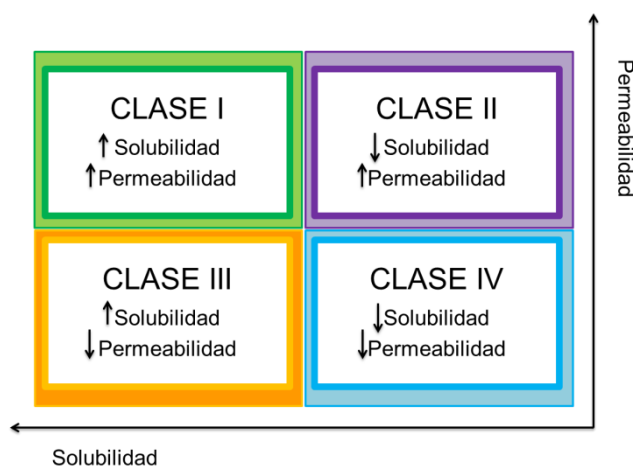


Figura 1.5. Representación esquemática del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.

1.5.1. COEFICIENTE DE PARTICIÓN

El carácter hidrofóbico de los IFA condiciona su comportamiento frente al pasaje a través de membranas biológicas, el transporte, la distribución, la unión con el receptor y, en el caso de los antibióticos, su acumulación en las células bacterianas;

juega, además, un papel fundamental en el planteamiento de correlaciones cuantitativas entre la estructura y la actividad biológica de sustancias (QSAR) (Claramunt et al., 2001). Este parámetro fisicoquímico puede determinarse experimentalmente analizando la distribución relativa de un IFA en una mezcla de *n*-octanol/agua. Los IFA hidrofóbicos o lipofílicos se solubilizarán preferentemente en la fase *n*-octanólica y los hidrofílicos lo harán en la fase acuosa. La distribución relativa se denomina coeficiente de Partición (P) y se obtiene aplicando la siguiente ecuación:

$$P = \frac{\text{Concentración del IFA en fase } n - \text{octanólica}}{\text{Concentración del IFA en fase acuosa}}$$

La concentración en cada fase se determina al someter al IFA a un proceso de reparto entre ambos disolventes. Valores de P mayores que 1 indican que el IFA es más soluble en lípidos que en agua y viceversa. (Martínez et al., 2001).

El P_{ap} , una medida de la distribución de un fármaco entre fases hidrófila y lipófila, influye en su capacidad para atravesar membranas biológicas. Por su parte, la solubilidad y la velocidad de disolución son parámetros críticos para garantizar que la cantidad suficiente de principio activo esté disponible en el sitio de absorción. Estas propiedades no solo dependen de las características intrínsecas del compuesto, sino también de su forma sólida y de las estrategias empleadas para su modificación. En este contexto, luego de implementar diversas metodologías para optimizar estas propiedades biofarmacéuticas, como la generación de cocristales y eutécticos, se realizaron ensayos para evaluar dichas propiedades biofarmacéuticas.

1.5.2. SOLUBILIDAD Y VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN

La solubilidad define la cantidad máxima de fármaco que se puede disolver en una cierta cantidad de solvente durante un cierto período de tiempo en el cual se alcanza el equilibrio entre las fases sólida y líquida. Entre los muchos parámetros que tienen impacto en la formulación y en la BD de los IFA poco solubles en agua, la solubilidad es uno de los más importantes, principalmente porque condiciona la concentración de IFA que alcanza el torrente circulatorio. Es por ello que frente a IFA poco solubles se adoptan diversas medidas para mejorar esta propiedad fisicoquímica, tales como la formación de sales, la dispersión sólida, la reducción del tamaño de las partículas y la cocrystalización (Chakraborty, 2022). La solubilidad de los cocristales puede determinarse mediante la solubilidad en equilibrio y la solubilidad cinética. Las mediciones del equilibrio termodinámico proporcionan una medida de los procesos de

solubilización de los cocristales, mientras que los estudios cinéticos proporcionan información sobre las escalas de tiempo de los procesos dinámicos y las fluctuaciones de concentración durante la disolución de los cocristales. Por otro lado, la disolución depende de la velocidad a la que el soluto se disuelve en el disolvente para alcanzar el equilibrio en un momento específico. Por lo tanto, podemos denominar la solubilidad como un proceso termodinámico y describir la disolución como un proceso cinético.

Según Maheshwari y col. (2012) la solubilización de un cocrystal en un medio de disolución pasa por los siguientes dos pasos principales. El primer paso implica la liberación de solutos de la red cristalina del cocrystal y el segundo paso es la solvatación de esas moléculas de soluto liberadas. Por lo tanto, se puede afirmar que la energía libre de la solubilización del cocrystal combina tanto la energía libre involucrada con la liberación de moléculas de soluto de una red cristalina como la energía libre involucrada con la barrera de solvatación del cocrystal. La afirmación anterior se puede representar mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{\text{solubilización}} = \Delta G_{\text{red cristalina}} + \Delta G_{\text{solvatación}}$$

donde $\Delta G_{\text{solubilización}}$ es la energía libre de Gibb involucrada en todo el proceso de solubilización, $\Delta G_{\text{red cristalina}}$ es la energía libre de Gibb involucrada con la red cocrystalina y $\Delta G_{\text{solvatación}}$ es la energía libre de Gibb involucrada con la barrera de solvatación.

Cuando $\Delta G_{\text{red cristalina}}$ y $\Delta G_{\text{solvatación}}$ se vuelven insignificantes, se logra una mejora en la disolución del cocrystal debido a la reducción en el cambio de $\Delta G_{\text{solubilización}}$. Según Maheshwari y col. (2012), esta solvatación actúa como la barrera más importante para la solubilización de fármacos poco solubles en agua. De la revisión de literatura, también se concluye que los COF altamente solubles en agua son más efectivos para aumentar la solubilidad de fármacos hidrófobos mediante la técnica de cocrystalización.

Los cocristales tienen el potencial de disminuir la fuerza de la red cristalina y al mismo tiempo aumentar la afinidad por el solvente. Bavishi y col. (2016) explicaron el fenómeno de resorte y paracaídas (*Spring-parachute effect*, en inglés), que mejora la solubilidad de los fármacos hidrofóbicos mediante la formación y mantenimiento del estado metaestable sobresaturado. El aumento de la solubilidad de los cocristales mejora la velocidad de disolución, que es el paso limitante de la velocidad en la absorción del fármaco en el tracto gastrointestinal.

1.6. CONCLUSIONES

Si bien el campo de los cocristales ha sido bien estudiado a lo largo de la última década del siglo XX en todo el mundo, sigue siendo un aspecto atractivo para los investigadores debido a sus diversas aplicaciones en la química en general y en especial en la industria farmacéutica. Siempre hay moléculas IFA que cocrystalizar, varios métodos que probar y muchos candidatos químicos para actuar como COF, y eso hace que la cocrystalización sea siempre atractiva (Bashimam, 2022).

Los cocristales farmacéuticos son ahora un campo novedoso en la fabricación de formulaciones farmacéuticas. La industria está cada vez más interesada en ellos, ya que pueden mejorar las propiedades de los IFA y minimizar el período de desarrollo. La aprobación regulatoria y el desempeño en el mercado son favorables. También existe la posibilidad de crear cocristales bioequivalentes para su uso en productos genéricos. La FDA y la Agencia Europea de Medicamentos tienen diferentes marcos regulatorios para los cocristales farmacéuticos; por lo tanto, existe la necesidad de directrices más claras y racionales para aumentar las oportunidades para el futuro mercado de cocristales (Tupe, 2023).

Se invierte una cantidad significativa de ingresos en el laborioso enfoque sintético de crear Nuevas Entidades Químicas (NEC) con efectos fisiológicos deseados que puedan formularse en productos farmacéuticos comerciales. La manipulación de la estructura de estado sólido de los IFA es común dentro de la industria farmacéutica y existen muchos enfoques para el desarrollo farmacéutico de estado sólido. El perfil de estabilidad de un cocrystal es motivo de gran optimismo ya que la mayoría de los cocristales muestran una estabilidad relativamente buena durante su vida útil. Teniendo todos estos aspectos en cuenta, se puede concluir que la cocrystalización es una de las técnicas más útiles para mejorar propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas ofreciendo numerosas ventajas sin alterar las propiedades terapéuticas de los fármacos (Chakroborty, 2022).

1.7. BIBLIOGRAFÍA

Ahmad Shaah, S.S.; Rivera, G.; Ashfaq, M. Recent Advances in Medicinal Chemistry of Sulfonamides. Rational Design as Anti-Tumoral, Anti-Bacterial and Anti-Inflammatory Agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **2013**, 13, 70-86.

Aiyama, R.; Nagai, H.; Sawada, S.; Yokokura, T.; Itokawa, H.; Nakanishi, M. Determination of Self Association of Irinotecan Hydrochloride (CPT-11) in Aqueous Solution. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1992**, 40, 2810-2813.

Almandoz, M. C.; Sancho, M. I.; Duchowicz, P. R.; Blanco, S. E. UV-Vis Spectroscopic Study and DFT Calculation on the Solvent Effect of Trimethoprim in Neat Solvents and Aqueous Mixtures. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, 129, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.02.191>.

Azevedo-Barbosa, H.; Días, D. F.; Franco, L. L.; Hawkes, J. A.; Carvalho, D. T. From Antibacterial to Antitumour Agents: A Brief Review on the Chemical and Medicinal Aspects of Sulfonamides. *Mini Rev. Med. Chem.* **2020**, 20 (19), 2052–2066. <https://doi.org/10.2174/1389557520666200905125738>.

Banerjee, R.; Bhatt, P. M.; Ravindra, N. V.; Desiraju, G. R. Saccharin Salts of Active Pharmaceutical Ingredients, Their Crystal Structures, and Increased Water Solubilities. *Cryst. Growth Des.* **2005**, 5 (6), 2299–2309. <https://doi.org/10.1021/cg050125l>.

Bashimam, M.; El-Zein, H. Pharmaceutical Cocrystal of Antibiotic Drugs: A Comprehensive Review. *Heliyon*, **2022**, 8 (12), e11872. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11872>.

Bavishi, D. D.; Borkhataria, C. H. Spring and Parachute: How Cocrystals Enhance Solubility. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **2016**, 62 (3), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2016.07.001>.

Biscaia, I. F. B.; Gomes, S. N.; Bernardi, L. S.; Oliveira, P. R. Obtaining Cocrystals by Reaction Crystallization Method: Pharmaceutical Applications. *Pharmaceutics*, **2021**, 13 (6), 898. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060898>.

Bolla, G.; Sarma, B.; Nangia, A. K. Crystal Engineering of Pharmaceutical Cocrystals in the Discovery and Development of Improved Drugs. *Chem. Rev.* **2022**, 122 (13), 11514–11603. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00987>.

Botolin, P. A.; Baranovsky, S. F.; Evstigneev, M. P. Spectrophotometric Investigation of the Heteroassociation of Caffeine and Thiazine Dye in Aqueous Solution. *Spectrochimica Acta Part A*, **2006**, 64, 693–697.

Byrn, S. R. *Solid-State Chemistry of Drugs*, 2nd ed.; Ssci, 1999.

Catalán, J. Toward a Generalized Treatment of the Solvent Effect Based on Four Empirical Scales: Dipolarity (SdP, a New Scale), Polarizability (SP), Acidity (SA), and Basicity (SB) of the Medium. *J. Phys. Chem. B*, **2009**, 113 (17), 5951–5960. <https://doi.org/10.1021/jp8095727>.

Catalán, J.; López, V.; Pérez, P.; Martín-Villamil, R.; Rodríguez, J.-G. Progress towards a Generalized Solvent Polarity Scale: The Solvatochromism of 2-(Dimethylamino)-7-nitrofluorene and Its Homomorph 2-fluoro-7-nitrofluorene. *Liebigs Ann.: Org. Bioorg. Chem.*, **1995**, (2), 241–252. <https://doi.org/10.1002/jlac.199519950234>.

Chaires, J. B.; Dattagupta, N.; Crothers, D. M. Self-Association of Daunomicyn. *Biochemistry*. **1982**, 21, 3927–3932.

Chakraborty, S.; Dhibar, M.; Pani, A. Crystal Engineering and Its Chemistry: An Architectural Approach for Cocrystallization. *Current Materials Science*, **2022**, 15 (3), 251–264. <https://doi.org/10.2174/2666145415666220317124358>.

Cherukuvada, S., C.; Guru Row, T. N. Comprehending the Formation of Eutectics and Cocrystals in Terms of Design and Their Structural Interrelationships. *Cryst. Growth Des.* **2014**, 14 (8), 4187–4198. <https://doi.org/10.1021/cg500790q>.

Claramunt R, Avendaño C. Capítulo 5: Optimización de un Prototipo: Correlaciones Estructura Química-Actividad Biológica Cuantitativas. En: Avendaño López C. *Introducción a la Química Farmacéutica*. 2da Edición. España: Editorial McGrawHill, 2001, 86-97.

Day, J. H. Thermochromism. *Chem. Rev.* **1963**, 63, 65.

Desiraju, G. R. Crystal Engineering: From Molecule to Crystal. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (27), 9952–9967. <https://doi.org/10.1021/ja403264c>.

Desiraju, G. R. Supramolecular Synthons in Crystal Engineering—A New Organic Synthesis. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, 34 (21), 2311–2327. <https://doi.org/10.1002/anie.199523111>.

Fael, H.; Barbas, R.; Prohens, R.; Ràfols, C.; Fuguet, E. Synthesis and Characterization of a New Norfloxacin/Resorcinol Cocrystal with Enhanced Solubility and Dissolution Profile. *Pharmaceutics*, **2021**, 14 (1), 49. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010049>.

FDA. Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-Crystals Guidance for Industry. 2018.

Fischbach, M. A. Combination Therapies for Combating Antimicrobial Resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **2011**, 14 (5), 519–523. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.08.003>.

Gomes, S. N.; Biscaia, I. F. B.; Lopes, D. S.; Mengarda, M.; Murakami, F. S.; Oliveira, P. R.; Bernardi, L. S. Cocrystals Enhance Biopharmaceutical and Antimicrobial Properties of Norfloxacin. *Pharmaceutics*, **2023**, 15 (9), 2211. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092211>.

Guerain, M. A Review on High Pressure Experiments for Study of Crystallographic Behavior and Polymorphism of Pharmaceutical Materials. *J. Pharm. Sci.* **2020**, 109 (9), 2640–2653. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.05.021>.

Gunnam, A.; Nangia, A. K. Novel Hydrate and Anhydrate Cocrystals/Salts of Norfloxacin and Their Physicochemical Properties. *Cryst. Growth Des.* **2023**, 23 (6), 4198–4213. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.3c00023>.

Homocianu, M. Exploring Solvatochromism: A Comprehensive Analysis of Research Data. *Microchem. J.* **2024**, 198 (110166), 110166. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110166>.

Jacoby, G. A.; Hooper, D. C. Review of the Quinolone Family. In *Antibiotic Discovery and Development*; Springer US: Boston, MA, 2012; pp 119–146.

Kalka, A. J.; Turek, A. M. Compensation of Temperature Effects on Spectra through Evolutionary Rank Analysis. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2021**, 245, 118770. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118770>

Kamlet, M. J.; Abboud, J. L. M.; Abraham, M. H.; Taft, R. W. Linear Solvation Energy Relationships. 23. A Comprehensive Collection of the Solvatochromic Parameters, π^* , α , and β , and Some Methods for Simplifying the Generalized Solvatochromic Equation. *J. Org. Chem.* **1983**, 48 (17), 2877–2887. <https://doi.org/10.1021/jo00165a018>.

Kamlet, M. J.; Doherty, R.; Taft, R. W.; Abraham, M. H. Linear Solvation Energy Relationships. 26. Some Measures of Relative Self-Association of Alcohols and Water. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105 (22), 6741–6743. <https://doi.org/10.1021/ja00360a048>.

Kavanagh, O. N. An Analysis of Multidrug Multicomponent Crystals as Tools for Drug Development. *J. Control. Release*, **2024**, 369, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.03.034>.

Laurence, C.; Legros, J.; Chantzis, A.; Planchat, A.; Jacquemin, D. A Database of Dispersion-Induction DI, Electrostatic ES, and Hydrogen Bonding A1 and B1 Solvent Parameters and Some Applications to the Multiparameter Correlation Analysis of Solvent Effects. *J. Phys. Chem. B*, **2015**, 119 (7), 3174–3184. <https://doi.org/10.1021/jp512372c>.

Lin, S.-Y. Current and Potential Applications of Simultaneous DSC-FTIR Microspectroscopy for Pharmaceutical Analysis. *J. Food Drug Anal.* **2021**, 29 (2). <https://doi.org/10.38212/2224-6614.3345>.

Liu, J.; Tu, L.; Cheng, M.; Feng, J.; Jin, Y. Mechanisms for Oral Absorption Enhancement of Drugs by Nanocrystals. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, 56 (101607), 101607. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101607>.

Maheshwari, C.; André, B.; Reddy, S.; Lilly Roy, Duarte T.; Rodríguez-Hornedo, N. Tailoring aqueous solubility of a highly soluble compound via cocrystallization: effect of coformer ionization, pH_{max} and solute–solvent interactions. *CrystEngComm*. **2012**, 14, 4801-4811. <https://doi.org/10.1039/C2CE06615G>

Martínez F., Rojas J., Perilla J., Gómez A. Efecto de la miscibilidad parcial entre octanol y agua sobre la solubilidad y el reparto de algunas sulfonamidas. *Revista Colombiana de Química*. **2001**, 30 (1), 59-71.

Mcnaught, A. D.; Wilkinson, A. *Compendio de Terminología Química*. España: Editorial Síntesis S. A 2003.

Miotke, M. M.; Józefowicz, M. Solvatochromism of Antiinflammatory Drug – Naproxen Sodium. *J. Mol. Liq.* **2017**, 230, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.12.094>.

Morissette, S. L.; Almarsson, O.; Peterson, M. L.; Remenar, J. F.; Read, M. J.; Lemmo, A. V.; Ellis, S.; Cima, M. J.; Gardner, C. R. High-Throughput Crystallization: Polymorphs, Salts, Co-Crystals and Solvates of Pharmaceutical Solids. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, 56 (3), 275–300. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.020>.

O'Malley, C.; McArdle, P.; Erxleben, A. Formation of Salts and Molecular Ionic Cocrystals of Fluoroquinolones and α , ω -Dicarboxylic Acids. *Cryst. Growth Des.* **2022**, 22 (5), 3060–3071. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.1c01509>.

Ortiz, Lara, J. C.; Balderrabano López A. Importancia de las sales orgánicas en la industria farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. **2017**, 48(1), 18-42

Pogue, J. M.; Marchaim, D.; Kaye, D.; Kaye, K. S. Revisiting “Older” Antimicrobials in the Era of Multidrug Resistance. *Pharmacotherapy*. **2011**, 31 (9), 912–921. <https://doi.org/10.1592/phco.31.9.912>.

Prado, L. D.; Rocha, H. V. A. Solid State in the Pharmaceutical Industry: A Brief Review. *Rev. Virtual Quím.* **2015**, 7 (6), 2080–2112. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150123>.

Prashar, M.; Mehta, V.; Singh, P.; Mangal, S.; Arora, P.; Harjai, K.; Chadha, R.; Dhingra, N. Structural and Biopharmaceutical Evaluation of Newly Synthesized Norfloxacin Co-Crystals Using Crystal Engineering Approach. *J. Mol. Struct.* **2023**, 1292 (136175), 136175. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.136175>.

Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-Crystals Guidance for Industry. Center for Drug Evaluation; Research. About FDA guidances. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/drugs/guidance-compliance-regulatory-information/guidances-drugs>.

Reichardt, C. Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry, 3rd ed.; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Germany, 2006.

Reta, M. R.; Anunziata, J. D.; Cattana, R. I.; Silber, J. J. Comparison between Solvatochromic and Chromatographic Studies of Anthraquinones in Binary Aqueous Mixtures. *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 306 (1), 81–89. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(94\)00595-d](https://doi.org/10.1016/0003-2670(94)00595-d).

Sancho, M. I.; Almandoz, M. C.; Blanco, S. E.; Castro, E. A. Spectroscopic Study of Solvent Effects on the Electronic Absorption Spectra of Flavone and 7-Hydroxyflavone in Neat and Binary Solvent Mixtures. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, 12 (12), 8895–8912. <https://doi.org/10.3390/ijms12128895>.

Sandri, C.; de Melo, C. E. A.; Giusti, L. A.; Rezende, M. C.; Machado, V. G. Preferential Solvation Index as a Tool in the Analysis of the Behavior of Solvatochromic Probes in Binary Solvent Mixtures. *J. Mol. Liq.* **2021**, 328 (115450), 115450. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115450>.

Santo, M.; Giacomelli, L.; Cattana, R.; Silber, J.; Blanco, M. M.; Schapira, C. B.; Perillo, I. A. Spectroscopic and Theoretical Studies of Derivatives of 1,6- and 1,7-Naphthyridines. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2003**, 59 (7), 1399–1407. [https://doi.org/10.1016/s1386-1425\(02\)00105-1](https://doi.org/10.1016/s1386-1425(02)00105-1).

Santo, M.; Giacomelli, L.; Cattana, R.; Silber, J.; Blanco, M. M.; Schapira, C. B.; Perillo, I. A. Spectroscopic and Theoretical Studies of Derivatives of 1,6- and 1,7-

Naphthyridines. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2003**, 59 (7), 1399–1407. [https://doi.org/10.1016/s1386-1425\(02\)00105-1](https://doi.org/10.1016/s1386-1425(02)00105-1)

Saucedo-Balderas, M. M.; Zuñiga-Lems, O.; Ortegón-Reyna, D.; González-González, J. S. Los Cocristales Farmacéuticos: Conceptos generales. *Anales de la Real Academia de Farmacia*, **2014**, 80 (2), 265-273. <https://doi.org/10.13140/2.1.5021.6643>.

Serajuddin, A. T. M. Salt Formation to Improve Drug Solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, 59 (7), 603–616. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.010>.

Shah, S. S. A.; Rivera, G.; Ashfaq, M. Recent Advances in Medicinal Chemistry of Sulfonamides. Rational Design as Anti-Tumoral, Anti-Bacterial and Anti-Inflammatory Agents. *Mini Rev. Med. Chem.* **2013**, 13 (1), 70–86. <https://doi.org/10.2174/138955713804484749>.

Shaikh, R.; Singh, R.; Walker, G. M.; Croker, D. M. Pharmaceutical Cocrystal Drug Products: An Outlook on Product Development. *Trends Pharmacol. Sci.* **2018**, 39 (12), 1033–1048. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.10.006>.

Shan, N.; Perry, M. L.; Weyna, D. R.; Zaworotko, M. J. Impact of Pharmaceutical Cocrystals: The Effects on Drug Pharmacokinetics. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2014**, 10 (9), 1255–1271. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.942281>.

Stahl, P.H.; Wermuth, C.G. *Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use.* Wiley-VCH. 2002.

Thakuria, R.; Delori, A.; Jones, W.; Lipert, M. P.; Roy, L.; Rodríguez-Hornedo, N. Pharmaceutical Cocrystals and Poorly Soluble Drugs. *Int. J. Pharm.* **2013**, 453 (1), 101–125. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.10.043>.

Tupe, S. A.; Khandagale, S. P.; Jadhav, A. B. Pharmaceutical Cocrystals: An Emerging Approach to Modulate Physicochemical Properties of Active Pharmaceutical Ingredients. *J. Drug Deliv. Ther.* **2023**, 13 (4), 101–112. <https://doi.org/10.22270/jddt.v13i4.6016>.

Vippagunta, S. R.; Brittain, H. G.; Grant, D. J. W. Crystalline Solids. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 48 (1), 3–26. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00097-7](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00097-7).

Volonté M. G; Quiroga P. Análisis Farmacéutico. *Facultad de Ciencias Exactas.* EDULP. 2013.

Wang, L.-Y.; Bu, F.-Z.; Yu, Y.-M.; Niu, Y.-Y.; Li, Y.-T.; Yan, C.-W.; Wu, Z.-Y. A Novel Crystalline Molecular Salt of Sulfamethoxazole and Amantadine Hybridizing

Antiviral-Antibacterial Dual Drugs with Optimal in Vitro/Vivo Pharmaceutical Properties. Eur. J. Pharm. Sci. **2021**, 163 (105883), 105883. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105883>.

Wermuth, C. Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use. Chimica Acta Verlag. 2002. ISBN 3-906390-26

Wouters, J.; Quere, L.; Guccione, S.; Thurston, D; Fox, D.; Martinez, A.; Rotella, D. P.; Ganellin, R.; Pharmaceutical Salts and Co-Crystals. Royal Society of Chemistry. 2011.

Capítulo 2

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	45
2.2. OBJETIVO GENERAL	47
2.3. OBJETIVOS PARTICULARES	47
2.4. SELECCIÓN DE LOS IFA.....	47
2.5. BIBLIOGRAFÍA	50

2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La prevalencia creciente del desarrollo de fármacos escasamente solubles en agua genera un riesgo notable de obtener una biodisponibilidad errática, con consecuencias en su seguridad y eficacia, particularmente cuando son administrados por vía oral. Para superar este problema se han desarrollado diversas estrategias, estas incluyen el cambio de la forma cristalina (polimorfos, hidratos, etc.), la formación de una fase amorfa, la formación de sales, la síntesis de cocristales, la formulación de dispersiones sólidas con polímeros hidrófilos, la inclusión en complejos con ciclodextrinas, la formación de complejos de inclusión, la formación de nanocristales, las formulaciones autoemulsificantes y la encapsulación de soluciones orgánicas (Tupe et al., 2023).

Por otra parte, el creciente número de patógenos microbianos resistentes a múltiples fármacos hace que el tratamiento de las infecciones bacterianas sea un desafío en la actualidad. Por lo tanto, la necesidad de pensar en nuevos agentes terapéuticos exitosos o nuevas estrategias terapéuticas, con mínimo riesgo de efectos secundarios es un tema de investigación candente en química medicinal (Kumar et al., 2020). Entre las múltiples estrategias disponibles, el uso combinado de antibacterianos ha generado resultados exitosos (Swain et al., 2020).

Desde 1972 existen informes en la literatura sobre la tendencia de las Sulfonamidas de formar cristales polimórficos. Además, en las tres últimas décadas diversos grupos de investigación han evaluado la formación de cocristales y sales, constituidos por Sulfonamidas Antibacterianas (SA) y distintas moléculas, tales como aspirina y los ácidos 2-aminobenzoico, 4-aminobenzoico y 4-aminosalicílico, piperazina, entre otras (Caira, 2007; Roy et al., 2023). El interés de estas investigaciones se fundamentó en: la búsqueda de compuestos con efectos antibacterianos sinérgicos, un ejemplo de ello es la obtención de co-trimoxazol, formado por Sulfametoxazol (SMX) y Trimetoprima (TMP) en una relación molar 1:5; en el uso ininterrumpido de las SA desde su aparición, principalmente en países del tercer mundo, y en la disponibilidad y bajo costo de estos Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA). Por otra parte, presentan múltiples grupos funcionales con propiedades aceptoras y donoras de puente hidrógeno, que permiten la formación de complejos supramoleculares estables en solución y posibilitan la generación de cocristales en el estado sólido, en diferentes formas (Caira, 2007; Pinto Vitorino et al., 2013; Scheepers et al., 2022).

Es así que estos “antiguos” fármacos, formando asociaciones moleculares en el estado sólido, son candidatos para desarrollos farmacéuticos nuevos. Además, proporcionan herramientas para la interpretación de las relaciones entre la estructura cristalina y su comportamiento fisicoquímico.

También las Fluorquinolonas (FQ) presentan una alta tendencia formar interacciones intermoleculares en el estado sólido y existen múltiples ejemplos de ello en la literatura (Costa et al., 2023; Huang et al., 2013; Madeira et al., 2020; Santos et al., 2020; Surov et al., 2018; Xu et al., 2014). Además, en nuestro grupo de trabajo investigando la capacidad de heteroasociación de las FQ, se obtuvo un aducto supramolecular formado por Ciprofloxacino (CIP) y Norfloxacino (NOR), lo que contribuyó a poner en evidencia la capacidad de las FQ de formar uniones intermoleculares, no covalentes, en el estado sólido (Pinto Vitorino, 2007). Se demostró, además, que combinaciones de CIP y NOR presentan efecto antibacteriano sinérgico (Pinto Vitorino et al., 2013).

En el contexto descrito en párrafos anteriores, y en el marco conceptual y metodológico de la Química Supramolecular y Farmacéutica, consideramos de interés profundizar el estudio de las interacciones en el estado sólido entre SA y FQ antibacterianas entre ellas y con Coformadores (COF) aptos para uso en humanos y veterinaria y planteamos la siguiente hipótesis:

Las FQ y SA son dos grupos farmacoquímicos con relevancia en farmacoterapia antimicrobiana que presentan limitaciones en las etapas farmacéuticas y biofarmacéuticas debido a su baja solubilidad o permeabilidad. La formación de aductos moleculares entre FQ y SA o con un COF optimiza las características de estos IFA al modificar sus propiedades fisicoquímicas, farmacéuticas y biofarmacéuticas, principalmente la solubilidad y velocidad de disolución.

A fin de poner a prueba la hipótesis, se abordó el tema por dos métodos complementarios. Por un lado, se evaluó el comportamiento de los IFA o de combinaciones IFA-IFA en disolución y por otro, se diseñaron, desarrollaron y caracterizaron sólidos multicomponentes y se evaluaron varias de sus características fisicoquímicas y biofarmacéuticas.

2.2. OBJETIVO GENERAL

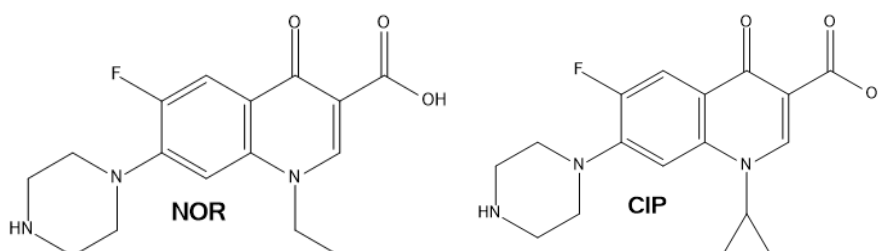
Optimizar las propiedades biofarmacéuticas y farmacéuticas de FQ y SA, utilizando las posibilidades que ofrece la ingeniería de cristales y la química supramolecular.

2.3. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Proponer y validar un método analítico para la cuantificación simultánea de FQ y SA.
2. Describir la capacidad de interacción intermolecular en solución entre FQ y SA y con el solvente, evaluando los efectos solvatocrómico, termocrómico, de aumento de concentración en solución, y solvatación preferencial en mezclas binarias de solvente.
3. Diseñar y desarrollar nuevas formas sólidas (cocristales o sales) constituidas por FQ o SA y con compuestos considerados seguros para el uso humano.
4. Estudiar las propiedades biofarmacéuticas y farmacéuticas de los sólidos obtenidos.

2.4. SELECCIÓN DE LOS IFA

Los IFA escogidos para esta investigación pertenecen al grupo farmacológico de las FQ y SA. Las FQ NOR y CIP se eligieron por su importancia farmacológica y se optó, además, por las SA: Sulfanilamida (SNA) y SMX, por su conocida capacidad como COF de cristales, así como su actividad como agente antibacteriano. Se ha incorporado la SNA como referencia, ya que es el prototipo del grupo SA. La **Figura 2.1** ilustra sus estructuras y la **Tabla 2.1** expone los datos más relevantes para cada IFA.



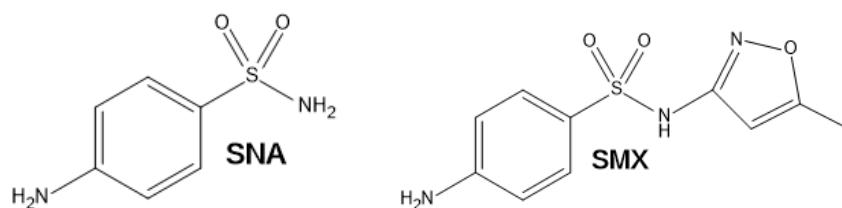


Figura 2.1. IFA seleccionados para el estudio.

Tabla 2.1. Principales propiedades fisicoquímicas de: NOR, CIP, SNA y SMX.

IFA	TF (°C)	Solubilidad en agua (mg/mL)	pKa ^d	Aceptores puente H	Dadores puente H	N° enlaces rotables	ASP (Å)	BS C
NOR	220-221 ^a	incrementa a pH <5 o >10	6,34 pKa _b :8,75	6	2	3	74,57	IV ^e
CIP	255-257 ^b	prácticamente insoluble	6,09 pKa _b :8,76	6	2	3	74,57	IV ^e
SNA	164.5-166.5 ^a	7500 (25°C) ^a	10,6 pKa _b :2,27	4	4	1	84,19	n.d.
SMX	168-172 ^c	610 (37 °C) ^a	6,16	6	3	3	98,22	IV ^f

TF: Temperatura de Fusión; ASP: área de superficie polar; BSC: sistema de clasificación biofarmacéutico; n.d.: no determinado; a: Merck, 2006; b: Mazuel, 1991; c: Bruce, 1973; d: <https://go.drugbank.com/>; e: Breda et al., 2009; f: Markovic et al., 2020.

La elección del COF más adecuado es un paso crucial para impartir propiedades deseables al cocrystal, y representa un desafío importante en la ingeniería de cristales. Los COF se seleccionan principalmente utilizando varios enfoques, tales como estrategias basadas en conocimientos y métodos experimentales. Para seleccionar los COF se tuvieron en cuenta las sustancias que integran el listado de sustancias GRAS (del inglés: *Generally Recognized as Safe*), la tendencia a formar enlaces de tipo puente de hidrógeno, la capacidad de generar homo o heterosintones y las diferencias entre los valores de pKa de los grupos ionizables presentes en los IFA (Tupe et al., 2023).

Las sustancias COF exploradas fueron Nicotinamida (NIC), Ácido Antranílico (ANT), Ácido Cítrico (CIT), Ácido Málico (MAL) y Ácido Tartárico (TART) (**Figura 2.2**).

Las interacciones intermoleculares que contribuirían a la formación de co-cristales o sales entre los IFA seleccionados, o bien entre ellos y los COF, pueden ser enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y asociaciones π entre anillos aromáticos. Tal como puede apreciarse en las **Figuras 2.1 y 2.2** y en la **Tabla 2.1 y 2.2** todos los compuestos seleccionados poseen fragmentos estructurales aptos para establecer enlaces no covalentes y formar homo o heterosintones.

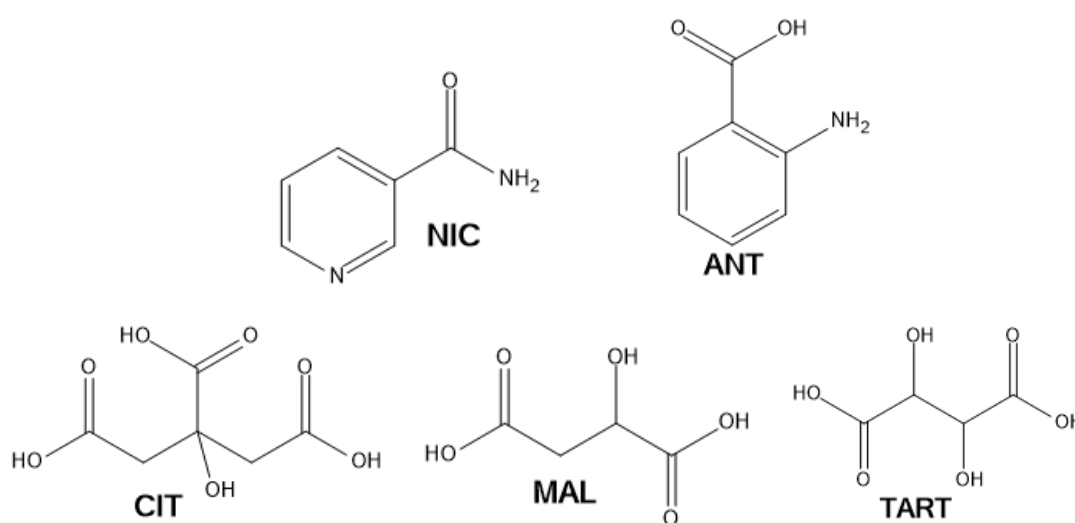


Figura 2.2. Sustancias Coformadoras utilizadas.

Tabla 2.2. Principales propiedades fisicoquímicas de: NIC, ANT, CIT, MAL, TART.

COF	TF (°C) ^a	Solubilidad en agua (mg/mL) (25°C) ^b	pKa ^b	Aceptor puente H ^b	Dador puente H ^b	N° enlaces rotables ^b	ASP ^b (Å)
NIC	128-131	50,1	3.35	2	1	1	55,98
ANT	144–146	6,81	4,89	3	2	1	63,32
CIT	153	106	pKa ₁ : 3.12 pKa ₂ : 4.76 pKa ₃ : 6.40	7	4	6	132,13
MAL	128-132	218	3,2	5	3	3	94.83
TART	168-170	161	2,72	6	4	3	115.06

TF: Temperatura de Fusión; ASP: área de superficie polar; a: Merk, 2006; b: <https://go.drugbank.com/>

Los enlaces por puente hidrógeno encontrados con más frecuencia en la literatura en estas IFA están constituidos por los grupos -N-H....O, O=S=O....H-N-H y -N-H....N-H (Caira et al., 2007; Pinto Vitorino et al., 2013) en el caso de las SA y por N-H....O y O-H....H para el salicilato de CIP (Nagalapalli et al., 2014) y las sales de NOR (Xu et al., 2014). Estas interacciones generan patrones de interacción, denominados sintones moleculares, que pueden agrupar moléculas en una sola disposición bidimensional o tridimensional en el cristal. Algunos ejemplos se muestran en la **Figura 2.3**.

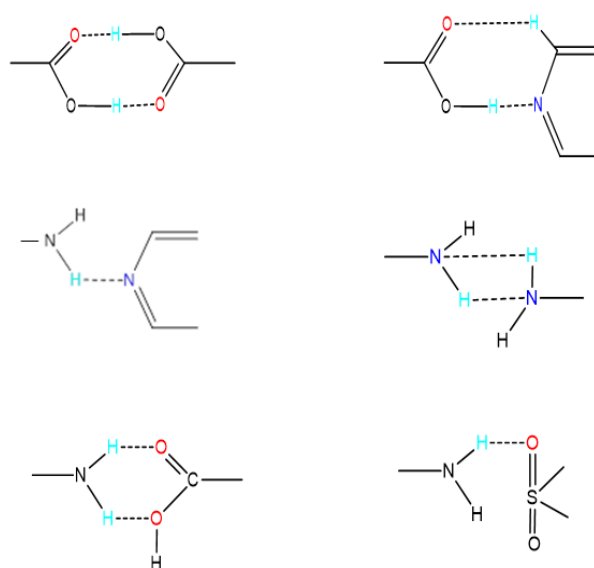


Figura 2.3. Sintones moleculares frecuentes en las interacciones por formación de puente hidrógeno entre SA o FQ.

2.5. BIBLIOGRAFÍA

Breda, S. A.; Jimenez-Kairuz, A. F.; Manzo, R. H.; Olivera, M. E. Solubility Behavior and Biopharmaceutical Classification of Novel High-Solubility Ciprofloxacin and Norfloxacin Pharmaceutical Derivatives. *Int. J. Pharm.* **2009**, 371 (1–2), 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.12.026>.

Bruce, C.R.; Senkowski, B.Z. in: K. Florey (Ed), *Analytical Profiles of Drug Substances*. Academic Press. **1973**, 2, 467-506.

Caira, M. R. Sulfa Drugs as Model Cocrystal Formers. *Mol. Pharm.* **2007**, 4 (3), 310–316. <https://doi.org/10.1021/mp070003j>.

Costa, F. M. S.; Granja, A.; Pérez, R. L.; Warner, I. M.; Reis, S.; Passos, M. L. C.; Saraiva, M. L. M. F. S. Fluoroquinolone-Based Organic Salts (GUMBOS) with Antibacterial Potential. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24 (21), 15714. <https://doi.org/10.3390/ijms242115714>.

Drugbank.ca. <http://www.drugbank.ca> (acceso 20/11/2023).

Huang, X. F.; Zhang, Z. H.; Zhang, Q. Q.; Wang, L. Z.; He, M. Y.; Chen, Q.; Song, G.-Q.; Wei, L.; Wang, F.; Du, M. Norfloxacin Salts with Benzenedicarboxylic Acids: Charge-Assisted Hydrogen-Bonding Recognition and Solubility Regulation. *Cryst. Eng. Comm.* **2013**, 15 (30), 6090. <https://doi.org/10.1039/c3ce40567b>

Kumar Verma, S.; Verma, R.; Xue, F.; Kumar Thakur, P.; Girish, Y. R.; Rakesh, K. P. Antibacterial Activities of Sulfonyl or Sulfonamide Containing Heterocyclic Derivatives and Its Structure-Activity Relationships (SAR) Studies: A Critical Review. *Bioorg. Chem.* **2020**, 105 (104400), 104400. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104400>.

Madeira, D.; Alves, C.; Silva, J.; Florindo, C.; Costa, A.; Petrovski, Ž.; Marrucho, I. M.; Pedrosa, R.; Santos, M. M.; Branco, L. C. Fluoroquinolone-Based Organic Salts and Ionic Liquids as Highly Bioavailable Broad-Spectrum Antimicrobials. In The 1st International Electronic Conference on Pharmaceutics; MDPI: Basel Switzerland, 2020.

Markovic, M., Zur, M., Ragatsky, I., Cvijić, S., Dahan, A. BCS Class IV Oral Drugs and Absorption Windows: Regional-Dependent Intestinal Permeability of Furosemide. *Pharmaceutics*. **2020**, 12(12):1175. doi: 10.3390/pharmaceutics12121175.

Mazuel, C. in: K. Florey (Ed), Analytical Profiles of Drug Substances. Academic Press. **1991**, 20, 557-600.

Merck. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 14th ed.; O'Neil, M. J., Ed.; Merck: London, England, 2006.

Nagalapalli, R.; Yaga Bheem, S. Synthesis, Crystal Structure, and Hirshfeld Surface Analysis of Ciprofloxacin-Salicylic Acid Molecular Salt. *J. Crystallogr.* **2014**, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/936174>.

Pinto Vitorino, G. Mecanismo de acción de las quinolonas antibacterianas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, 2007.

Pinto Vitorino, G.; Sperandeo, N. R.; Caira, M. R.; Mazzieri, M. R. A Supramolecular Assembly Formed by Heteroassociation of Ciprofloxacin and

Norfloxacin in the Solid State: Co-Crystal Synthesis and Characterization. *Cryst. Growth Des.* **2013**, 13 (3), 1050–1058. <https://doi.org/10.1021/cg301299e>.

Roy, P.; Chakraborty, S.; Pandey, N.; Kumari, N.; Chougule, S.; Chatterjee, A.; Chatterjee, K.; Mandal, P.; Gorain, B.; Dhotre, A. V.; Bansal, A. K.; Ghosh, A. Study on Sulfamethoxazole-Piperazine Salt: A Mechanistic Insight into Simultaneous Improvement of Physicochemical Properties. *Mol. Pharm.* **2023**, 20 (10), 5226–5239. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00646>.

Santos, M. M.; Alves, C.; Silva, J.; Florindo, C.; Costa, A.; Petrovski, Ž.; Marrucho, I. M.; Pedrosa, R.; Branco, L. C. Antimicrobial Activities of Highly Bioavailable Organic Salts and Ionic Liquids from Fluoroquinolones. *Pharmaceutics* **2020**, 12 (8), 694. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080694>.

Scheepers, M. C.; Lemmerer, A. In Pursuit of Multicomponent Crystals of the Sulfa Drugs Sulfapyridine, Sulfathiazole, and Sulfamethoxazole. *Cryst. Growth Des.* **2022**, 22 (1), 98–122. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.1c00448>.

Surov, A. O.; Voronin, A. P.; Drozd, K. V.; Churakov, A. V.; Roussel, P.; Perlovich, G. L. Diversity of Crystal Structures and Physicochemical Properties of Ciprofloxacin and Norfloxacin Salts with Fumaric Acid. *Cryst. Eng. Comm.* **2018**, 20 (6), 755–767. <https://doi.org/10.1039/c7ce02033c>

Swain, S. S.; Paidesetty, S. K.; Padhy, R. N. Phytochemical Conjugation as a Potential Semisynthetic Approach toward Reactive and Reuse of Obsolete Sulfonamides against Pathogenic Bacteria. *Drug Dev. Res.* **2021**, 82 (2), 149–166. <https://doi.org/10.1002/ddr.21746>.

Tupe, S. A.; Khandagale, S. P.; Jadhav, A. B. Pharmaceutical Cocrystals: An Emerging Approach to Modulate Physicochemical Properties of Active Pharmaceutical Ingredients. *J. Drug Deliv. Ther.* **2023**, 13 (4), 101–112. <https://doi.org/10.22270/jddt.v13i4.6016>.

Xu, Y.; Jiang, L.; Mei, X. Supramolecular Structures and Physicochemical Properties of Norfloxacin Salts. *Acta Crystallogr. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* **2014**, 70 (4), 750–760. <https://doi.org/10.1107/s2052520614011718>.

Capítulo 3

FLUORQUINOLONAS

3.1. INTRODUCCIÓN	54
3.2. DESCUBRIMIENTO DE LAS QUINOLONAS	54
3.3. CLASIFICACIÓN	55
3.3.1. Primera generación	56
3.3.2. Segunda generación	56
3.3.3. Tercera generación	57
3.3.4. Cuarta generación	57
3.3.5. Nuevas generaciones	57
3.4. MECANISMO DE ACCIÓN	58
3.5. MECANISMO DE RESISTENCIA A LAS FLUORQUINOLONAS	61
3.6. RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA- ACTIVIDAD BIOLÓGICA	62
3.6.1. Farmacóforo	62
3.6.2. Influencia de la sustitución en las diferentes posiciones del Farmacóforo	63
3.7. NORFLOXACINO Y CIPROFLOXACINO	65
3.7.1. Estructura Química	65
3.7.2. Propiedades Físicoquímicas	65
3.7.3. Comportamiento ácido-base	65
3.7.4. Solubilidad	66
3.8. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS	68
3.9. EFECTOS ADVERSOS – TOXICIDAD	68
3.10. ESPECTRO ANTIMICROBIANO – APLICACIONES TERAPÉUTICAS	69
3.11. CONCLUSIONES	71
3.12. BIBLIOGRAFÍA	71

3.1. INTRODUCCIÓN

El término “quinolona” se usa en un sentido genérico para referirse a la clase de inhibidores de la síntesis del ADN que incluyen naftiridonas, isotiazol quinolonas, quinazolininas y agentes relacionados (Álvarez-Hernández et al., 2015). Son un grupo de antimicrobianos sintéticos de amplio espectro, de fácil acceso y con amplias posibilidades de modificaciones estructurales que inciden en sus propiedades farmacéuticas, farmacológicas y clínicas.

Las quinolonas han sido el centro de un considerable interés, tanto científico como clínico, debido a que ofrecen muchos de los atributos de un antibiótico ideal: alta potencia, amplio espectro de acción, buena biodisponibilidad, formulaciones orales e intravenosas, altos niveles en plasma, un amplio volumen de distribución y baja incidencia de efectos adversos (Andersson, 2003).

Las Fluorquinolonas (FQ) son una de las clases de antibacterianos más exitosas introducidas en la clínica. Desde su aprobación, a mediados de la década de 1980, se han utilizado para tratar un amplio espectro de enfermedades infecciosas y han sido incluidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como uno de sus cinco antimicrobianos de “prioridad más alta” y de importancia crítica para el tratamiento de infecciones en humanos (Collins et al., 2024).

3.2. DESCUBRIMIENTO DE LAS QUINOLONAS

El cribado de análogos sintéticos de cloroquina en búsqueda de nuevos fármacos antimaláricos provocó que, a principios de la década de los años 60, Lescher y col. descubran de forma fortuita la primera 4-quinolona, denominándola ácido nalidíxico (Calle Vela et al., 2004). La historia comenzó por la descripción de la estructura de las 3-carboxiquinolonas en 1949 por investigadores australianos. Posteriormente, la Imperial Chemical Industries presentó una patente en 1957 y la publicó en 1961, describiendo las quinolonas y atribuyéndoles actividad antibacteriana. Tales quinolonas incluían análogos del ácido nalidíxico. Recién en 1962, Sterling Drugs publicó una patente que revelaba los efectos antibacterianos de las 1,8-naftiridonas, incluido el ácido nalidíxico. El mismo año, George Lesher, químico de Sterling Drugs, publicó un artículo que detalla los efectos antimicrobianos del ácido nalidíxico. No fue hasta 1986 que durante un simposio George Lesher afirmó que el

compuesto líder se obtuvo como subproducto durante la síntesis de cloroquina (Millanao et al., 2021).

Este subproducto presentó una actividad antibacteriana modesta, pero eventualmente condujo a la síntesis de análogos de quinolonas, incluidas las naftiridonas y el ácido nalidíxico. Este último presentó actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas y se utilizó principalmente para tratar infecciones del tracto urinario causadas por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* entre otras; con mínima actividad frente a bacterias Gram-positivas (Millanao et al., 2021). Su baja difusión tisular y su alta unión a las proteínas hacen que su concentración inhibitoria mínima sea elevada, impidiendo su utilización en infecciones sistémicas, por tal motivo su uso ha sido limitado solo a infecciones urinarias (Calle Vela et al., 2004).

Las quinolonas tuvieron poca significación clínica hasta que se descubrieron las FQ, que contienen la sustitución 6-flúor. La introducción de Norfloxacin (NOR), la primera FQ clínicamente relevante patentada en 1978, marcó una mejora significativa en la potencia, pero también amplió su espectro hacia las bacterias Gram-positivas. Sin embargo, la baja concentración en sangre y líquidos, y la limitada actividad Gram-positiva de NOR, condujo a la búsqueda de nuevas FQ (Collins et al., 2024). Estas desventajas fueron superadas con la introducción de Ciprofloxacino (CIP) que representó una notable mejora en el desarrollo de nuevas quinolonas. CIP fue el primer miembro de la familia que mostró una actividad significativa fuera del tracto urinario, su alta actividad contra infecciones por Gram-negativas y algunas Gram-positivas, junto con su mejor penetración en los tejidos. CIP fue durante muchos años el antibacteriano oral de más amplio espectro y más eficaz en uso clínico (Collins et al., 2024). Sigue siendo un antimicrobiano útil con excelente distribución tisular y notable actividad contra bacterias Gram-positivas (Millanao et al., 2021).

3.3. CLASIFICACIÓN

La estructura química de las quinolonas se desarrolló a lo largo de dos vías paralelas: las naftiridonas (con el núcleo de naftiridina original del ácido nalidíxico) y las FQ, en las que un átomo de carbono se sustituye por nitrógeno en la posición 8 del núcleo de naftiridina y presentan una sustitución de flúor en la posición 6 (Pham et al., 2019).

Las quinolonas se clasifican en cuatro generaciones, de acuerdo con las etapas de desarrollo a través de seis décadas, desde la síntesis del ácido nalidíxico (1962), como se observa en la **Figura 3.1**.

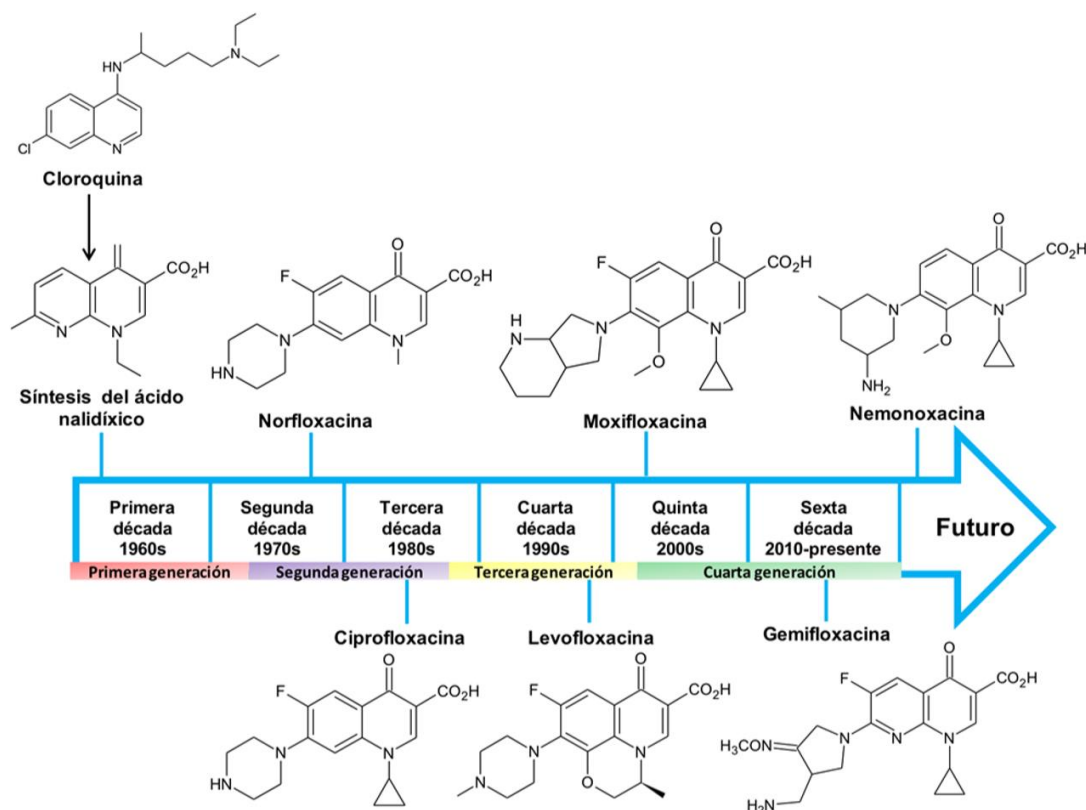


Figura 3.1. Etapas de desarrollo de las quinolonas (Chávez Jacobo et al., 2015).

3.3.1. PRIMERA GENERACIÓN

Surgen con el descubrimiento del ácido nalidíxico, como resultado de la adición de un sustituyente de piperazina en la posición 7 del núcleo de naftiridina. No son útiles para infecciones sistémicas, tienen poca actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*, organismos Gram-positivos y anaerobios (Pham et al., 2019).

3.3.2. SEGUNDA GENERACIÓN

Han estado disponibles desde mediados de la década de 1980 y fueron responsables de un enorme cambio en el tratamiento clínico de infecciones importantes, ya que son útiles para infecciones sistémicas.

NOR representa la primera quinolona de segunda generación; es de amplio espectro y equivalente en potencia a muchos de los antibióticos derivados de fermentación (Roche et al., 2020).

El tratamiento de infecciones graves provocadas por bacterias Gram-negativas como la pielonefritis, la prostatitis y la osteomielitis se volvió altamente eficaz en el ámbito ambulatorio con un antibiótico oral con la introducción de la CIP. De manera similar, los niños con fibrosis quística pudieron recibir tratamiento oral para infecciones respiratorias por *P. aeruginosa* (Khwaza et al., 2024).

La principal desventaja fue su actividad limitada contra los patógenos Gram-positivos, incluyendo *S. pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* Resistente a la Meticilina (SARM), debido al desarrollo de resistencia. Además, ciertos eventos adversos de clase, como los efectos sobre el sistema nervioso central (dolor de cabeza, mareos), fototoxicidad y tendinitis se hicieron evidentes, aunque los eventos más graves fueron poco frecuentes (Ball P., 2000).

3.3.3. TERCERA GENERACIÓN

Levofloxacin, Esparfloxacin, Tosufloxacin, Temafloxacin, Grepafloxacin: todas son activas contra *S. pneumoniae* resistente a la penicilina y han demostrado ser altamente efectivas en el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio inferior (Pham et al., 2019).

3.3.4. CUARTA GENERACIÓN

Entre esta generación se encuentran: Balofloxacin, Clinafloxacin, Gatifloxacin, Gemifloxacin, Moxifloxacin, Pazufloxacin, Arenfloxacin, Sitafoxacin, Rovafloxacin, Trovafloxacin. Son activas contra bacilos Gram-positivos, espectro extendido en anaerobios y “atípicos” Cocáceas Gram-positivas: *S. pneumoniae*, *S. aureus* (resistente a penicilina); Anaerobios: *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.* Patógenos atípicos: *L. pneumophila*, *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *Ureaplasma spp* (Álvarez-Hernández et al., 2015).

3.3.5. NUEVAS GENERACIONES

Existen autores que consideran una quinta generación, con Delafloxacin como único fármaco perteneciente a este grupo (Álvarez-Hernández et al., 2015). Nemonoxacin y Zabofloxacin son FQ actualmente en uso y cuya clasificación no

está aún bien definida en quinta o sexta. Son activas contra SARM, algunas cepas de *Enterococcus faecalis* y los patógenos intracelulares *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma* spp. y *Legionella* spp (Abbas et al., 2017).

Las principales características clínicas de las distintas generaciones se resumen en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Clasificación de las quinolonas (Roche et al., 2020)

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	
1° Generación	* Escasa concentración plasmática y tisular * No aptas para infecciones sistémicas * Inactivas frente a <i>P. aeruginosa</i>, bacterias Gram-positivas y anaerobias
2° Generación	* Concentración adecuada en plasma y tejidos * Aptas para infecciones sistémicas * Activas frente a organismos Gram-negativos, incluida <i>P. aeruginosa</i> * Actividad débil frente a <i>Streptococcus pneumoniae</i> * Inactivas frente a anaerobios
3° Generación	* Dosificación una vez al día * Activa frente a <i>Streptococcus pneumoniae</i> y bacterias atípicas * Menor actividad frente a <i>P. aeruginosa</i>
4° Generación	* Activas frente a microorganismos anaerobios y aerobios Gram-positivos y Gram-negativos
Nuevas Generaciones	* Activas contra SARM, <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>, <i>Mycoplasma</i> spp. y <i>Legionella</i> spp

SARM: *Staphylococcus aureus* Resistente a la Metilina

3.4. MECANISMO DE ACCIÓN

Las Quinolonas penetran la pared celular a través de porinas y cruzan las membranas celulares de organismos Gram-positivos y Gram-negativos mediante transporte pasivo. Durante mucho tiempo se sostuvo que sólo las especies neutras cruzaban la membrana lipídica y que las especies zwitteriónicas permanecían en la fase acuosa. Sin embargo, estudios recientes indican que cuando la especie zwitteriónica se acerca a la membrana forma agregados que disminuyen la polaridad, favoreciendo su translocación a través de la bicapa lipídica (Millanao et al., 2021). El blanco específico de las quinolonas es interferir en la síntesis del ADN, inhibiendo directamente la replicación bacteriana al interactuar con dos enzimas clave para la replicación, transcripción y reparación del ADN de la célula bacteriana; la ADN girasa y la ADN topoisomerasa IV (Álvarez Hernández, et al., 2015).

En condiciones normales, el ADN está muy condensado, por lo que antes de la replicación debe desenrollarse para separar las dos cadenas y proporcionar la plantilla para la transcripción (Pham et al., 2019). La ADN girasa fue descubierta en 1976 y fue

la primera topoisomerasa de tipo II descrita. La enzima se identificó por su capacidad para convertir sustratos de ADN circulares cerrados y relajados en moléculas superenrolladas negativamente. Durante 14 años, se creyó que la girasa era la única topoisomerasa de tipo II en las células bacterianas. Sin embargo, en 1990 se descubrieron los genes que codifican una segunda topoisomerasa de tipo II, la topoisomerasa IV. La ADN girasa y la topoisomerasa IV utilizan una reacción de paso de ADN bicatenario para controlar los niveles celulares de sobreenrollamiento y falta de enrollamiento del ADN (superenrollamiento positivo y negativo) tal como se grafica en la **Figura 3.2** (Collins et al., 2024).

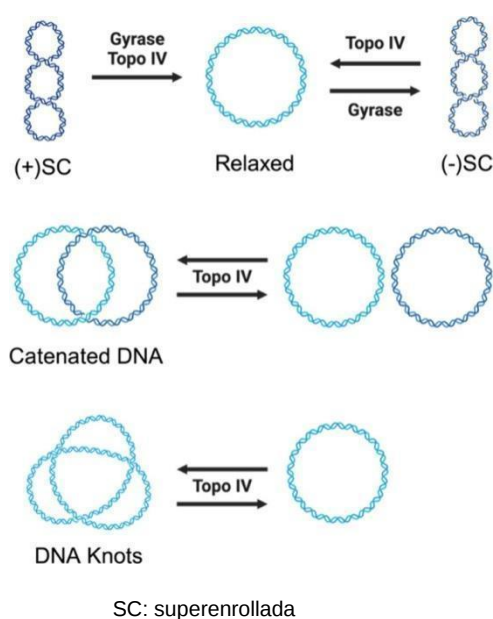


Figura 3.2. Esquema de la actividad de ADN de girasa y topoisomerasa IV (Collins et al., 2024).

Estas enzimas participan en el control de la síntesis de ADN y eliminan el estrés topológico del cromosoma bacteriano. Las quinolonas se unen al complejo, atrapando a la topoisomerasa en el ADN, lo que da como resultado la inhibición de la replicación. Este nuevo complejo ternario, ADN-Topoisomerasa-Quinolona, bloquea el movimiento de la horquilla de replicación y de los complejos transcripcionales, provoca la fragmentación cromosómica inhibiendo el crecimiento bacteriano y causando eventualmente la muerte celular (Chávez Jacobo et al., 2015).

La girasa remueve superenrollamientos positivos y avanza delante de la horquilla de replicación, mientras que la topoisomerasa IV introduce superenrollamientos positivos avanzando detrás de la horquilla de replicación; esta enzima, además, participa en la segregación de los cromosomas hijos.

Las topoisomerasas tipo IIA introducen un par de cortes en la cadena sencilla de ADN, uniéndose covalentemente al extremo 5' formando el complejo ADN-topoisomerasa (**Fig. 3.3**), relajando el superenrollamiento de la doble hélice.

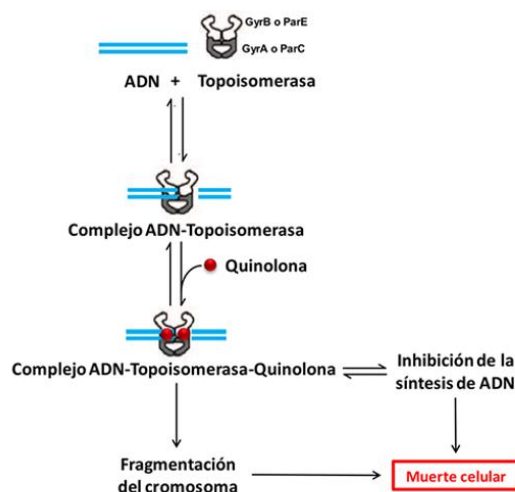


Figura 3.3. Mecanismo de acción de las quinolonas (Chávez Jacobo et al., 2015).

Durante el proceso de desenrollado, a medida que las horquillas de replicación avanzan, se crean giros helicoidales positivos. Para que continúe la replicación, la enzima ADN topoisomerasa tipo II elimina este giro helicoidal cortando el ADN y ayudando en el proceso de síntesis y separación de los cromosomas hijos. La girasa alivia el estrés que se origina delante de la bifurcación de replicación eliminando el superenrollamiento positivo y es la única topoisomerasa de tipo II que puede introducir un superenrollamiento negativo en el genoma (Millanao et al., 2021).

Específicamente, ADN girasa es el blanco primario en bacterias Gram-negativas, mientras que topoisomerasa IV lo es en bacterias Gram-positivas. Algunas quinolonas con espectro de actividad y potencia mejorada parecen tener como blanco ambas enzimas (Álvarez Hernández, et al., 2015).

Aunque existe similitud con la secuencia de la topoisomerasa humana de tipo II, se ha demostrado que las FQ no afectan a la acción de las enzimas humanas. Esto se debe a que las subunidades A y B de las enzimas humanas se han fusionado durante la evolución, por lo que funcionan como homodímeros. A pesar de esta fuerte afinidad de las FQ por las topoisomerasas procariotas en comparación con las eucariotas, no están exentas de efectos adversos clínicamente relevantes (Barberán et al., 2024).

3.5. MECANISMO DE RESISTENCIA BACTERIANA A LAS FLUORQUINOLONAS

La aparición de resistencias a las FQ se está convirtiendo en un tema crítico que está limitando el uso de esta clase de antibióticos. La resistencia puede alcanzarse mediante tres mecanismos no exclusivos (**Tabla 3.2**). Uno es la mutación en los genes que codifican las dianas de la ADN girasa y la topoisomerasa IV, el otro es la reducción de la concentración intracelular de quinolonas (Álvarez-Hernández et al., 2015). Y el tercero es la adquisición de genes de resistencia de otras fuentes, por ejemplo, por plásmidos, del medio ambiente u otras cepas resistentes con múltiples vías de resistencia (Pham et al., 2019).

La resistencia mediada por cromosomas se asocia con una expresión reducida de los canales de difusión de porinas en bacterias Gram-negativas y una mayor expresión de bombas de flujo en bacterias Gram-positivas. Cualquiera de estas alteraciones en los genes cromosómicos reduce las concentraciones de FQ en las células bacterianas (Ruiz et al., 2024; Tang et al., 2023). Las mutaciones en *gyrA*, el gen que codifica las subunidades A de ADN girasa, conforman el mecanismo que con mayor frecuencia se encuentra involucrado en la resistencia a quinolonas entre las bacterias Gram-negativas (Álvarez-Hernández et al., 2015).

La reducción de la concentración intracelular de quinolonas se da principalmente por dos mecanismos: pasivamente, mediante reducción de la permeabilidad por “downregulation” de proteínas extra-membranales que forman canales y activamente, mediante sobreexpresión de sistemas de eflujo multidroga pertenecientes a la superfamilia de división de resistencia nodulación, AcrAB-TolC36. Estos últimos reducen la acumulación de quinolonas en el citoplasma, proporcionando el tiempo suficiente para que la bacteria se adapte y adquiera resistencia (Álvarez-Hernández et al., 2015).

Actualmente se encuentran descritos tres tipos de genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos, cuyas variaciones se han reportado en diferentes patógenos alrededor del mundo; genes de resistencia a quinolonas determinantes de *Qnr*, gen variante de la aminoglucósidoacetiltransferasa (*AAC(6')-Ib-cr*) y genes codificadores de bombas de eflujo (*qepA* y *oqxAB*) (Álvarez-Hernández et al., 2015). Las proteínas *Qnr* son imitadores del ADN que se unen a la girasa y la topoisomerasa IV y disminuyen la sensibilidad a las FQ al evitar que las enzimas de tipo II se unan a sus sustratos de ADN o al bloquear la unión del fármaco al complejo de escisión. El aminoglucósido acetiltransferasa mutante, *aac(6')-Ib-cr*, acetila el nitrógeno no

sustituido de la CIP disminuyendo su actividad. Finalmente, las bombas de flujo codificadas por plásmidos, incluidas qepA1 y qepA2, contribuyen a la resistencia en humanos al reducir los niveles celulares de FQ.

Tabla 3.2. Mecanismos de resistencia a quinolonas y sus características
(Álvarez-Hernández et al., 2015).

MECANISMO	CARACTERÍSTICAS
Mutaciones cromosómicas	Afectan las regiones determinantes de resistencia a quinolonas de ADN girasa (GyrA y GyrB) y topoisomerasa IV (ParC y ParE). Se dan por errores de transcripción durante la replicación cromosómica y ocurren en rangos tan altos como 1 en 10 ⁶ -10 ⁹ en bacterias silvestres.
Reducción de la concentración intracelular de quinolonas	Pasivamente: Reducen la permeabilidad por “downregulation” de proteínas extra-membranas que forman canales. Activamente: Sobre-expresan sistemas de flujo multidroga pertenecientes a la super familia de división de resistencia nodulación, AcrAB-TolC.
Genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos	Qnr: Son genes transferibles que pueden aumentar el número de mutaciones que causan resistencia a quinolonas. Gen aac(6')-Ib-cr: Es una variante de aminoglucósido acetiltransferasa o aac(6')-Ib que reduce la actividad antimicrobiana de algunas quinolonas. Genes qepA y OqxAB: Codifican para generar una bomba de flujo tipo QepA que confiere resistencia a quinolonas hidrofílicas.

3.6. RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA- ACTIVIDAD BIOLÓGICA

3.6.1. FARMACÓFORO

El uso del término farmacóforo en química medicinal se remonta a finales de los años 1960 y principios de los 1970, y su definición según la IUPAC es la siguiente: “Un farmacóforo es el conjunto de características estéricas y electrónicas necesarias para garantizar interacciones supramoleculares óptimas con un objetivo biológico específico, y desencadenar (o bloquear) su respuesta biológica” (Nangia et al., 2022).

El farmacóforo de la familia Quinolona está constituido por un sistema de dos anillos fusionados, que forman los derivados del núcleo de naftiridona. El **flúor en la posición 6** ha dado origen al grupo de las FQ (**Fig. 3.4**), dando resultado en un aumento significativo de la actividad antibacteriana. También aumentó tanto la unión al complejo topoisomerasa-ADN (2-17 veces) como la penetración intracelular (1 a 70 veces) en relación con otros derivados no fluorados, provocando una disminución de 100 veces en la CIM (Mella et al., 2000).

Las estructuras moleculares de las FQ se han adaptado a lo largo del tiempo en asociación con la necesidad clínica. El núcleo de naftiridona del ácido nalidíxico se convirtió en la base de una serie de compuestos más activos (Ball, 2000).

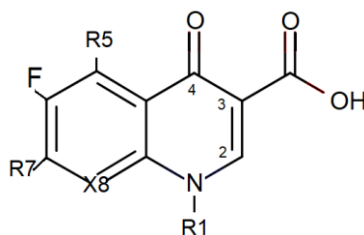


Figura 3.4. Farmacóforo de Fluorquinolonas.

Por otra parte, el núcleo de quinolona ha servido de base para generar derivados estructurales activos contra la malaria, la tuberculosis y las infecciones por hongos y helmintos (Dube et al., 2023).

3.6.2. INFLUENCIA DE LA SUSTITUCIÓN EN LAS DIFERENTES POSICIONES DEL FARMACÓFORO

Por tratarse de agentes obtenidos sintéticamente se conoce mucho sobre la relación entre el farmacóforo de las FQ, sus sustituyentes y las propiedades microbiológicas, farmacocinéticas y tóxicas (**Fig. 3.5**). Aparentemente, el ácido carboxílico y la cetona están involucrados en la unión al sistema enzimático ADN/ADN-girasa. La reducción del doble enlace 2,3 o el grupo 4-ceto inactiva la molécula, y la sustitución en C-2 interfiere con la complejización enzima-sustrato. El flúor en la posición C-6 mejora en gran medida la actividad antimicrobiana al aumentar la lipofilicidad de la molécula, que a su vez mejora la penetración del fármaco a través de la pared celular bacteriana. El flúor C-6 también aumenta la acción inhibitoria de la ADN girasa/topoisomerasa IV (Roche et al., 2024; Sharma et al., 2024).

Sustituyente unido a N1. Las primeras quinolonas presentaban un grupo etilo, posteriormente la adición de grupos más voluminosos dio lugar a un aumento de la actividad. El sustituyente de mayor importancia es el ciclopropil, presente en muchas moléculas como por ejemplo en CIP, ya que combina favorables propiedades estéricas, espaciales y de interacción electrónica. Su presencia parece ampliar la actividad de las FQ para incluir actividad contra bacterias atípicas, incluidas las especies *Mycoplasma*, *Chlamydia* y *Legionella* (Roche et al., 2020).

En la **posición 2** se han realizado pocas modificaciones ya que como se mencionó anteriormente la reducción del doble enlace inactiva la molécula.

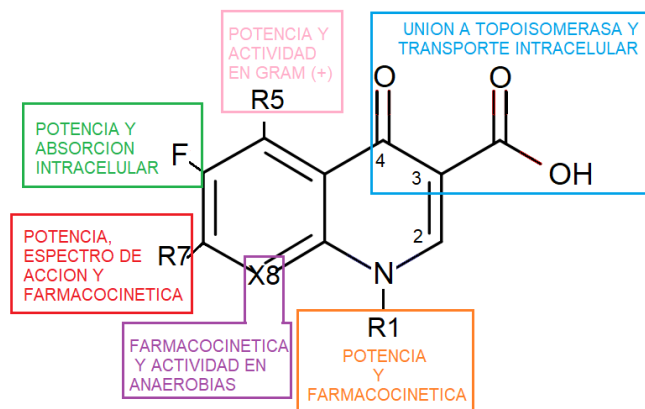


Figura 3.5. Estructura base de las Fluorquinolonas y funciones de los sustituyentes. Los grupos R representan las posiciones sustituidas comúnmente. Se indican los principales procesos en los que participan las modificaciones en cada posición. Las moléculas donde la posición 8 se sustituye por un átomo de carbono son quinolonas y cuando se sustituye por un átomo de nitrógeno son naftiridinas (Chávez Jacobo et al., 2015).

En las **posiciones 3 y 4** los grupos 3-carboxilo, 4-carbonilo y el protón unido a C2 son esenciales para la actividad antibacteriana. La importancia del grupo 3-carboxilo se demostró con la síntesis de compuestos que demostraron ser inactivos o por compuestos que llevando un grupo en C3 sufrieron *in vivo* transformación a ácido carboxílico y de esta manera fueron activos (Mella et al., 2000).

Los sustituyentes de la **posición 5** tienen la capacidad de alterar la planaridad de la estructura de quinolona y afectar la potencia y el espectro de acción. Un grupo amino puede incrementar la absorción, distribución y actividad sobre especies Gram-positivas. El cambio por grupo metilo (grepafloxacin) generó mayor cobertura sobre *S. pneumoniae* (Mella, 2000).

La sustitución en la **posición 7** es una de las más investigadas. La incorporación de anillos heterocíclicos de cinco o seis miembros genera buena actividad biológica. Las modificaciones a este nivel mejoran el espectro de actividad, especialmente contra los organismos Gram-negativos. El piperazinilo (presente en CIP y NOR) y el pirrolidinilo (moxifloxacin) representan la mejoría del espectro antimicrobiano más significativo. Desafortunadamente, el grupo piperazinilo en C-7 también aumenta la unión a los receptores del ácido γ -aminobutírico (GABA) del sistema nervioso central, lo que explica los efectos secundarios de estos IFA. Sin embargo, la incorporación de un alquilo en la piperazina nitrogenada (oxoxacin y levofloxacin) disminuye la unión a GABA (Roche et al., 2020).

En el **sustituyente en C8**, la presencia de halógenos aumenta la actividad antianaerobia y mejora la absorción por vía oral (Mella et al., 2000). Un grupo flúor adicional en C-8 mejora aún más la absorción y la vida media del IFA, pero también aumenta la fotosensibilidad. La sustitución de un grupo metoxi en C-8 reduce la fotosensibilidad (moxifloxacina y gatifloxacina).

3.7. NORFLOXACINO Y CIPROFLOXACINO

3.7.1. ESTRUCTURA QUÍMICA

Químicamente, NOR y CIP son FQ conformadas por un sistema bicíclico de quinolina sustituido en posición 3 por un grupo ácido carboxílico y en posición 7 por un piperazinilo.

NOR es el ácido 1-etil-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-il)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico y CIP es el ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-il)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (**Fig. 3.6**).

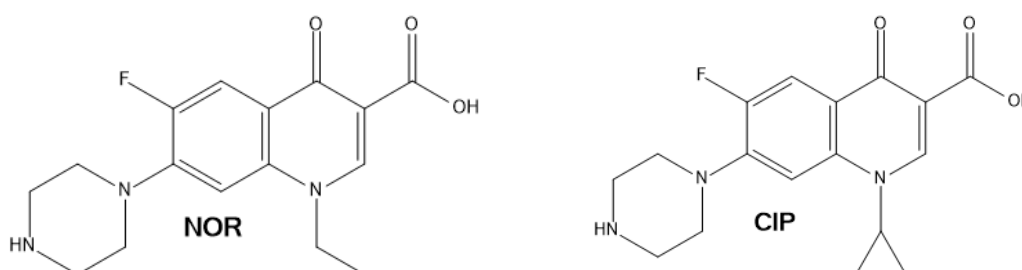


Figura 3.6. Estructuras químicas de NOR y CIP.

3.7.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Las principales propiedades fisicoquímicas de NOR y CIP figuran en la **Tabla 2.1**. Se describen a continuación los aspectos más relevantes para el desarrollo de este trabajo, respecto a las características ácido-base y a la solubilidad de NOR y CIP.

3.7.3. COMPORTAMIENTO ÁCIDO-BASE

NOR y CIP pertenecen al conjunto de FQ que poseen varios grupos potencialmente ionizables, siendo dos de ellos los más relevantes desde el punto de

vista farmacéutico: el grupo ácido carboxílico en C3 y la amina secundaria en C4. Las moléculas que presentan estas características existen en solución en cuatro especies posibles, la aniónica, la zwitteriónica, la no iónica y la catiónica (**Figura 3.7**). Siendo ácidos y bases débiles, la concentración de cada especie dependerá de los valores de pK_{a1} y pK_{a2} de la FQ y del pH del medio (Musa et al., 2009).

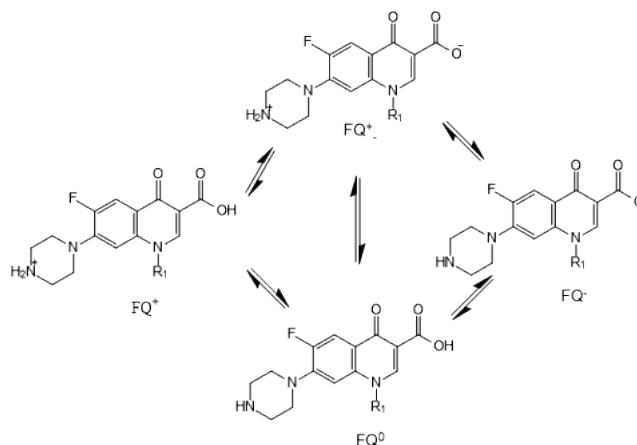


Figura 3.7. Esquema de especiación de NOR: **FQ⁰** (no iónica), **FQ⁺** (catiónica), **FQ⁺** (zwitteriónica) y **FQ⁻** (aniónica).

El punto isoelectrónico oscila entre 6,8 y 7,8, por lo tanto, a pH fisiológico las formas dominantes son las zwitteriónicas seguidas de la forma neutra (Millanao et al., 2021). El valor de pK_1 para las FQ en general, es mayor que el que suele observarse para el ácido carboxílico. Esta disminución de la acidez se ha atribuido a la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el ácido carboxílico y la función ceto en la posición 4 (**Fig. 3.8**), lo que da como resultado la estabilización de las especies protonadas (Pinto Vitorino et al., 2019).

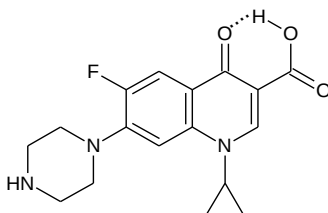


Figura 3.8. Enlace de hidrógeno intramolecular entre el ácido carboxílico y la función ceto.

3.7.4. SOLUBILIDAD

NOR, según la Farmacopea Argentina (FA), es fácilmente soluble en ácido acético, moderadamente soluble en cloroformo, poco soluble en acetona, agua y

alcohol, muy poco soluble en metanol y acetato de etilo e insoluble en éter. CIP es soluble en ácido acético diluido, muy poco soluble en alcohol y cloruro de metileno y prácticamente insoluble en agua (FA 7ed.).

En medio acuoso, el equilibrio de disociación depende del pH y, en consecuencia, la solubilidad de las FQ también. NOR y CIP pertenecen al grupo IV del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica debido a sus limitaciones respecto a la hidrosolubilidad y a la permeabilidad (Breda et al., 2009).

A lo largo del tracto gastrointestinal, las quinolonas encontrarán diferentes ambientes fisicoquímicos. Las especies neutras (no iónica y zwitteriónica) presentan la menor solubilidad en agua y otros disolventes polares, mientras que en un ambiente no polar la solubilidad de estas especies es mayor, lo que facilita su paso a través de las membranas lipídicas. Por el contrario, las especies catiónica y aniónica presentan una mayor solubilidad en agua a pH ácidos y básicos respectivamente (Millanao et al., 2021). Estas características dan como resultado un perfil de solubilidad en función del pH en forma de U que muestra una alta solubilidad a $\text{pH} < 5$ y $\text{pH} > 10$. El rango de solubilidad más bajo está comprendido entre pH 5 y 10, particularmente a pH fisiológico (7,4) es igual a 0,06 mg/mL para CIP y a 0,32 mg/mL para NOR a 25 °C (Ross et al., 1990). La escasa hidrosolubilidad de estos IFA se debe a su naturaleza zwitteriónica y a la influencia de fuertes interacciones intermoleculares dentro de la red cristalina en estado sólido. Mahapatra et al. (2010) informaron que en FQ ionizadas los enlaces iónicos intermoleculares se forman entre el nitrógeno cargado positivamente de la 7-piperazina y el oxígeno del 3-carboxilato cargado negativamente de dos moléculas vecinas. Esta interacción cabeza-cola produce una cadena supramolecular unidimensional de moléculas. Además, las cadenas adyacentes están conectadas por enlaces de hidrógeno intermoleculares formando capas bidimensionales. Por lo tanto, cada CIP está unida a moléculas vecinas y adyacentes, lo que da como resultado una estructura similar a un tetrámero produciendo un empaquetamiento denso de las moléculas zwitteriónicas en la estructura cristalina, que es la causa de su escasa hidrosolubilidad.

En consecuencia, controlar la transferencia de protones en este tipo de IFA zwitteriónico es esencial para modular la solubilidad. Las estrategias de salificación dependientes del pH han demostrado ser el mejor enfoque para lograr con éxito mejorar la solubilidad al disminuir la energía de la red cristalina (Acebedo Martínez et al., 2023).

3.8. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS

La concentración sérica de NOR es relativamente reducida, por lo que su utilidad es limitada al tratamiento de las infecciones urinarias. El resto de las quinolonas se absorben en general muy bien después de su administración oral y se distribuyen de manera extensa en los tejidos del organismo. Su concentración sérica máxima se alcanza en las primeras 3 h después de una dosis oral de 400 mg. Los alimentos no modifican la absorción oral, pero aumentan el intervalo que transcurre hasta alcanzar la concentración sérica máxima. La dosis oral en adultos es de 400 mg cada 12 h para NOR y de 250 a 750 mg cada 12 h para CIP. La biodisponibilidad de las FQ es >50%. La semivida sérica de NOR y CIP es de 3 a 4 h. El volumen de distribución de las quinolonas es elevado y su concentración en orina, riñones, pulmón, tejido prostático, heces fecales, bilis, macrófagos y neutrófilos es mayor que su concentración sérica (Malgor Valsecia, 2001). Los volúmenes de distribución son tan elevados en algunas moléculas que superan el volumen de agua corporal total, lo que indica acumulación en algunos tejidos, y en determinados sitios suelen superar las concentraciones séricas. Este perfil farmacocinético es en gran parte responsable del éxito de estos fármacos contra las infecciones, aunque también de los Efectos Adversos (EA) (Barberán et al., 2024).

3.9. EFECTOS ADVERSOS – TOXICIDAD

Las FQ se asocian a un mayor riesgo de EA relacionados con el sistema nervioso central y gastrointestinal en comparación con otros tipos de antimicrobianos. Los EA de las FQ pueden ocurrir en las 48 horas siguientes a la administración, pero también pueden causar daños retardados tras varios meses desde la interrupción del fármaco. Los EA se localizan principalmente en el tracto gastrointestinal (náuseas, vómitos, malestar y dolor abdominal, anorexia y, en algunos casos, diarrea), músculos, tendones (tendinitis, rotura tendinosa, en particular del tendón de Aquiles), articulaciones (artralgia), sistema nervioso (cefalea, mareos, confusión, convulsiones, depresión e insomnio) y sistema cardiovascular (prolongación del QTc y arritmias). Otros efectos adversos menos frecuentes son: fototoxicidad, disglucemia, hepatotoxicidad, insuficiencia renal aguda, reacciones alérgicas, genotoxicidad, efectos secundarios hematológicos e inmunológicos, aneurisma y disección aórtica, desprendimiento de retina e inhibición del CYP 450 (Barberán et al., 2024).

Las reacciones adversas más frecuentes de CIP son fotosensibilidad fototóxica y alérgica, eritema en las zonas expuestas, ampollas en las extremidades y casos graves de eczemas. NOR puede generar un cuadro de erupción pustular subcorneal eritematosa con fiebre, hemorragias subungueales, disminución de leucocitos y en particular de los neutrófilos por un mecanismo probablemente autoinmunitario. También puede producir plaquetopenia, que se normaliza al suspender el agente (Malgor Valsecia, 2001).

Las FQ forman complejos con cationes metálicos divalentes y trivalentes, formando complejos insolubles en agua. Esta propiedad fisicoquímica tiene un impacto directo en la biodisponibilidad de las FQ. Los complejos FQ con cationes polivalentes que incluyen Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} y Al^{+3} limitarían la difusión a través de la barrera epitelial y podría dar lugar a concentraciones subterapéuticas de estos antimicrobianos. Por lo tanto, cuando se administran por vía oral, las FQ requieren una administración adecuada para evitar interacciones polivalentes entre FQ y metales para garantizar una absorción adecuada y una concentración sistémica efectiva (Millanao et al., 2021).

3.10. ESPECTRO ANTIMICROBIANO – APLICACIONES TERAPÉUTICAS

La familia de las FQ creció exponencialmente y sus usos se extendieron desde las Infecciones del Tracto Urinario (ITU) a una gran variedad de usos, incluyendo el tratamiento de infecciones dérmicas, gastrointestinales, oculares, osteoarticulares, respiratorias, cutáneas y de tejidos blandos y sistémicas, entre otras (Ruiz, 2024). Las FQ no son fármacos de primera línea para infecciones del tracto respiratorio, especialmente neumonía adquirida en la comunidad, pero se reservan para casos graves (Tang et al., 2023). Se utilizan en terapias veterinarias o con fines profilácticos, además de como promotores del crecimiento del ganado, a pesar de los posibles efectos secundarios sobre el cartílago (Ruiz 2024).

El uso clínico de las FQ también está restringido en poblaciones específicas, como mujeres embarazadas y en período de lactancia y pacientes pediátricos y ancianos, por su potencial toxicidad. A pesar de que los niños son una población objetivo importante con respecto a las infecciones que responden bien a FQ, tales como diarrea o meningitis, los riesgos combinados de toxicidad y la rápida propagación de la resistencia son motivos suficientes para contraindicar el tratamiento con FQ, con la posible excepción de niños con fibrosis quística o infecciones

potencialmente mortales con organismos resistentes a otros antibióticos (Millanao et al., 2021).

CIP se encuentra entre los cinco antibacterianos de mayor producción actualmente en el mundo. Su uso fue aprobado para infecciones simples y complejas del tracto urinario (incluidas cistitis, pielonefritis y prostatitis bacteriana crónica, gonorrea genitourinaria y rectal sin complicaciones), piel y otras infecciones de tejidos blandos, de huesos y articulaciones, diarrea infecciosa y tifoidea, infecciones intraabdominales (en combinación con metronidazol), sinusitis, ántrax y neumonía adquirida en el hospital (Tang et al., 2023; Khwaza et al., 2024).

Las FQ presentan actividad de amplio espectro y una variedad de indicaciones clínicas. Sin embargo, las crecientes tasas de resistencia están llevando a un reajuste de estrategias y uso de esta clase de antibióticos, particularmente para reducir el riesgo de selección de resistencia. Las prescripciones excesivas de FQ han llevado al rápido desarrollo de resistencia, lo que lleva a una pérdida de efectividad de esta clase (Pham et al., 2019). A nivel mundial, los altos niveles de resistencia a *E. coli*, ha llevado a la sustitución de las FQ por cefalosporina de tercera generación para las ITU. Las FQ siguen siendo la primera elección para el tratamiento de la fiebre tifoidea causada por *Salmonella* debido a la resistencia a agentes previos de primera línea, como ampicilina, cloranfenicol y trimetoprima/sulfametoxazol. Sin embargo, la resistencia a FQ en *Salmonella* se informa cada vez más en América, el sur de Asia, el sudeste asiático y especialmente el África subsahariana, y esta especie ahora se considera un patógeno de alta prioridad para la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos.

Para reducir el desarrollo de resistencia a FQ es imperioso limitar su uso al tratamiento de pacientes con infecciones menos graves, pacientes con estancias hospitalarias prolongadas y pacientes con enfermedades crónicas. Desafortunadamente, las FQ también son ampliamente utilizadas en la práctica veterinaria y ganadera, lo que puede provocar seria resistencia a través de una variedad de rutas.

A pesar de la resistencia generada y la toxicidad de las FQ, estos antibióticos aún se utilizan dada su eficacia en el tratamiento de infecciones graves. (Millanao et al., 2021).

3.11. CONCLUSIONES

La historia de las quinolonas abarca más de 50 años, período en el cual se ha desarrollado una gran variedad de moléculas con actividad antimicrobiana. NOR es la primera FQ, a partir de la cual surgieron las siguientes, las cuales tienen mayor potencia. CIP, con más de 30 años de uso, continúa siendo un fármaco de primera elección en el tratamiento de infecciones por enterobacterias. Las FQ han evolucionado a partir de agentes utilizados exclusivamente para el tratamiento de infecciones del tracto urinario a moléculas con una potente actividad contra un amplio espectro de patógenos bacterianos. Las modificaciones progresivas en la estructura molecular han mejorado la amplitud y la potencia de la actividad *in vitro* y la farmacocinética, generando agentes aptos para ser utilizados ampliamente en el entorno terapéutico actual estando hoy en día entre los antibacterianos más prescritos. Sin embargo, su uso extensivo en las granjas animales, pero también en la medicina humana, aumentó la prevalencia de resistencia en un número cada vez mayor de patógenos. Por lo tanto, es una prioridad restringir el uso de quinolonas únicamente en medicina humana (Millanao et al., 2021). El desarrollo de nuevas quinolonas o agentes similares a las quinolonas con propiedades mejoradas sigue siendo deseable, especialmente si estos nuevos agentes sólo se usan de manera racional (Pham et al., 2019).

3.12. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, M.; Paul, M.; & Huttner, A. New and improved? A review of novel antibiotics for Gram-positive bacteria. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **2017**, 23(10), 697–703. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.010>

Acebedo Martínez, F. J.; Domínguez Martín, A.; Alarcón Payer, C.; Sevillano Páez, A.; Verdugo Escamilla, C.; González Pérez, J. M.; Martínez Checa, F.; Choquesillo Lazarte, D. Enhanced NSAIDs Solubility in Drug–Drug Formulations with Ciprofloxacin. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24 (4), 3305. <https://doi.org/10.3390/ijms24043305>.

Álvarez Hernández, D. A.; Garza Mayén, G. S.; Vázquez López, R. Quinolonas: Perspectivas Actuales y Mecanismos de Resistencia. *Rev. Chilena Infectol.* **2015**, 32 (5), 499–504. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182015000600002>.

Andersson, M. I. Development of the Quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, 51 (90001), 1–11. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg212>.

Ball, P. Quinolone Generations: Natural History or Natural Selection? *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, 46 (suppl_3), 17–24. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jac.a020889>.

Barberán, J.; de la Cuerda, A.; Tejeda González, M. I.; López Aparicio, A.; Monfort Vinuesa, C.; Ramos Sánchez, A.; Cristina Barberán, L. Safety of Fluoroquinolones. *Rev. Esp. Quimioter.* **2024**, 37 (2), 127–133. <https://doi.org/10.37201/req/143.2023>.

Breda, S. A.; Jimenez-Kairuz, A. F.; Manzo, R. H.; Olivera, M. E. Solubility Behavior and Biopharmaceutical Classification of Novel High-Solubility Ciprofloxacin and Norfloxacin Pharmaceutical Derivatives. *Int. J. Pharm.* **2009**, 371 (1–2), 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.12.026>.

Calle Vela, E.; Melgarejo Pomar, I. Quinolonas. *Cuadernos del Hospital de Clínicas*. **2004**, 9 (2), 207–14. <https://docplayer.es/49527929-Quinolonas-quinolones-cuadernos-del-hospital-de-clinicas-articulo-de-revision-dr-elias-calle-vela-dra-ingrid-melgarejo-pomar-introduccion.html> (acceso 05/2024).

Chávez Jacobo VM, Ramírez Díaz MI, Silva Sánchez J, Cervantes C. resistencia bacteriana a quinolonas: determinantes codificados en plásmidos. *REB*. **2015**. 34(1), 4-9

Collins, J. A.; Osheroff, N. Gyrase and Topoisomerase IV: Recycling Old Targets for New Antibacterials to Combat Fluoroquinolone Resistance. *ACS Infect. Dis.* **2024**, 10 (4), 1097–1115. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00128>

Dube, P.S.; Legoabe, L.J.; Betek, R. Quinolone: a versatile therapeutic compound class. *Molecular Diversity*. **2023**, 27:1501–1526

Farmacopea Argentina, 7° edición. (2013). Ministerio de Salud de la Nación.

Khwaza, V.; Mlala, S.; Aderibigbe, B. A. Advancements in Synthetic Strategies and Biological Effects of Ciprofloxacin Derivatives: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25 (9), 4919. <https://doi.org/10.3390/ijms25094919>.

Mahapatra, S.; Venugopala, K. N.; Guru Row, T. N. A Device to Crystallize Organic Solids: Structure of Ciprofloxacin, Midazolam, and Ofloxacin as Targets. *Cryst. Growth Des.* **2010**, 10 (4), 1866–1870. <https://doi.org/10.1021/cg901565q>.

Malgor-Valsecia. Farmacología Médica, vol. 3, sección v, capítulo 33: Quimioterápicos: 52-59. 2001.

Mella M., S.; Acuña L., G.; Muñoz Q., M.; Perez C., C.; Labarca L., J.; Gonzalez R., G.; Bello T., H.; Dominguez Y., M.; Zemelman Z., R. Quinolonas: Aspectos Generales Sobre Su Estructura y Clasificación. *Rev. Chilena Infectol.* **2000**, 17 (1). <https://doi.org/10.4067/s0716-10182000000100008>.

Millanao, A. R.; Mora, A. Y.; Villagra, N. A.; Bucarey, S. A.; Hidalgo, A. A. Biological Effects of Quinolones: A Family of Broad-Spectrum Antimicrobial Agents. *Molecules*, **2021**, 26 (23), 7153. <https://doi.org/10.3390/molecules26237153>.

Minguillón Llombart, C.; Joglar Tamargo, J.; Delgado Cirilo, A. Introducción a la química terapéutica; Ediciones Díaz de Santos, 2003.

Musa, K. A. K.; Eriksson, L. A. Theoretical Assessment of Norfloxacin Redox and Photochemistry. *Journal of Physical Chemistry A*, **2009**, 113 (40), 10803–10810.

Nangia, A. K.; Desiraju, G. R. Heterosynthons, Solid Form Design and Enhanced Drug Bioavailability. *Angew. Chem. Weinheim Bergstr. Ger.* **2022**, 134 (39). <https://doi.org/10.1002/ange.202207484>.

Patrick, G. An Introduction to Medicinal Chemistry, 6th ed.; Oxford University Press: London, England, 2017.

Pham, T. D. M.; Ziora, Z. M.; Blaskovich, M. A. T. Quinolone Antibiotics. *Med. Chem. Comm.* **2019**, 10 (10), 1719–1739. <https://doi.org/10.1039/c9md00120d>.

Pinto Vitorino, G.; Mazzieri, M.R. Chapter 1: “The Challenge of Improving the Bioavailability of Ciprofloxacin by Supramolecular Engineering”, in: “Ciprofloxacin: Biosynthesis, Applications, and Adverse Effects”. M. S. Attia editor. Nova Science Publishers, Inc.: USA. 2019. ISBN: 978-1-53614-534-2.

Roche, V. F.; Zito, W.; Lemke, T.; Williams, D, eds. “Foye’s Principles of Medicinal Chemistry”. 8ª edición. China: Editorial Wolters Kluwer; 2020.

Ross DL, Riley CM. Aqueous Solubilities of Some Variously Substituted Quinolone Antimicrobials. *International Journal of Pharmaceutics*, **1990**, 63, 237-50.

Ruiz, J. Unusual and Unconsidered Mechanisms of Bacterial Resilience and Resistance to Quinolones. *Life* (Basel), **2024**, 14 (3), 383. <https://doi.org/10.3390/life14030383>.

Sharma, V.; Das, R.; Mehta, D. K.; Sharma, D.; Aman, S.; Khan, M. U. Quinolone Scaffolds as Potential Drug Candidates against Infectious Microbes: A Review. *Mol. Divers.* **2024**. <https://doi.org/10.1007/s11030-024-10862-4>.

Tang, K., & Zhao, H. Quinolone Antibiotics: Resistance and Therapy. *Infection and Drug Resistance*, **2023**, 16, 811–820. <https://doi.org/10.2147/IDR.S401663>

Capítulo 4

SULFONAMIDAS ANTIBACTERIANAS

4.1. INTRODUCCIÓN	76
4.2. DESCUBRIMIENTO DE LAS SULFONAMIDAS	77
4.3. MECANISMO DE ACCIÓN	78
4.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA A LAS SULFONAMIDAS	80
4.5. CLASIFICACIÓN	81
4.6. RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA- ACTIVIDAD BIOLÓGICA	82
4.6.1. Farmacóforo	82
4.6.2. Influencia de la sustitución en las diferentes posiciones del farmacóforo.....	82
4.7. SULFANILAMIDA Y SULFAMETOXAZOL	83
4.7.1. Estructura Química.....	83
4.7.2. Comportamiento ácido base.....	84
4.7.3. Solubilidad	84
4.8. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS.....	85
4.9. ESPECTRO ANTIMICROBIANO – APLICACIONES TERAPÉUTICAS.....	86
4.10. EFECTOS ADVERSOS – TOXICIDAD	88
4.10.1. Efecto toxicológico.....	88
4.10.2. Efecto ambiental.....	88
4.11. CONCLUSIONES.....	89
4.12. BIBLIOGRAFÍA	89

1. INTRODUCCIÓN

Las sulfonamidas, también conocidas como sulfas o sulfamidas, son compuestos orgánicos de origen sintético que contienen, en su estructura, un grupo funcional sulfonilo unido covalentemente a una amina (**Fig. 4.1**).

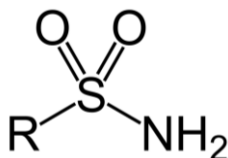


Figura 4.1. Grupo funcional sulfonamido.

Fueron los primeros compuestos de origen sintético que se emplearon desde las primeras décadas de 1900 en el tratamiento de las infecciones bacterianas en el hombre y por ello han marcado un hito en la quimioterapia antiinfecciosa. A pesar del avance que supuso su aparición en la historia de la ciencia, estas sustancias presentan el inconveniente de su toxicidad, la generación de diversos efectos adversos y la escasa solubilidad. Todas estas limitaciones, junto con la aparición de antibióticos más eficaces y la resistencia emergente, disminuyeron drásticamente su uso terapéutico. Ante esta situación, y con el fin de superar estos obstáculos, en el marco disciplinar de la Química Medicinal se ha profundizado en los estudios de Relación de Estructura Actividad (REA), que permitieron posteriormente implementar una enorme cantidad de modificaciones estructurales con el fin último de potenciar y mejorar sus propiedades farmacocinéticas (Ovung et al., 2021).

Debido a que en la actualidad estos fármacos presentan una gran variedad de bioactividades se los puede categorizar de manera global en dos grandes grupos: Sulfonamidas Antibacterianas (SA) y Sulfonamidas no antibacterianas. Ambas contienen el núcleo sulfonamido, pero difieren en sus bioactividades, que varían con los diferentes sustituyentes presentes en la estructura química. Además, las SA poseen una amina aromática en su estructura. Considerando algunos de sus efectos indeseados, se ha buscado direccionar la selectividad de las SA hacia otro tipo de receptores biológicos, con la consecuente aparición de nuevas aplicaciones terapéuticas. Como resultado, la familia de las sulfamidas se ha ampliado a un total de más de veinte mil compuestos, con diferentes tipos de propiedades farmacológicas además del efecto antibacteriano. A pesar de que fueron encontradas hace casi un siglo, su desarrollo en términos de cantidad, calidad, capacidad y productividad se ha

prolongado debido al creciente número de estudios sobre la síntesis de nuevos y antiguos derivados de sulfonamida (Kumar Verma et al., 2020).

4.2. DESCUBRIMIENTO DE LAS SULFONAMIDAS

El médico alemán Gerard Domagk y los químicos, Fritz Mietzsch y Josef Klarer, estudiaron el efecto de varios colorantes sintéticos sobre las enfermedades infecciosas. Realizaron una búsqueda sistemática sobre una gran variedad de compuestos químicos desarrollando pruebas *in vitro* e *in vivo*. En principio, la mayoría de los compuestos en estudio resultaron negativos frente a las pruebas de susceptibilidad antibacteriana *in vitro*, incluida la sulfacrisoidina. Sin embargo, siguiendo las teorías de la “bala mágica” de Erlich, Domagk inoculó sulfaimidocrisoidina a ratones infectados por estreptococos, demostrando de este modo su actividad antibacteriana. Este compuesto fue nombrado Prontosil rubrum y patentado en 1935 como Prontosil (El-Gaby et al., 2020).

Paralelamente, Fournau y col. descubrieron que el enlace azo (-N=N-) de la molécula de prontosil era rápidamente clivado, una vez que ingresaba en el organismo, liberando al residuo *p*-aminobencenosulfonamida o Sulfanilamida (SNA). La SNA fue entonces establecida como el principio activo del prontosil y éste es considerado el primer profármaco descubierto en la historia de los antibióticos (Fig. 4.2).

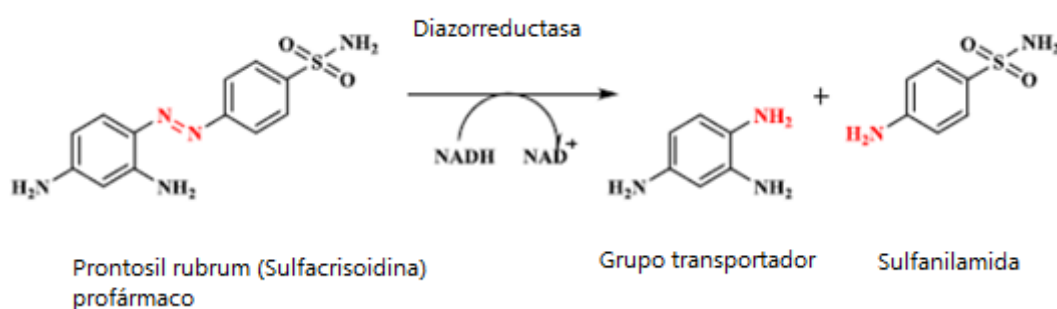


Figura 4.2. Transformación metabólica del prontosil (Zhao et al. 2019).

El descubrimiento de Domagk impulsó la búsqueda de nuevos derivados de SA con propiedades antimicrobianas, motivo por el cual ganó el Premio Nobel de Medicina en 1939 (Hassanein, 2019).

El trabajo de Tréfouël y col. fue fundamental para comprender que el efecto antibacteriano observado se debía a la bioactivación promovida por la enzima

azoreductasa, que provoca la reducción del grupo azo a un grupo amino ($-\text{NH}_2$), produciendo sulfanilamida, que es la sustancia activa (Azevedo Barbosa et al., 2020).

Woods descubrió que la SNA inhibe el crecimiento bacteriano y que esta inhibición podría revertirse con la adición de extracto de levadura que contenía ácido *p*-aminobenzoico (PABA). Luego se comprobó que el efecto antibacteriano de la SNA era antagonizado con la administración de PABA (Azevedo Barbosa et al., 2020).

En la década de 1940, la SNA fue el compuesto más utilizado para tratar heridas abiertas e infecciones intestinales durante la Segunda Guerra Mundial (Swain et al., 2020).

La producción de SA perdió su entusiasmo con la introducción de nuevos antibióticos. Sin embargo; con la epidemia de SIDA en la década de 1980 y la prevalencia de la neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, las SA surgieron como el fármaco de elección para tratar y prevenir esta enfermedad (Hassanein, 2019).

4.3. MECANISMO DE ACCIÓN

La biosíntesis de ácido fólico en una bacteria ocurre mediante la intervención de dos enzimas, la Dihidropteroato Sintasa (DHPS) y la Dihidrofolato Reductasa (DHFR) (Sköld, 2000). Las SA son sustratos de la enzima DHPS y antagonistas competitivos del PABA, un compuesto necesario para la síntesis del ácido fólico y, por lo tanto, para la producción de ADN en las bacterias. Sin ácido fólico, las bacterias no pueden dividirse, lo que hace que los fármacos SA sean bacteriostáticos en lugar de bactericidas. La similitud estructural entre las SA y el PABA (**Figura 4.3**) es la base del efecto inhibidor (Tacic et al., 2017). Woods, presentó el modo de acción antibacteriana de las SA en 1940 y sugirió que, debido a su similitud estructural, existía una relación competitiva entre el PABA y las SA durante pruebas *in vitro*. En 1942, Bell y col. demostraron que las distancias interatómicas entre los dos átomos de oxígeno del grupo carboxilo y del grupo sulfonilo eran muy similares, alrededor de 2,3 Å. Además, la distancia entre estos grupos y el grupo 4-amino es muy similar: en el PABA es de 6,7 Å y en la SNA es de 6,9 Å (**Figura 4.3**). (Azevedo Barbosa et al., 2020). Por ello, el grupo sulfonamida de la SNA y el ácido carboxílico del PABA son considerados bioisómeros con características similares respecto a la distribución electrónica, polaridad y disposición estérica (Culletta et al., 2023).

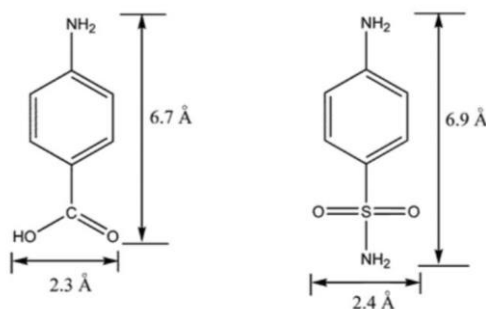


Figura 4.3. Similitud estructural del PABA y SNA (Tacic et al., 2017).

El mecanismo de acción presenta dos etapas: la inhibición competitiva de la DHPS y la incorporación de una molécula de sulfonamida en lugar de PABA en un intermediario metabólico falso que no puede ser convertido en dihidrofolato por la DHPS, impidiendo el crecimiento del ADN bacteriano y la división o replicación celular (**Fig. 4.4**) (Pareek et al., 2013).

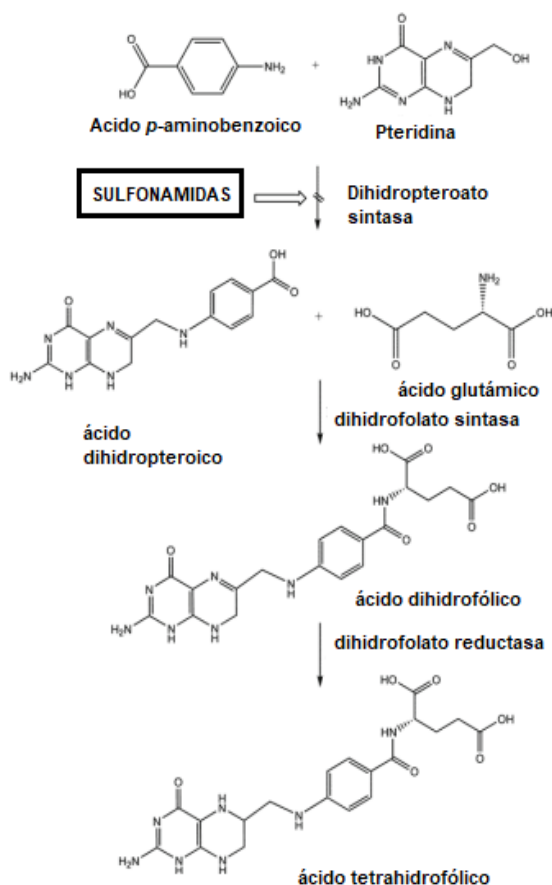


Figura 4.4. Mecanismo de acción de las Sulfonamidas (Tacic et al., 2017.)

La vía biosintética del ácido fólico está presente en bacterias, plantas y organismos eucariotas unicelulares, pero está ausente en los mamíferos, que no sintetizan folato sino que lo adquieren a través de la ingesta de alimentos. El ácido fólico desempeña sus funciones sólo después de su conversión en ácido tetrahidrofólico por la enzima DHFR (Ovung et al., 2021). Consecuentemente la toxicidad de las SA es selectiva a las células bacterianas y no impiden el crecimiento ni desarrollo de las células humanas.

4.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA A LAS SULFONAMIDAS

Las bacterias pueden ser inherentemente resistentes a los fármacos antimicrobianos (resistencia inherente) o pueden adquirir la resistencia de dos maneras diferentes (resistencia adquirida): ya sea mediante evolución vertical endógena o mediante evolución horizontal exógena (Courvalin 2008; Laws et al. 2019). La evolución vertical se refiere a la obtención de resistencia a partir de una mutación que ocurre espontáneamente dentro del genoma bacteriano y que posteriormente se transfiere a su descendencia; mientras que la evolución horizontal describe la transferencia de genes de resistencia entre bacterias no relacionadas (Laws et al., 2019; Ovung et al., 2021).

Los organismos que pueden absorber ácido fólico del entorno circundante, por ejemplo, los enterococos, son inherentemente resistentes a las SA. Las cepas de *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Proteus* suelen ser muy resistentes, al igual que *Rickettsiae*, *Mycoplasmas* y la mayoría de las *Chlamydia*. Las vías alternativas de síntesis de ácido fólico también pueden contribuir a la resistencia de bajo nivel (Giles et al., 2019).

En la resistencia adquirida mediada por cromosomas, es posible que la mutación cromosómica en el gen folP de *E. coli* provoque la sustitución del residuo de fenilalanina en la posición 28 por el residuo de isoleucina, lo que resulta en una menor afinidad de la enzima por las SA (Sköld, 2000). Mutaciones similares pueden ser responsables de la resistencia de *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter jejuni*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus mutans* (Buwembo et al., 2013). En el caso de *Neisseria meningitidis*, las diferencias en el gen folP entre cepas resistentes y sensibles son casi del 10%, lo que indica que la resistencia es causada por recombinación, en lugar de mutaciones puntuales (Sköld, 2000).

Por ejemplo, en los estafilococos, la resistencia mediada cromosómicamente implica una mutación en los genes que codifican la DHPS. Estas enzimas DHPS mutantes exhiben una pronunciada insensibilidad a las SA mientras mantienen una unión normal al sustrato de PABA, a pesar de la estrecha similitud estructural entre el inhibidor y el sustrato.

Hasta la fecha se han descubierto cuatro genes móviles de resistencia a las SA, denominados Sul1, Sul2, Sul3 y Sul4, y cada uno de ellos codifica una enzima alterada con afinidad reducida. La resistencia a las SA mediada por plásmidos es causada por la DHPS resistente, codificada por los genes sul1 y sul2. El gen Sul1 está vinculado a otros genes de resistencia en los integrones de clase 1, mientras que sul2 suele localizarse en plásmidos pequeños. Se ha confirmado que los genes sul1 y sul2 son responsables de la resistencia de *E. coli* a SMX y Sulfametrol (Livermore et al., 2014). La frecuencia de estos genes en aislados clínicos Gram-negativos resistentes a las SA es aproximadamente similar. Se desconoce el origen de estos genes (Tacic et al., 2017). Debido a que las SA actúan de manera competitiva, la sobreproducción de PABA también puede anular la inhibición competitiva de la DHPS (Hassanein, 2019).

4.5. CLASIFICACIÓN

Las SA representan un gran grupo de fármacos que pueden clasificarse de diferentes formas. Una de las más completas es la siguiente clasificación que contempla la vía de administración (Tacic et al., 2017):

- a- SA orales que pueden absorberse:
 - ✱ Acción corta (3-8 h): sulfametizol
 - ✱ Acción intermedia (8-18 h): SMX, sulfacetamida, sulfadiazina
 - ✱ Acción prolongada (>35 h): sulfadimetoxina, sulfadioxina
- b- SA orales que no se pueden absorber: cumplen su función en el tracto gastrointestinal. Generalmente son profármacos tales como ftalilsulfatiazol y succinilsulfatiazol
- c- SA tópicas: tratamiento de infecciones y quemaduras de la piel y las mucosas, como la sulfadiazina de plata.

4.6. RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA- ACTIVIDAD BIOLÓGICA

4.6.1. FARMACÓFORO

Todas las SA contienen el grupo funcional $-\text{SO}_2\text{-NH}-$ unido a una arilamina ($-\text{Ar-NH}_2$), a su vez uno de los sustituyentes del N_1 puede ser hidrógeno, alquilo, grupos arilo o heteroarilo de 5 o 6 miembros (Giles et al., 2019; Ovung et al., 2021) (**Figura 4.5**).

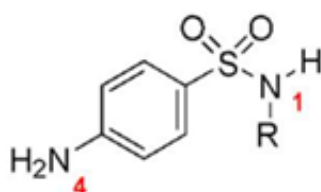


Figura 4.5. Farmacóforo de las Sulfonamidas.

El prototipo de las SA es la SNA (4-aminobencenosulfonamida). Debido a la síntesis de productos más eficientes, la SNA hoy en día se usa muy raramente en la terapia. Sin embargo, es la base estructural y funcional de toda la clase de SA (Tacic et al., 2017).

4.6.2. INFLUENCIA DE LA SUSTITUCIÓN EN LAS DIFERENTES POSICIONES DEL FARMACÓFORO

Se han realizado múltiples modificaciones estructurales con la finalidad de optimizar las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de las SA.

El anillo heterocíclico sustituyente de N_1 aumenta la acidez del protón N_1H , lo que permite una mejor similitud con el protón ácido de PABA. El aumento de la acidez mejora en gran medida la solubilidad en agua, lo cual es importante ya que las formas no disociadas de estas moléculas y sus metabolitos acetatados tienen baja solubilidad, lo que puede generar la cristaluria. Por otra parte, hay estudios que indican que estos grupos adicionales son el factor principal que causa alergias (Giles et al., 2019).

Existe una relación directa entre la acción biológica y la acidez del grupo sulfonamida, siendo la sustancia más ácida la que presenta mayor actividad. Este aumento de acidez se debe al efecto electrón atrayente del sustituyente unido al N_1

(generalmente un sustituyente heteroaromático de 5 ó 6 átomos), razón por la cual el grupo sulfonamida debe estar monosustituído. Una doble sustitución en la posición N1 conduce a compuestos inactivos. Además, el grupo sulfonamida debe estar directamente unido al anillo benceno. La reducción o pérdida completa de la actividad también ocurre cuando se reemplaza el anillo benceno por otro sistema cíclico (Tacic et al., 2017). Remko y col. estudiaron la geometría de diferentes sustancias bioactivas de aril y heteroaril sulfonamida, tanto en su forma neutra como aniónica. Informaron que el grupo sulfonamida ($-\text{SO}_2\text{NH}_2$) existe en dos formas estables (sinperiplanar y antiperiplanar), que difieren sólo por la posición del grupo $-\text{NH}_2$ en relación con el grupo $-\text{SO}_2$, siendo la sinperiplanar la más estable (Azevedo Barbosa et al., 2020).

Un grupo $-\text{NH}_2$ (N4) aromático libre en posición *para*, con respecto al grupo sulfonamida, es esencial para la actividad de las SA. La presencia de sustituyentes adicionales en las posiciones orto y meta del anillo benceno reduce la actividad.

El grupo $-\text{NH}_2$ de (N4) solo admite sustituyentes biorreversibles, como en el caso de amidas, iminas y compuestos azo, que se convertirán *in vivo* en el grupo amino (Azevedo Barbosa et al., 2020). Este grupo exhibe coplanaridad con el anillo aromático, dando como resultado el efecto de resonancia del par de electrones desapareados del nitrógeno en el grupo amino con los electrones π del anillo aromático.

4.7. SULFANILAMIDA Y SULFAMETOXAZOL

4.7.1. ESTRUCTURA QUÍMICA

Se muestran las estructuras químicas de las SA con las cuales se trabajó en la tesis. La SNA según la IUPAC es la 4-aminobenzenosulfonamida y el Sulfametoxazol (SMX) es la 4-amino-N-(5-metilisoxazol-3-il)-bencenosulfonamida. Las estructuras químicas se muestran en la **Figura 4.6**.

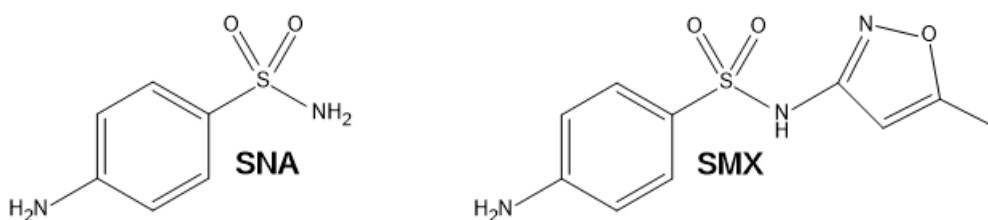


Figura 4.6. Estructura química de SNA y SMX.

4.7.2. COMPORTAMIENTO ÁCIDO BASE

Las SA son ácidos débiles que se ionizan mediante la desprotonación del nitrógeno sulfonamídico, como resultado del efecto electrón atrayente que ejerce el enlace $\pi S=O$. En consecuencia, la base conjugada formada (sulfonamidato) se estabiliza mediante resonancia, como se puede ver en la **Figura 4.7** (Azevedo Barbosa et al., 2020).

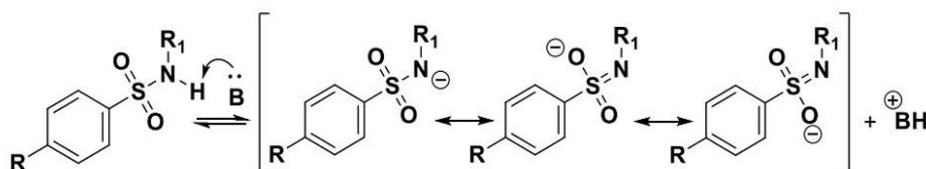


Figura 4.7. Mecanismo de desprotonación del grupo sulfonamida, seguido de la formación de la base conjugada estabilizada por efecto de resonancia (Azevedo Barbosa et al., 2020).

La mayoría de las SA también presentan un grupo básico, el grupo 4-amino, que las convierte en moléculas anfóteras. Por ello tienen dos valores de pK_a , el pK_{a1} con valores comprendidos entre 2 y 2,5 asociados con el grupo amino protonado, y el pK_{a2} con valores entre 5 y 8 asociados con el grupo sulfonamida.

Como se muestra en la **Fig. 4.8**, las SA están presentes en forma catiónica a valores de pH inferiores a 2, se mantienen neutras a valores de pH entre 2 y 5 y están en forma aniónica a valores de pH superiores a 5 (Azevedo Barbosa et al., 2020).

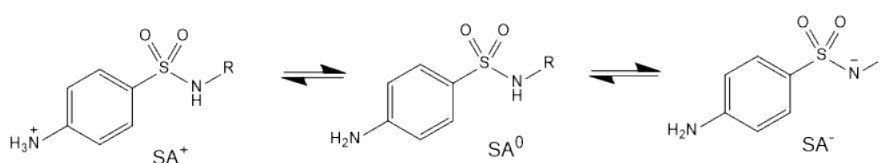


Figura 4.8. Constantes de disociación pK_{a1} y pK_{a2} de SA en su forma: **SA⁺** (catiónica), **SA⁰** (neutra) y **SA⁻** (aniónica).

4.7.3. SOLUBILIDAD

SMX pertenece al grupo IV del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) dadas sus limitaciones en cuanto a hidrosolubilidad y permeabilidad (Markovic et al., 2020).

La mayor parte de las SA se absorben bien por vía oral y se distribuyen por todo el organismo, incluido el sistema nervioso central. Debido a su lipofilidad pueden cruzar la barrera hematoencefálica, por ello se las puede utilizar para el tratamiento de infecciones del SNC provocadas por bacterias susceptibles (*Listeria monocytogenes*, *Nocardia asteroides* y *Stenotrophomonas maltophilia*), y también para infecciones fúngicas o parasitarias como por ejemplo paracoccidioidomicosis y toxoplasmosis (Nau et al., 2010).

La naturaleza de los grupos sustituyentes unidos a la sulfonamida puede modificar la solubilidad de la sustancia, lo que resulta en tasas variables de absorción y excreción y en estos parámetros se basa la clasificación descrita en la Sección 4.3. Las SA logran altas concentraciones renales, lo que las hace ideales para el tratamiento de infecciones del tracto urinario. Sin embargo, las SA y sus metabolitos tienen baja solubilidad en orina, lo que provoca efectos nocivos como cristaluria y hematuria en el tejido renal (Azevedo Barbosa et al., 2020). Modificaciones estructurales que generan derivados con características más ácidas mejoran este aspecto aumentando la concentración de especies ionizadas e hidrosolubles a pH urinario.

4.8. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS

La biotransformación de las SA se lleva a cabo principalmente en el hígado. Se compone principalmente de reacciones de oxidación y acetilación (Fase I) del átomo de nitrógeno N4 del grupo amino y reacciones de conjugación del ácido glucurónico (Fase II) con el átomo de nitrógeno N1 del grupo sulfonamida, como se muestra en la **Fig. 4.9** (García-Galán et al., 2008).

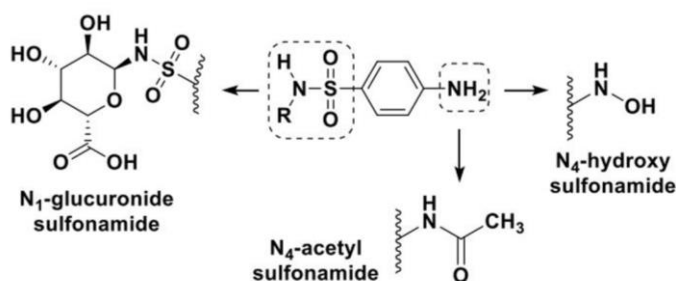


Figura 4.9. Metabolitos de las SA: N-hidroxilados, N-acetilados y el conjugado con ácido glucurónico (García-Galán et al., 2008).

Los metabolitos N-acetilados inactivos se eliminan por orina, mientras que los metabolitos N-hidroxilados pueden oxidarse en repetidas ocasiones, lo que da como resultado el intermediario nitroso tóxico ($-N=O$). Sin embargo, este intermediario se inactiva mediante conjugación con glutatión (Azevedo Barbosa et al., 2020).

4.9. ESPECTRO ANTIMICROBIANO – APLICACIONES TERAPÉUTICAS

Las SA son antimicrobianos de amplio espectro de acción, eficaces contra bacterias Gram-positivas y determinadas cepas Gram-negativas. Son bacteriostáticas y normalmente existe un período de latencia antes de que se observe el efecto. Esto se debe a que las bacterias tienen que consumir las reservas existentes de ácido fólico, ácido folínico, purinas, timidina y aminoácidos (Hassanein, 2019).

Algunas de las bacterias Gram-negativas susceptibles incluyen especies de *Klebsiella*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Enterobacter*; sin embargo, las SA no muestran actividad inhibidora contra las especies de *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia*. Se utilizan en el tratamiento de amigdalitis, septicemia, meningitis meningocócica, disentería bacilar y varias infecciones del tracto urinario. También muestran actividad inhibidora contra algunos hongos (*Pneumocystis carinii*) y protozoos (*Toxoplasma*, *Coccidia*).

Una aplicación más amplia de las SA en la terapia antibacteriana es limitada debido a la resistencia bacteriana y los efectos secundarios. Sin embargo, las SA todavía representan los fármacos de primera elección para el tratamiento de algunas afecciones y enfermedades (Tapic, 2017). Están lejos de ser obsoletas a pesar de la introducción de nuevas clases de antibióticos. El interés en su uso revivió en la década de 1980 con la epidemia de SIDA, la combinación SMX/Trimetoprima (TMP) es el fármaco de elección para el tratamiento de la neumonía por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes con SIDA y otros pacientes inmunocomprometidos con riesgo de padecer esta neumonía oportunista. La combinación también protege contra la toxoplasmosis y la malaria en quienes habitan en zonas endémicas (Hassanein, 2019; El-Gaby et al., 2020).

El SMX es un antibiótico bacteriostático que se usa con mayor frecuencia para tratar infecciones de oído, Infecciones del Tracto Urinario (ITU), bronquitis, diarrea del viajero, shigelosis y neumonía por *Pneumocystis jirovecii*. Al ser un fármaco de clase II de SCB, tiene escasa hidrosolubilidad ($\sim 0,5$ mg/ml), lo que genera la necesidad de administrar dosis altas de 800 mg/día. Una combinación de SMX, 800 mg y TMP,

160 mg se ha utilizado durante mucho tiempo como terapia de primera línea para las ITU. Aunque el uso extensivo de SMX/TMP ha resultado en una aparición progresiva de resistencia, y se han reportado tasas de cepas resistentes de más del 20 % en varios países, lo que limita la eficacia clínica en el tratamiento de las ITU, como se reconoce en las pautas clínicas. Como resultado del aumento de los problemas de resistencia y tolerabilidad, el uso de SMX ha disminuido gradualmente. Por lo tanto, mejorar la solubilidad y el comportamiento de disolución de SMX podría ayudar en una posible reducción del régimen de dosificación mientras se mantiene la eficacia terapéutica a una dosis más baja y se minimizan los efectos secundarios debido a las altas dosis (Roy et al., 2022).

Los efectos secundarios que se observaron en algunas SA se potenciaron a través de la farmacomodulación, convirtiendo a los derivados estructurales en cabezas de serie útiles para el desarrollo de otros grupos de fármacos. El interés en las SA ha aumentado a medida que su amplia gama de bioactividad y su estructura versátil los convierten en excelentes candidatos para reutilizar medicamentos antiguos o desarrollar nuevos agentes de múltiples objetivos en el campo emergente de la polifarmacología.

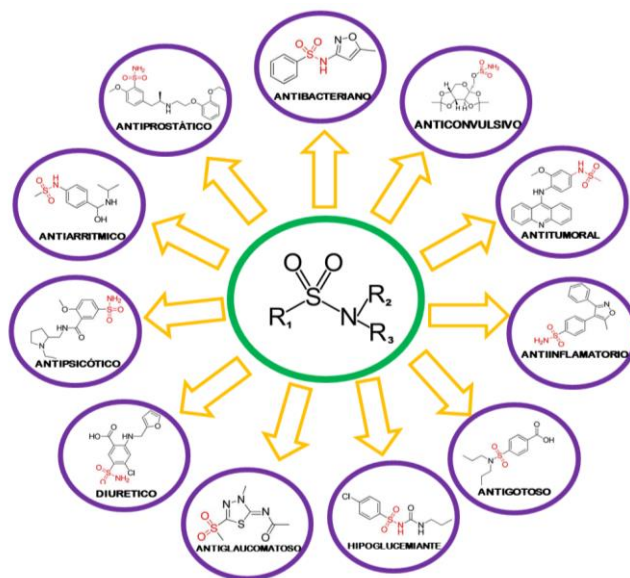


Figura 4.10. Otros usos de las SA (Adaptado de Zhao et al. 2019).

Los derivados de SA incluyen una amplia gama de actividades biológicas tales como: antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, antioxidante, diuréticos, anticancerígenos, inhibidores de enzimas (como la anhidrasa carbónica), antitumoral,

enfermedad de Alzheimer, antituberculosa, antidiabética, inhibidores de la proteasa del VIH, antiglaucoma, antiobesidad, antiviral, antipalúdica, antagonistas no peptídicos de los receptores de vasopresina e inhibidores del inicio de la traducción, y en la quimioterapia contra el cáncer (**Figura 4.10**). Recientemente, los ésteres derivados de SA se han estudiado como inhibidores de la proliferación celular (Hassanein, 2019; Danish et al., 2021).

4.10. EFECTOS ADVERSOS – TOXICIDAD

4.10.1. EFECTO TOXICOLÓGICO

Algunos de los factores que influyen en el efecto toxicológico incluyen el tiempo de vida media y la dosis del fármaco, existencia del anillo heterocíclico sustituido en N1, su solubilidad en sangre y en otros fluidos biológicos, el estado del riñón, edad y estado nutricional del paciente (Shmukler et al. 2000). El efecto tóxico de los metabolitos es muy común porque las enzimas del citocromo P450 oxidan N para producir metabolitos reactivos de hidroxilamino (Azevedo Barbosa et al., 2020). La mayoría de los factores de riesgo incluyen: un fenotipo acetilador lento, una dosis alta de fármaco, una inmunodeficiencia grave y una deficiencia de glutatión. En algunos casos el sistema inmunológico identifica a las SA como un alérgeno (Giles et al., 2019).

Las SA compiten con la bilirrubina al unirse a las proteínas plasmáticas, lo que puede causar kernicterus en los recién nacidos. Por lo tanto, no se deben usar en bebés recién nacidos ni durante los dos últimos meses de embarazo. Además, por este mismo motivo, es posible que aumente la concentración plasmática de algunos fármacos, potenciando su efecto, por ejemplo, anticoagulantes, derivados hipoglucemiantes de la sulfonilurea y anticonvulsivos como hidantoína, por lo que es importante evitar la toma de estos fármacos al mismo tiempo (Tacic et al., 2017).

4.10.2. EFECTO AMBIENTAL

El uso excesivo e indebido de antibióticos y su liberación al medio ambiente puede representar potencialmente una amenaza para los animales y las comunidades microbianas en el suelo y el medio acuático. Las SA son antibióticos de uso frecuente para animales (por ejemplo, ganado vacuno y porcino) y humanos para el tratamiento de enfermedades bacterianas. Tanto después como durante el uso de estos IFA, una alta fracción se excreta sin metabolizar, a través de la orina o las heces, y estas

excreciones luego se liberan al medio ambiente como estiércol o aguas residuales. Se encontró que las SA existen en niveles bajos, pero detectables, en los tejidos comestibles de animales productores de carne tratados con estos IFA. (Ovung et al., 2021).

4.11. CONCLUSIONES

Uno de los hitos más importantes de la medicina en el avance del tratamiento de enfermedades infecciosas, contribuyendo a la reducción de las tasas de mortalidad, fue el descubrimiento de los antibióticos y la introducción de las SA en el arsenal terapéutico. En el pasado, el término "sulfa" se utilizó para referirse a los compuestos antibacterianos de sulfonamida que fueron descubiertos por Gerhard Domagk a mediados de los años 1930. Sin embargo, desde entonces, este término se ha utilizado para describir una variedad de moléculas que contienen el grupo funcional sulfonamida como parte de su estructura química.

Las sulfonamidas han dado origen a una gran variedad de compuestos con diversas actividades biológicas, las más amplias de todas las moléculas de fármacos. Esta característica, junto con su versatilidad estructural y la gran cantidad de información disponible, las convierte en excelentes candidatos para el desarrollo de alternativas más efectivas y seguras a los fármacos actuales para una variedad de enfermedades. Se prevé que la investigación sobre las aplicaciones para un solo objetivo y para múltiples objetivos continúe avanzando.

4.12. BIBLIOGRAFÍA

Azevedo-Barbosa, H.; Días, D. F.; Franco, L. L.; Hawkes, J. A.; Carvalho, D. T. From Antibacterial to Antitumour Agents: A Brief Review on the Chemical and Medicinal Aspects of Sulfonamides. *Mini Rev. Med. Chem.* 2020, 20 (19), 2052–2066. <https://doi.org/10.2174/1389557520666200905125738>.

Buwembo, W.; Aery, S.; Rwenyonyi, C. M.; Swedberg, G.; Kironde, F. Point Mutations in the *folP* Gene Partly Explain Sulfonamide Resistance of *Streptococcus Mutans*. *Int. J. Microbiol.* 2013, 2013, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2013/367021>.

Culletta, G.; Tutone, M.; Zappalà, M.; Almerico, A. M. Sulfonamide Moiety as “Molecular Chimera” in the Design of New Drugs. *Curr. Med. Chem.* 2023, 30 (2), 128–163. <https://doi.org/10.2174/0929867329666220729151500>.

Danish, M.; Akhtar, A.; Ashfaq, M.; Arshad, M. N.; Asiri, A. M. Synthesis Crystal Structure and Spectral Properties of New Sulfonamides. *J. Chem. Crystallogr.* 2021, 51 (4), 543–552. <https://doi.org/10.1007/s10870-021-00878-1>.

El-Gaby M.S.A., Ammar Y.A., El-Qaliei M.I.H., Ali A.M., Hussein M.F., Faraghally F.A. Sulfonamides: Synthesis and the recent applications in medicinal chemistry. *Egyptian Journal of Chemistry.* 2020, 63 (12), 5289-5327. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2020.33860.2707>

García-Galán, M. J.; Silvia Díaz-Cruz, M.; Barceló, D. Identification and Determination of Metabolites and Degradation Products of Sulfonamide Antibiotics. *Trends Analyt. Chem.* 2008, 27 (11), 1008–1022. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.10.001>.

Giles, A.; Foushee, J.; Lantz, E.; Gumina, G. Sulfonamide Allergies. *Pharmacy (Basel)* 2019, 7 (3), 132. <https://doi.org/10.3390/pharmacy7030132>.

Hassanein, M. M. Sulfonamides: Far from Obsolete. *Int. J. Contemp. Pediatr.* 2019, 6 (6), 2740. <https://doi.org/10.18203/2349-3291.ijcp20194768>.

Kumar Verma, S.; Verma, R.; Xue, F.; Kumar Thakur, P.; Girish, Y. R.; Rakesh, K. P. Antibacterial Activities of Sulfonyl or Sulfonamide Containing Heterocyclic Derivatives and Its Structure-Activity Relationships (SAR) Studies: A Critical Review. *Bioorg. Chem.* 2020, 105 (104400), 104400. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104400>.

Laws, M.; Shaaban, A.; Rahman, K. M. Antibiotic Resistance Breakers: Current Approaches and Future Directions. *FEMS Microbiol. Rev.* 2019, 43 (5), 490–516. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz014>.

Livermore, D. M.; Mushtaq, S.; Warner, M.; Woodford, N. Comparative in Vitro Activity of Sulfametrole/Trimethoprim and Sulfamethoxazole/Trimethoprim and Other Agents against Multiresistant Gram-Negative Bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014, 69 (4), 1050–1056. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt455>.

Markovic, M.; Zur, M.; Ragatsky, I.; Cvijić, S.; Dahan, A. BCS Class IV Oral Drugs and Absorption Windows: Regional-Dependent Intestinal Permeability of Furosemide. *Pharmaceutics* 2020, 12 (12), 1175. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121175>.

Nau, R.; Sörgel, F.; Eiffert, H. Penetration of Drugs through the Blood-Cerebrospinal Fluid/Blood-Brain Barrier for Treatment of Central Nervous System Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010, 23 (4), 858–883. <https://doi.org/10.1128/cmr.00007-10>.

Ovung, A.; Bhattacharyya, J. Sulfonamide Drugs: Structure, Antibacterial Property, Toxicity, and Biophysical Interactions. *Biophys. Rev.* 2021, 13 (2), 259–272. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00795-9>.

Pareek A, Rani P, Kishore D. A short review on: Sulphonamides. *Int J. Pharm. Bio. Sci.* 2013, 4(1), 812–820

Roy, P.; Pandey, N.; Kumari, N.; Baidya, R.; Mary, Y. S.; Mary, Y. S.; Ghosh, A. Development of Sulfamethoxazole-Succinimide Cocrystal by Mechanochemical Cocrystallization – An Insight into Spectroscopic, Electronic, Chemical Conformation and Physicochemical Properties. *Chem. Eng. Res. Des.* 2022, 185, 446–457. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2022.07.012>.

Shmukler, B. E.; Brugnara, C.; Alper, S. L. Estructura y Polimorfismo Genético Del Gen KCC1 Del Ratón. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1492, 353–361.

Sköld, O. Sulfonamide Resistance: Mechanisms and Trends. *Drug Resist. Updat.* 2000, 3 (3), 155–160. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0146>.

Swain, S. S.; Paidesetty, S. K.; Padhy, R. N. Phytochemical Conjugation as a Potential Semisynthetic Approach toward Reactive and Reuse of Obsolete Sulfonamides against Pathogenic Bacteria. *Drug Dev. Res.* 2021, 82 (2), 149–166. <https://doi.org/10.1002/ddr.21746>

Tacic, A.; Nikolic, V.; Nikolic, L.; Savic, I. Antimicrobial Sulfonamide Drugs. *Adv. Technol.* 2017, 6 (1), 58–71. <https://doi.org/10.5937/savteh1701058t>.

Zhao, C.; Rakesh, K. P.; Ravidar, L.; Fang, W.-Y.; Qin, H.-L. Pharmaceutical and Medicinal Significance of Sulfur (SVI)-Containing Motifs for Drug Discovery: A Critical Review. *Eur. J. Med. Chem.* 2019, 162, 679–734. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.11.017>.

Capítulo 5

CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE NOR Y SMX: VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

5.1. INTRODUCCIÓN	93
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	95
5.2.1. Control de Materia Prima Comercial y Material de Referencia	95
5.2.2. Calibrado de equipos y materiales, entrenamiento del personal	96
5.2.3. Preparación de soluciones estándar	96
5.2.4. Realización de curvas de calibración	97
5.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO	97
5.3.1. Linealidad	97
5.3.2. Límite de detección y Límite de cuantificación	98
5.3.3. Rango Lineal y Dinámico.....	99
5.3.4. Precisión.....	99
5.3.5. Especificidad	100
5.3.6. Exactitud.....	101
5.4. RESULTADOS	102
5.4.1. Espectros de Absorción.....	102
5.4.2. Validación del método	103
5.5. CONCLUSIÓN	110
5.6. BIBLIOGRAFÍA	110

5.1. INTRODUCCIÓN

Dada la importancia terapéutica de las Fluorquinolonas (FQ), se han validado numerosos métodos analíticos para su determinación a granel, en formulaciones farmacéuticas y/o en fluidos biológicos. Entre ellas, la técnica espectrofotométrica es la más utilizada en el análisis farmacéutico. También se han utilizado otros métodos analíticos como la espectrofluorimetría (Perianua et al., 2019), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Zheng et al., 2019) el análisis electroquímico, y la electroforesis capilar (Chierentin et al., 2016; Tamires Macedo et al., 2019). Para el análisis cuantitativo de la materia prima Norfloxacin (NOR), la Farmacopea Argentina (FA), la Farmacopea Británica (BP), y la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) recomiendan la titulación en medio no acuoso, mientras que para la cuantificación de NOR en comprimidos recomiendan el uso de HPLC (Avila, et al. 2023).

Sulfametoxazol (SMX) también es un fármaco oficial codificado en la FA y en BP, USP y la Farmacopea Europea (EP). La USP describe una metodología de HPLC para la cuantificación de SMX, mientras que la FA, la BP y la EP recomiendan la reacción de aminas aromáticas primarias por diazotización con ácido nitroso y la determinación del punto final potenciométricamente. Otros métodos analíticos informados son fluorescencia, espectrofotometría, métodos inmunoquímicos, electroforesis capilar y HPLC-MS o HPLC-MS/MS (Dmitrienko et al., 2014; Rege et al., 2019).

En virtud de que en las metodologías experimentales planteadas en el plan de trabajo de esta tesis doctoral se basan en el trabajo simultáneo con FQ y Sulfonamidas Antibacterianas (SA), fue necesario desarrollar un método analítico relativamente sencillo y rápido que permitiera la cuantificación simultánea de pares de estas sustancias. Es por ello que nos propusimos emplear la espectrofotometría UV-Vis. Sin embargo, la principal limitación con respecto a estos IFA es la superposición de las bandas de absorción al UV en la región comprendida entre los 250 a 300 nm (**Figura 5.1**).

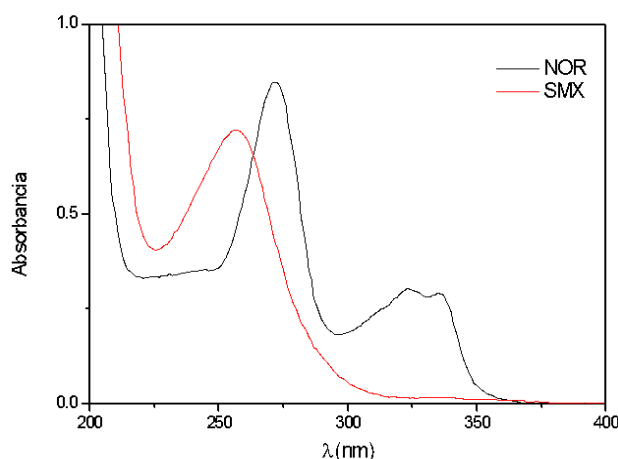


Figura 5.1. Espectros de NOR $1,6 \cdot 10^{-5}$ M (línea negra) y SMX $1,5 \cdot 10^{-5}$ M (línea roja).

Esto restringe su medición directa cuando se usa espectrofotometría UV-Vis. En las últimas dos décadas, la espectrofotometría derivada ha mostrado un importante desarrollo en la determinación de mezclas de dos o más componentes con bandas superpuestas y ha permitido eliminar interferencias o fondo de matriz utilizando, por ejemplo, la técnica de cruce por cero o “zero crossing” del inglés (Redasani et al., 2018). La primera derivada de un espectro de absorción UV-Vis es empleada frecuentemente para detectar picos solapados o escondidos, constituyéndose en una característica identificatoria del analito en cuestión. Este método es especialmente útil para resolver los espectros superpuestos debido a su simplicidad inherente, bajo costo, velocidad satisfactoria, precisión adecuada y amplia disponibilidad (Andretta et al., 1989).

La International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) ha acordado dos directrices para los requisitos de validación: Q2 (R1) y Q2B. La primera resume y define las características requeridas para una variedad de tipos de procedimientos de ensayo, mientras que la segunda describe los datos experimentales necesarios y su interpretación estadística. Al respecto, dado que en la literatura no se encontró otro método analítico simple, de bajo costo y rápido para cuantificar simultáneamente NOR y SMX, se validó el método de espectrofotometría UV-Vis de derivada primera.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

NOR (L130666) y SMX (L98071) se obtuvieron comercialmente del Laboratorio Parafarm, Argentina. Se utilizó agua destilada para preparar hidróxido de sodio 0,1 M y buffer fosfato pH 7,4 (FA 7 Ed.).

Las mediciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Varian Cary 50 de doble haz conectado a una computadora compatible cargada con el software Win UV 3.00 (Agilent) utilizado para el registro de todas las mediciones de absorbancia y procesamiento de datos. Todas las soluciones se escanearon en un rango de longitud de onda comprendido entre 200 y 400 nm y una velocidad de escaneo media (0,9 nm/min). La fuente de radiación fue una lámpara de xenón y se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico.

5.2.1. CONTROL DE MATERIA PRIMA COMERCIAL Y MATERIAL DE REFERENCIA

Ante la falta de disponibilidad de material de referencia, se propuso la preparación de un estándar interno de trabajo para cada IFA. Este proceso involucró la purificación de las sustancias mediante recristalización, seguida de su caracterización y evaluación de pureza por medio de la determinación de su punto de fusión y perfil cromatográfico.

En primer lugar, se pesaron 300 mg de NOR y la misma cantidad de SMX obtenidos del producto comercial y se disolvieron en 25 mL de etanol, aplicando agitación y calentamiento en un sistema de reflujo. El sistema se mantuvo en calentamiento durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar la solución para favorecer la recristalización y realizar una posterior filtración al vacío. El residuo sólido obtenido se dejó secar en desecador por 24 h.

Posteriormente se determinó el punto de fusión de cada sustancia en un fusiómetro Optimelt MPA100, seleccionando el inicio del calentamiento 10 °C por debajo del punto de fusión de cada sustancia obtenido de bibliografía. La velocidad de aumento de temperatura fue de 1°C/min.

Además, se determinó la pureza de las sustancias mediante Cromatografía en Capa Delgada (CCD) según las técnicas reportadas en cada caso:

NOR (Wang et al., 1997): La Fase Estacionaria (FE) fue de sílica gel 60 F254 con soporte de aluminio (Merck). Los cromatofolios se trataron previamente con una

solución de EDTA 0,27 M ajustado a pH 7. Una vez secos se sembraron las muestras y se colocó la placa en una atmósfera de amoníaco durante 10 minutos. Por último, se transfirió la placa a una cuba sin saturar conteniendo la Fase Móvil (FM) cloroformo: metanol: tolueno: diclorometano: hidróxido de amonio (2,7:4,6:1,7:0,5:0,5 v/v). La siembra fue puntual, los sólidos se disolvieron en CH_2Cl_2 : MeOH (1:1). Se efectuó el desarrollo ascendente de la fase móvil y finalizada la cromatografía, se procedió al revelado mediante luz UV-Vis (254 y 365 nm).

SMX (Klein et al., 1971): La FE fue sílica gel 60 F254 con soporte de aluminio (Merck). Como FM se seleccionaron: I- acetato de etilo: metanol: hidróxido de amonio (17:6:5) y II- éter de petróleo: cloroformo: n-butanol (1:1:1). La siembra fue puntual y los sólidos se disolvieron previamente en diclorometano: metanol (1:1). Se efectuó el desarrollo ascendente de la fase móvil y finalizada la cromatografía, se procedió al revelado mediante luz UV- 254 nm.

5.2.2. CALIBRADO DE EQUIPOS Y MATERIALES, ENTRENAMIENTO DEL PERSONAL

Se realizó la calibración de los materiales y equipos utilizados en la validación. El personal encargado de realizar los ensayos analíticos está formado por 2 alumnas de posgrado entrenadas para tal fin.

5.2.3. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ESTÁNDAR

Se prepararon soluciones estándar de NOR y de SMX de concentración 6×10^{-3} M mediante disolución de los IFA en buffer fosfato de pH 7,4. Las alícuotas de solución estándar se diluyeron adicionalmente hasta obtener un volumen final de 10 mL con buffer 7,4 obteniendo soluciones de trabajo de concentración comprendida entre $1,50 \times 10^{-6}$ y $3,18 \times 10^{-5}$ M. Las soluciones de trabajo se prepararon tres veces al día a partir de la misma solución madre. El experimento completo se repitió durante tres días consecutivos. Todas las soluciones estuvieron protegidas de la luz durante todo el estudio.

Por otra parte, se prepararon soluciones estándar de combinaciones de NOR y SMX. Para ello, alícuotas de la solución madre de cada IFA se transfirieron a una serie de matraces volumétricos de 10 mL y se diluyeron en buffer fosfato de pH 7,4 a fin de preparar seis muestras equimolares de NOR y SMX.

5.2.4. REALIZACIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN

Se utilizaron siete soluciones estándar de trabajo de NOR y siete de SMX para construir las curvas de calibración. El análisis de regresión lineal se realizó mediante el método de mínimos cuadrados. La intensidad de absorción se midió en un rango de 200 a 400 nm, obteniéndose máximos de absorción de 257 nm para SMX y 272 nm para NOR, usando buffer pH 7,4 como blanco. Las derivadas de primer orden de los espectros ($dA/d\lambda$) se obtuvieron matemáticamente con el programa OriginPro® 8.5, a partir del espectro de absorbancia. Los espectros con mayor orden de derivación presentaron menor sensibilidad y linealidad, por lo tanto, solo se seleccionaron espectros de derivadas de primer orden para realizar el análisis cuantitativo.

5.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

El método propuesto fue validado en cuanto a linealidad, exactitud, precisión, límites de detección y de cuantificación y selectividad de acuerdo con la guía de ICH (Borman et al., 2017).

5.3.1. LINEALIDAD

La linealidad es la capacidad del método analítico para brindar resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad de analito en un rango definido, siguiendo la Ley de Lambert-Beer. Los resultados del estudio de linealidad se tabularon relacionando las concentraciones de las soluciones y su respuesta instrumental (absorbancia), expresando su relación matemáticamente como una recta de regresión lineal de la forma $y=a+bx$, obtenida mediante el método de ajuste de mínimos cuadrados. Se analizaron siete concentraciones diferentes de NOR y SMX en el rango 0,32 – 6,30 $\mu\text{g/mL}$ y 0,25 – 5,00 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente ($9,9 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-5}$ M). Cada una de ellas se realizó por triplicado, resultando en un total de 18 determinaciones ($K=7$, $n=3$).

Popularmente, se recurre al parámetro R o coeficiente de correlación como prueba de linealidad, aunque esto resulta incorrecto debido a que dicho parámetro sólo mide la relación entre dos variables aleatorias, sin tener mucho sentido en la calibración analítica ya que los valores de concentración no se encuentran distribuidos al azar (Olivieri, 2003). A pesar de esto, existen diversos métodos y test para evaluar la linealidad, de los cuales algunos se mencionan a continuación:

5.3.1.1. Hipótesis del intercepto

Un indicativo de linealidad es que el intercepto de la regresión no difiera significativamente de cero, por lo que se evaluó a través del estadístico t de Student, con un grado de significancia de $\alpha = 0,05$. Se plantearon las siguientes hipótesis:

- * H_0 = El intercepto no es diferente de cero
- * H_1 = El intercepto es significativamente distinto de cero

5.3.1.2. Relación entre la varianza de la regresión y la del ruido instrumental

Otra opción para evaluar la linealidad implica examinar la relación entre la varianza de la regresión (s_x/y) y la del ruido instrumental (s_y). Si la primera es significativamente mayor a la segunda, podemos suponer que existen factores de desvío de la linealidad que son estadísticamente superiores al ruido aleatorio en la respuesta. Para realizar esta prueba se debe cumplir el supuesto bajo el cual se realiza el ajuste lineal, esto es, que los errores en las concentraciones de calibrado sean menores que en la respuesta. De lo contrario, se acumularían incertidumbres provenientes de la imprecisión en la preparación de las concentraciones de calibrado, que no tienen ninguna relación con el ruido instrumental o las pérdidas en la linealidad.

La prueba estadística utilizada para determinar si los datos se ajustan a la linealidad es el test F, en el cual se calcula un valor experimental según la **Ecuación 5.1**:

$$F_{exp} = (s_y/x) / (s_y) \quad \text{Ec. 5.1}$$

Este valor se compara con un valor F teórico para $\alpha=0,05$ y $m-2$ y $m-p$ grados de libertad, en donde m es el número de datos disponibles y p el número de niveles de concentración estudiados.

5.3.2. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El Límite de Detección (LD) de un procedimiento analítico individual es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse como un valor exacto. El Límite de Cuantificación (LQ) es la cantidad más baja de analito en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas. El límite de cuantificación se utiliza particularmente para la determinación de impurezas y/o productos de degradación (ICH, 2023).

La ICH recomienda estimar dichos límites utilizando uno de los siguientes enfoques (Borman, et al. 2017)

- ✓ Basado en la inspección visual
- ✓ Basado en la relación señal/ruido
- ✓ Basado en la desviación estándar de una respuesta lineal y su pendiente.

En este caso, se utilizó el criterio basado en la respuesta lineal de la regresión. Los límites fueron calculados de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$LD = 3.3 \frac{\sigma}{s} \quad \text{Ec. 5.2}$$

$$LQ = 10 \frac{\sigma}{s} \quad \text{Ec. 5.3}$$

donde σ es la desviación estándar de la señal analítica y s es la pendiente de la curva de calibración correspondiente.

5.3.3. RANGO LINEAL Y DINÁMICO

El Rango Lineal (RL) comprende desde la menor concentración cuantificable, LQ, hasta la pérdida de la linealidad. El rango dinámico se considera que va desde la menor concentración detectable, LD, hasta la pérdida de la relación entre absorbancia y concentración. En la zona de pérdida de linealidad, en principio, podría aplicarse un método de regresión polinómica para la calibración, por lo que dicha zona podría utilizarse con fines predictivos.

5.3.4. PRECISIÓN

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico, generalmente se expresa como la desviación estándar o desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones (FA 7 Ed.). La ICH Q2B define como ámbito de aplicación de la precisión, la determinación cuantitativa de los principios activos, por lo que se hace necesario evaluar la precisión mediante el estudio de la repetibilidad instrumental y del método, además de la precisión intermedia (Delgado et al., 2013).

5.3.4.1. Repetibilidad

La repetibilidad de un procedimiento analítico, también denominada precisión intraensayo, expresa la precisión bajo las mismas condiciones operativas durante un corto intervalo de tiempo (FA 7 Ed.). Se evaluó la repetibilidad del equipo y del método utilizado.

Para determinar la repetibilidad del equipo se analizó una solución de NOR y una de SMX con una absorbancia nominal ($1,5 \times 10^{-5}$ M) y se determinó su absorbancia 12 veces. El coeficiente de variación debe ser inferior al 1,0 %.

Para la repetibilidad del método, se evaluaron los coeficientes de variación de los valores de la derivada primera para NOR y para SMX medidos en 3 días diferentes por triplicado y a 3 niveles de concentración diferentes.

5.3.4.2. Precisión intermedia

La precisión intermedia, también denominada precisión interensayo, expresa las variaciones dentro de los laboratorios, es decir, las observadas al considerar diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc. (FA7 Ed). En el presente estudio, los procedimientos anteriores se repitieron interdiariamente en tres días sucesivos, en dos equipos diferentes, y con dos analistas diferentes para el análisis de las seis concentraciones seleccionadas. Las muestras se prepararon por duplicado.

Se analizaron los coeficientes de variación promedio de las medidas obtenidas por cada analista a partir de las curvas de calibrado, así como los parámetros de regresión mediante el test t-student y la prueba F de Snedecor para la evaluación de la homogeneidad de varianzas entre analistas.

5.3.5. ESPECIFICIDAD

La especificidad de un procedimiento analítico es la capacidad del método para medir con precisión un compuesto en presencia de otros componentes. El criterio de aceptación de este parámetro es demostrar que la lectura del espectrofotómetro se debe únicamente a la concentración del IFA correspondiente y no a la presencia de otro IFA.

Para evaluar la especificidad del método, se prepararon mezclas de NOR y SMX mediante dos sets de cinco muestras cada uno por triplicado. El primer set se preparó en un rango de concentraciones entre $2,0 \times 10^{-6}$ y $1,5 \times 10^{-5}$ M de NOR con una concentración fija de SMX de $9,9 \times 10^{-7}$ M. El segundo set se preparó utilizando un

rango de concentraciones entre $2,0 \times 10^{-6}$ y $1,5 \times 10^{-5}$ M de SMX con una concentración fija de NOR de $4,9 \times 10^{-6}$ M. Se obtuvieron los espectros de absorción promedio de cada set, así como su derivada de primer orden correspondiente. Para el primer set, se graficó el valor de la derivada primera a 257 nm vs longitud de onda (nm), mientras que para el segundo se utilizó el valor de su derivada primera a 272 nm. Se realizó la prueba t de Student para un nivel de significancia $\alpha = 0,05$ y los grados de libertad seleccionados $t = (n_1 + n_2) - 2$, donde la hipótesis nula indica que las ecuaciones de regresión no tienen diferencias significativas. El valor de t_{exp} se comparó con el valor de t_{tab} .

5.3.6. EXACTITUD

La exactitud del método se evaluó aplicando el método de adición estándar (Andersen, 2017), el cual consiste en agregar cantidades conocidas de un patrón de referencia a las soluciones preparadas a un nivel de 80, 100 y 120% del valor nominal del ensayo para NOR y SMX, ensayándose por triplicado. De esta manera, la exactitud se puede expresar como el porcentaje de recuperación en un método analítico de una cantidad conocida del mismo. El porcentaje de recuperación resulta del cociente entre la concentración experimental obtenida a partir de la curva de calibrado de la derivada de primer orden para cada IFA, y la concentración teórica de la muestra más el patrón añadido.

Se utilizaron concentraciones $9,9 \times 10^{-5}$ M tanto para los patrones como para la preparación de la muestra. La **Tabla 5.1** resume el esquema de preparación de las soluciones.

Tabla 5.1. Preparación de las soluciones

Solución	Nivel	NOR (mL)	SMX (mL)	NOR _{std} (mL)	SMX _{std} (mL)
1	80%	0,5	1	0,4	-
2	100%	0,5	1	0,5	-
3	120%	0,5	1	0,6	-
4	80%	0,5	0,5	-	0,4
5	100%	0,5	0,5	-	0,5
6	120%	0,5	0,5	-	0,6

Std: Estandar

5.4. RESULTADOS

5.4.1. ESPECTROS DE ABSORCIÓN

Se midieron los espectros de absorción de las distintas soluciones de NOR y SMX en buffer pH 7,4. A partir de los espectros de absorción, se obtuvieron los gráficos de derivada de primer orden para SMX y NOR. Aquí, la primera derivada pudo mejorar la resolución de las bandas de absorción superpuestas mediante la aplicación de la técnica de cruce por cero (**Figuras 5.2 y 5.3**). Los órdenes derivados superiores se descartaron porque dieron como resultado un aumento del ruido y una disminución de la sensibilidad. En este caso, los máximos de absorción se evidencian en aquellas longitudes de onda en donde su derivada toma un valor de cero. Estos valores coinciden con aquellos observados en el espectro de absorción.

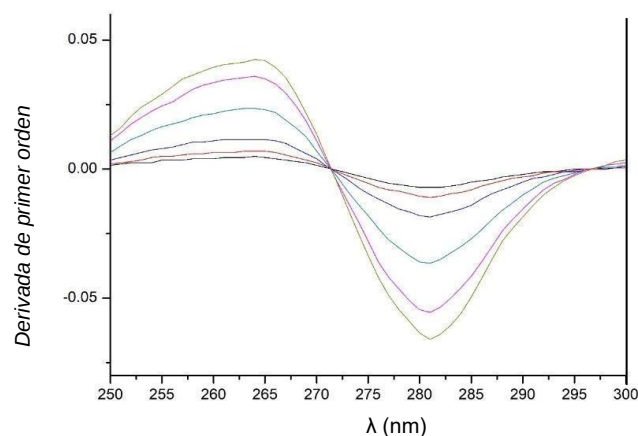


Figura 5.2. Espectro de la primera derivada de NOR ($1,6 \cdot 10^{-6} - 3,18 \cdot 10^{-5} M$).

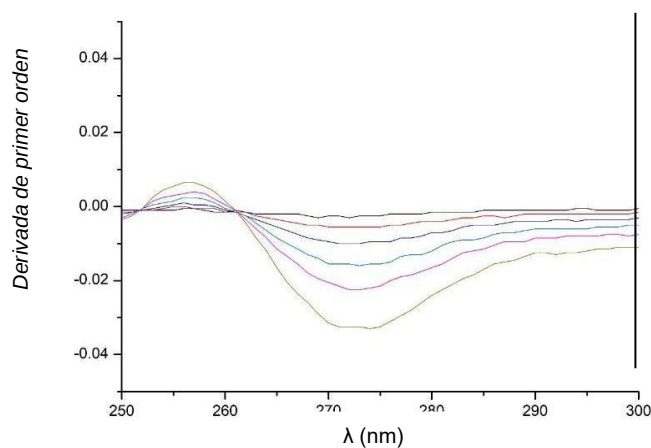


Figura 5.3. Espectro de la primera derivada de SMX ($1,5 \cdot 10^{-6} - 3,0 \cdot 10^{-5} M$).

5.4.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

El método fue validado siguiendo las directrices de la ICH. Se determinaron la linealidad, LD, LQ, el rango, la precisión (repetibilidad y precisión intermedia), la especificidad y la exactitud.

5.4.2.1. Linealidad y rango

Las curvas de calibración para NOR y SMX obtenidas pueden visualizarse en las **Figuras 5.4 y 5.5** respectivamente. En la **Tabla 5.2** se resumen los valores obtenidos para los dos IFA.

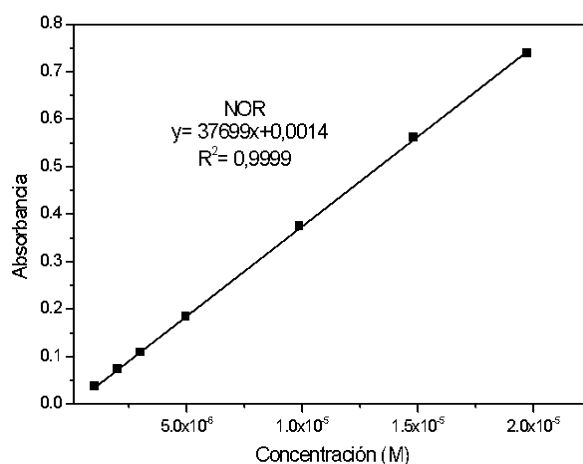


Figura 5.4. Curva de calibración de NOR en buffer pH 7,4.

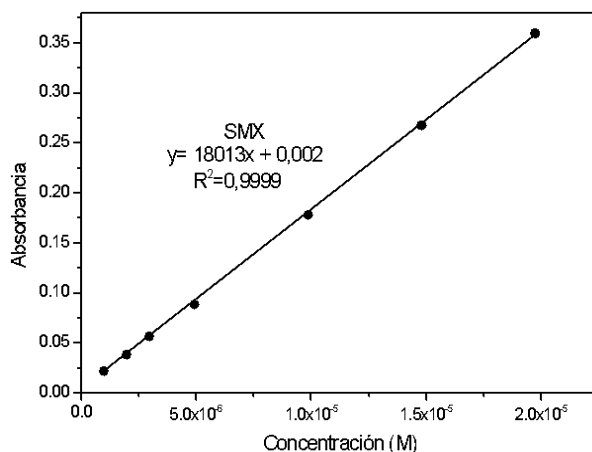


Figura 5.5. Curva de calibración de SMX en buffer pH 7,4.

Como se puede ver en la **Tabla 5.2**, los bajos valores de los coeficientes de correlación y los valores aceptables de los interceptos indican la buena linealidad de las curvas de calibración de NOR y SMX en los rangos de concentración comprendidos entre $3,2 \cdot 10^{-6}$ y $3,2 \cdot 10^{-5}$ M y entre $3,0 \cdot 10^{-6}$ y $3,0 \cdot 10^{-5}$ M respectivamente. Como los valores de t_{exp} son menores a los valores tabulados, no podemos rechazar H_0 y afirmamos, con un nivel de significación $\alpha = 0,05$, que los interceptos no son diferentes de cero y cumplen con la linealidad.

Tabla 5.2. Parámetros de validación del método para la determinación de NOR y SMX

NOR ($\lambda_{m\acute{a}x}$ 272 nm)				SMX ($\lambda_{m\acute{a}x}$ 257 nm)			
Linealidad	CV (%)	t_{tab}	t_{exp}	CV (%)	t_{tab}	t_{exp}	
Intercepto	0,001	-	2,09	0,002	-	2,09	1,50
Pendiente	37698,95	0,07	-	18012,80	0,29	-	-
R^2	0,9999			0,9997			

R^2 : coeficiendte de determinación; CV: Coeficiente de Variación; α : 0,05; t_{tab} : t tabulado, t_{exp} : t experimental.

A continuación, en la **Tabla 5.3**, se listan los valores experimentales y tabulados de la prueba F realizada con el software MATLAB versión R2010a. Como en todos los casos $F_{tab} > F_{exp}$, se cumple la linealidad en todo el intervalo de concentraciones evaluado.

Tabla 5.3. Resultados de la prueba F para evaluación de la linealidad.

Curva de Calibrado	F_{tab}	F_{exp}
NOR	2,40	1,85
SMX	2,40	1,92

5.4.2.2 Límite de detección y límite de cuantificación

En la **Tabla 5.4** se muestran los resultados obtenidos para ambos IFA. La sensibilidad del método propuesto puede ser confirmada por los bajos valores de LD y LQ obtenidos.

Tabla 5.4. LD y LQ de NOR y SMX.

	NOR ($\lambda_{\text{máx}}$ a 272 nm)	SMX ($\lambda_{\text{máx}}$ a 257 nm)
LD (M)	$2,1 \times 10^{-7}$	$2,4 \times 10^{-7}$
LQ (M)	$6,4 \times 10^{-7}$	$7,4 \times 10^{-7}$

5.4.2.3. Rangos

En la **Tabla 5.5** se muestran los rangos lineales y dinámicos obtenidos para NOR y SMX.

Tabla 5.5. Rangos lineales y dinámicos de las curvas de calibrado.

	NOR	SMX
Rango Lineal	$6,4 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-5}$	$7,4 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-5}$
Rango Dinámico	$2,1 \times 10^{-7} - 9,9 \times 10^{-5}$	$2,4 \times 10^{-7} - 9,9 \times 10^{-5}$

5.4.2.4. Precisión

* Repetibilidad

En la **Tabla 5.6** se puede visualizar que se obtuvo un coeficiente de variación de 0,15% para la repetibilidad del equipo, menor al 1% propuesto por la ICH.

Tabla 5.6. Parámetros para la estimación de la repetibilidad del equipo.

	NOR
Desviación estándar	$5,8 \times 10^{-4}$
Promedio (12 replicados)	0,375
CV (%)	0,15

CV: Coeficiente de Variación

Para la repetibilidad del método, se visualizan en la **Tabla 5.7** los promedios del coeficiente de variación tanto para NOR como para SMX. Se obtuvieron coeficientes de variación de 2,17 y 2,90 %, menores al 3% propuesto por la ICH.

Tabla 5.7. Coeficientes de variación para la estimación de la repetibilidad del método.

	Concentración (M)	CV (%)	CV Promedio (%)
NOR	$1,5 \times 10^{-5}$	2,08	2,17
	$9,9 \times 10^{-6}$	2,38	
	$3,0 \times 10^{-6}$	2,05	
SMX	$1,5 \times 10^{-5}$	3,13	2,90
	$9,9 \times 10^{-6}$	3,12	
	$3,0 \times 10^{-6}$	2,46	

CV: Coeficiente de Variación

★ Precisión intermedia

Las **Figuras 5.6 y 5.7** representan las curvas de calibrado de los valores de la derivada de primer orden de la absorbancia en función de la concentración de NOR y de SMX medidas a 257 nm y 272 nm respectivamente, realizadas por ambos analistas. Los parámetros de los ensayos de precisión intermedia se visualizan en la **Tabla 5.8**.

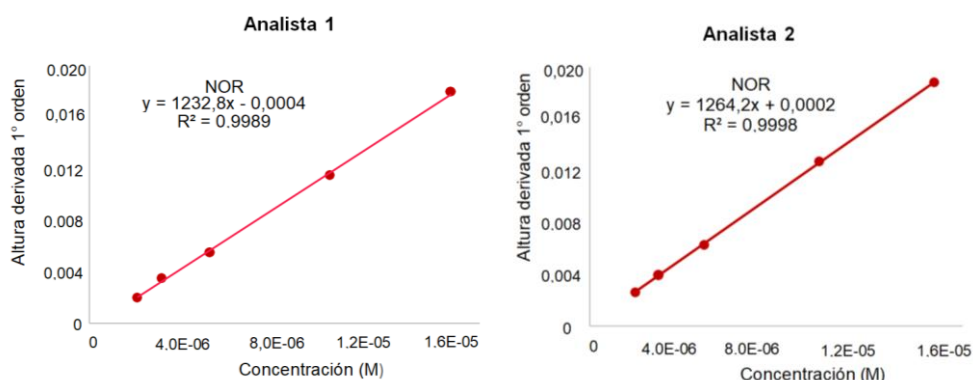


Figura 5.6. Comparación entre las curvas de calibrado de NOR realizadas por dos analistas utilizando derivada de primer orden del espectro de absorción.

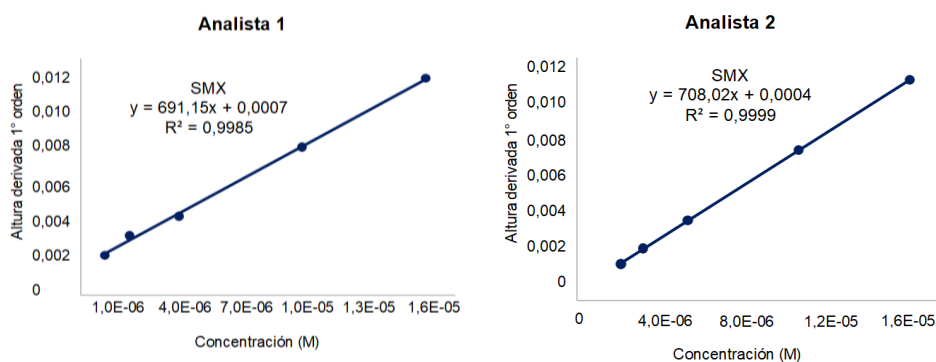


Figura 5.7. Comparación entre las curvas de calibrado de SMX realizada por dos analistas utilizando derivada de primer orden del espectro de absorción.

Tabla 5.8. Parámetros obtenidos de los ensayos de precisión intermedia

	NOR (dA/dλ 257nm)				SMX (dA/dλ 272nm)			
	Analista 1	Analista 2	t _{tab}	t _{exp}	Analista 1	Analista 2	t _{tab}	t _{exp}
Intercepto	-4,13E ⁻⁴	1,6E ⁻⁴	2,78	2,73	7,25E ⁻⁴	4,4E ⁻⁴	2,78	2,15
Pendiente	1232,82	1264,18	2,78	1,25	691,15	708,02	2,78	1,07
R²	0,9989	0,9998			0,9985	0,9999		

R²: coeficiente de determinación; t_{tab}: t tabulado, t_{exp}: t experimental

Al comparar los valores de t_{exp} con los valores tabulados, podemos aceptar la hipótesis nula, por lo que las ecuaciones de regresión son similares y el método es reproducible en condiciones de analistas, días, reactivos y equipos diferentes.

Por otro lado, se analizó la reproducibilidad del método mediante una prueba F para varianzas de dos muestras, utilizando n -1 grados de libertad (**Tabla 5.9**).

Tabla 5.9. Prueba F para varianzas de dos muestras.

Precisión Intermedia	F _{tab}	F _{exp}
NOR (dA/dλ 257nm)	6,40	4,63
SMX (dA/dλ 272nm)	6,40	4,43

Como F_{exp} < F_{tab}, podemos afirmar que ambas mediciones son consistentes entre sí y no existen grandes variaciones en las mediciones entre ambos analistas.

En la práctica se utilizó el mismo lote de NOR y SMX por lo que no se cumpliría el requisito de independencia de las muestras para hacer el test, pero se realiza igualmente de forma comparativa.

Por último, se evaluó la precisión intermedia mediante los coeficientes de variación obtenidos a partir de las medidas realizadas por triplicado, lo cual refleja la dispersión de las medidas entre ambos analistas (**Tabla 5.10**). Se observó que los coeficientes de variación promedio son menores al doble de los coeficientes de variación correspondientes a la repetibilidad del método, por lo que verificamos que no existen grandes diferencias entre ambos analistas en condiciones diferentes de trabajo.

Tabla 5.10. Coeficientes de variación para la estimación de la precisión entre analistas.

		Concentración (M)	CV (%)	CV Promedio (%)
ANALISTA 1	NOR + SMX FIJO-	$1,5 \times 10^{-5}$	1,68 – 0,26	
	SMX + NOR FIJO	$9,9 \times 10^{-6}$	1,26 – 1,90	2,41 – 2,12
		$3,0 \times 10^{-6}$	3,01 – 4,19	
ANALISTA 2	NOR + SMX FIJO-	$1,5 \times 10^{-5}$	0,80 – 0,78	
	SMX + NOR FIJO	$9,9 \times 10^{-6}$	0,71 – 0,27	0,75 – 0,67
		$3,0 \times 10^{-6}$	0,76 – 0,97	

CV: coeficiente de variación

5.4.2.5. Especificidad

La selectividad del método se evaluó analizando los gráficos de derivada de primer orden (**Figura 5.8**) de mezclas de NOR y SMX (concentración fija) y SMX y NOR (concentración fija) respecto a la de sus componentes puros (**Figura 5.9**).

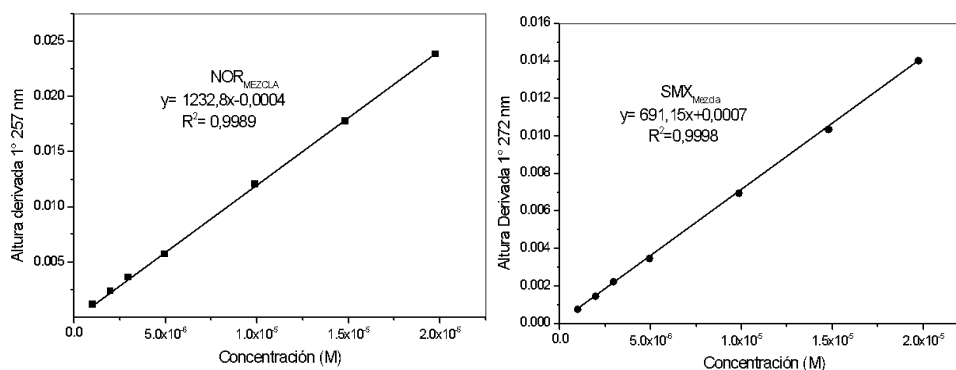


Figura 5.8. Curva de calibrado de NOR y SMX en mezclas utilizando derivada de 1° orden.

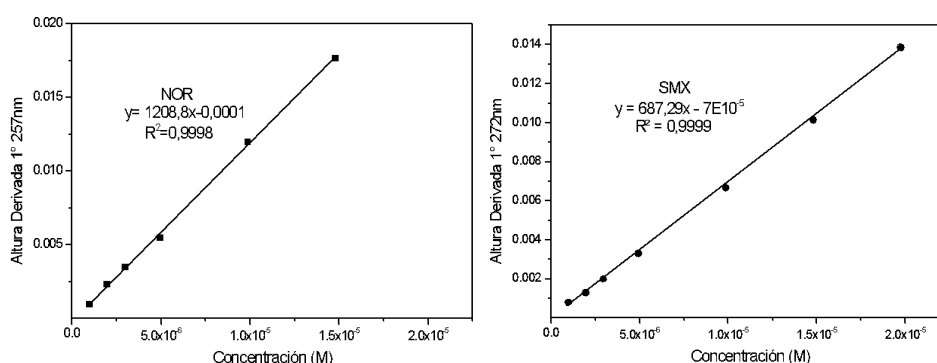


Figura 5.9. Curva de calibrado de NOR y SMX en estado puro utilizando derivada de 1° orden.

Para estimar la similitud de las ecuaciones de regresión se realizó un test-t de Student con un nivel de significación $\alpha = 0,05$ y $n = (n_1 + n_2) - 4$ grados de libertad, en dónde la hipótesis nula (H_0) indica que las ecuaciones de la regresión no poseen diferencias significativas en términos de su pendiente. Los resultados se exhiben en la **Tabla 5.11**. Al comparar los valores de t_{exp} con los valores tabulados, podemos aceptar la hipótesis nula, por lo que las ecuaciones de regresión son similares y no existirían interferencias entre los IFA, pudiéndose así cuantificar el analito en las mezclas.

Tabla 5.11. Evaluación de la especificidad del método para NOR y SMX.

	NOR (dA/dλ a 257nm)				SMX (dA/dλ a 272nm)			
	NOR	NOR _{mezcla}	t_{tab}	t_{exp}	SMX	SMX _{mezcla}	t_{tab}	t_{exp}
Intercepto	-1,5E ⁻⁴	-4,13E ⁻⁴	2,78	0,98	-6,9E ⁻⁵	7,25E ⁻⁴	2,78	2,82
Pendiente	1208,85	1232,82	2,78	0,75	687,29	691,15	2,78	0,24
R²	0,9990	0,9989			0,9999	0,9985		

R^2 : coeficiente de determinación; t_{tab} : t tabulado, t_{exp} : t experimental

5.4.2.6. Exactitud

Los porcentajes de recuperación de ambos IFA en la mezcla se calcularon según la ecuación de regresión correspondiente. Se encontró que los porcentajes recuperados en los tres niveles diferentes mencionados anteriormente para NOR y SMX oscilan entre 100,94 % y 92,97 %. Los porcentajes de recuperación para NOR y SMX figuran en la **Tabla 5.12**. La recuperación para NOR se encuentra dentro del porcentaje esperado, aunque para SMX se encuentra por debajo del 100%, posiblemente por la presencia de interferentes (efecto matriz).

Tabla 5.12. Porcentajes de recuperación para NOR y SMX según el método de adición estándar.

Cantidad agregada (%)	Recuperación (%)	
	NOR	SMX
80	100,94 ± 1,31	92,97 ± 1,38
100	100,44 ± 1,18	93,17 ± 0,60
120	100,03 ± 1,88	93,33 ± 0,27

5.5. CONCLUSIÓN

La presente investigación es la primera en utilizar un método espectrofotométrico derivado para determinar simultáneamente NOR y SMX en solución. Utilizando el método de cruce por cero de la primera derivada en los espectros UV, fue posible realizar la determinación y cuantificación de cualquiera de estos IFA en presencia de la otra sin separación previa. El método demostró buenas características de linealidad, precisión, selectividad y precisión. El método propuesto fue validado y se observa que es simple, de bajo costo e independiente de instrumentos costosos o reactivos contaminantes. Este método demostró ser apto para ser aplicado en análisis de rutina de mezclas de NOR y SMX en laboratorios de control de calidad siendo una herramienta muy útil para determinar estos fármacos en una mezcla, sin largos procedimientos de separación.

5.6. BIBLIOGRAFÍA

Andersen, J. E. T. The Standard Addition Method Revisited. *Trends Analyt. Chem.* **2017**, 89, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.12.013>.

Andreetta, H. A.; Rimada, R. S.; Giménez, N. T. Análisis Simultáneo de Mezclas de Trimetoprima y Sulfametoxazol por el Método de Ceros Cruzados. *Acta Farm. Bonaerense*. **1989**, 8 (3), 157-63.

Avila, C. D.; Ayala Gómez, R.; Mazzieri, M. R.; Pinto Vitorino, G. Simultaneous Determination of Norfloxacin and Sulfadiazine by First-Derivative Spectrophotometry. *J. Chem. Lett.* **2023**, 4, 130–135.

Borman, P.; Elder, D. Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. In *ICH Quality Guidelines*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **2017**, 127–166.

Chierentin L.; Nunes Salgado, H. R. Review of Properties and Analytical Methods for the Determination of Norfloxacin. *Crit Rev Anal Chem.*, **2016**, 46, 22-39.

Conference on Harmonization (ICH), ICH Q2(R2); Guideline on Validation of Analytical Procedures; Geneva, Switzerland, 2023.

Delgado, D. R.; Rodríguez, G. A.; Martínez, J. A.; Rojas, J H.; Martínez, F. Validación de una metodología analítica empleando espectrofotometría ultravioleta

para el estudio de la solubilidad de algunas sulfonamidas en mezclas cosolventes. *Revista Colombiana de Química*. **2013**, 42 (3), 387-412.

Dmitrienko, S. G.; Kochuk, E. V.; Apyari, V.; Tolmacheva, V.; Zolotov, Y. Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamide detection - a review. *Anal. Chim. Acta.*, **2014**, 850, 6-25.

European Pharmacopoeia. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (2011).

Farmacopea Argentina, 7° edición. (2013). Ministerio de Salud de la Nación.

Olivieri, A. C. Curso de Quimiometría: Calibraciones Univariada y Multivariada de Primer Orden. *Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas*; Argentina, **2003**.

Perianua, E.; Raua, I.; Vijan, L.E. DNA influence on Norfloxacin fluorescence. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. **2019**, 206, 8-15.

Redasani, V. K.; Patel, P. R.; Marathe, D. Y.; Chaudhari, S. R.; Shirkhedkar, A. A.; Surana, S. J. A Review on Derivative UV-Spectrophotometry Analysis of Drugs in Pharmaceutical Formulations and Biological Samples Review. *J. Chil. Chem. Soc.* **2018**, 63 (3), 4126–4134. <https://doi.org/10.4067/s0717-97072018000304126>.

Rege, P.; Meyer, K.; Kapadia, N. Simultaneous determination of norfloxacin and metronidazole from combined tablet dosage formulation by spectrophotometry. *Pharma Innov.*, **2019**, 8, 975-979.

Tamires Macedo, R.; Roveda, A. C.; Pereira da Silva Godinho, W.; Alves Martins, C.; Oliveira, P. R.; Aparecido, M.; Gonçalves, T. Electrochemical cell designed for in situ integrate microextraction and electroanalysis: Trace-level determination of Norfloxacin in aqueous simples. *Talanta*. **2019**, 196, 39-46.

The British Pharmacopoeia Vol. I, II. London: Her Majesty's Stationary Office. Electronic Version (2007).

The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology; Geneva, Switzerland, **2005**.

United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 32-NF 27). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention (2009).

Zheng, Y.; Wang, Z.; Lui, G.; Hirt, D.; Treluyer, J. M.; Benaboud, S.; Aboura, R.; Gana, I. Simultaneous quantification of levofloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin, and

moxifloxacin in micro volumes of human plasma using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Biomed. Chromatogr. **2019**, 33, e4506.

Capítulo 6

COMPORTAMIENTO FISICOQUÍMICO DE FLUORQUINOLONAS Y SULFONAMIDAS EN SOLUCIÓN

6.1. INTRODUCCIÓN	114
6.1.1. Espectroscopía UV-Vis.....	114
6.1.2. Termocromismo.....	115
6.1.3. Solvatocromismo	115
6.1.4. Solvatación preferencial	119
6.2. ESTUDIOS DE INTERACCIONES ENTRE FLUORQUINOLONAS EN SOLUCIÓN	121
6.3. ESTUDIOS DE INTERACCIONES ENTRE SULFONAMIDAS EN SOLUCIÓN	122
6.4. MATERIALES Y MÉTODOS	122
6.4.1. Espectrofotometría UV-Visible: Efecto del aumento de concentración.....	122
6.4.2. Estudio Termocrómico.....	123
6.4.3. Estudio Solvatocrómico	124
6.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	129
6.5.1. Fluorquinolonas en solución.....	129
6.5.2. Sulfonamidas en solución.....	142
6.5.3. Mezclas de FQ-SA en solución	152
6.6. CONCLUSIONES.....	163
6.7. BIBLIOGRAFÍA	164

6.1. INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista macroscópico, un disolvente es un continuo caracterizado por constantes físicas macroscópicas tales como punto de ebullición, presión de vapor, densidad, presión cohesiva, índice de refracción, permitividad relativa, conductividad térmica, tensión superficial, entre otras. Es el medio por el que se transporta calor hacia y desde reacciones químicas endo y exotérmicas. Desde el punto de vista microscópico molecular, un disolvente es una discontinuidad que consta de moléculas individuales que interactúan entre sí, caracterizadas por propiedades moleculares como el momento dipolar, la polarizabilidad electrónica, la capacidad de donar enlaces de hidrógeno o aceptarlos (Reichardt, 2007).

Para evaluar la conducta de los Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA) en solución se planteó el objetivo de estudiar la capacidad de interacción intra e intermolecular entre Fluorquinolonas (FQ) y Sulfonamidas Antibacterianas (SA) y con el solvente. Esto se puede llevar a cabo a través de ensayos espectrofotométricos de incremento de concentración, termocromismo, solvatocromismo y de solvatación preferencial, tal como se desarrolla en este capítulo. Se consideró importante realizar estos estudios para visualizar previamente los equilibrios intra e intermoleculares y recabar información acerca de la tendencia de estos IFA a interactuar entre sí y con el solvente. La generación de heterocomplejos entre FQ y SA da indicio de posibles interacciones que podrían ocurrir, también, en el estado sólido.

6.1.1. ESPECTROSCOPIA UV-VIS

La asociación molecular en solución entre soluto-soluto y soluto-solvente se ha estudiado con espectrofotometría UV-Vis. Se ha observado que a medida que aumenta la concentración de las soluciones, muchas moléculas de estructura aromática muestran un coeficiente de extinción más bajo. Este hecho se cree que es el resultado de la autoasociación de las moléculas del soluto. Además, cuando hay más de una especie en una solución, como monómeros o dímeros, generalmente se observan puntos isosbéticos (Aiyama et al., 1992). Además, se puede observar la heteroasociación molecular en los espectros de absorción de soluciones que incluyen la concentración estable de una sustancia y concentraciones aumentadas del segundo componente. Un indicio de heteroasociación en este caso es un desplazamiento batocrómico e hipercrómico de una banda de absorción (Botolin et al., 2006).

6.1.2. TERMOCROMISMO

La estructura molecular determina el mecanismo responsable del termocromismo. Puede ser el resultado de un equilibrio entre dos especies moleculares (ácido-base, ceto-enol o lactima-lactama), una apertura de anillo o la formación de radicales libres, entre otros (Day, 1963). Los estudios termocrómicos evalúan la absorbancia de una solución a diferentes temperaturas. La aparición de puntos isobésticos indica la existencia de equilibrio intermolecular. Si los espectros se intersectan, pero no todos en el mismo lugar, es decir sin puntos isobésticos, se puede inferir que ocurren varios equilibrios simultáneos en la solución.

Los cambios específicos inducidos por la temperatura en varios tipos de espectros pueden ser una fuente de información valiosa sobre el sistema investigado. En el análisis de la evolución térmica de los espectros electrónicos se pueden estimar los momentos dipolares de las moléculas, el tipo de los cambios estructurales o determinar las propiedades termodinámicas y cinéticas del equilibrio fotoquímico (Kalka et al., 2021).

6.1.3. SOLVATOCROMISMO

Los datos solvatocrómicos ayudan a comprender la estructura electrónica y las interacciones moleculares de sustancias en diferentes entornos. El solvatocromismo explora la relación entre la estructura electrónica de una molécula y el entorno (disolvente) que la rodea. Esta área de investigación tiene aplicaciones en múltiples áreas de la química y de las ciencias de los materiales. Los estudios de solvatocromismo brindan a los investigadores información valiosa sobre el comportamiento de las moléculas, incluida su polaridad, capacidad de formación de enlaces de hidrógeno y otras propiedades específicas de los disolventes (Homocianu, 2024).

El espectro de absorción de un soluto en solventes de diferente polaridad puede alterarse en la posición del máximo de absorción, la intensidad e incluso la forma de las bandas. Estos cambios, conocidos como solvatocrómicos, son el resultado de interacciones intermoleculares soluto-solvente, que pueden clasificarse en: i) asociaciones no específicas causadas por efectos de polaridad-polarizabilidad tales como ión-dipolo y dipolo-dipolo; y ii) asociaciones específicas tales como uniones puente hidrógeno o interacciones donoras o aceptoras de electrones. Las interacciones alteran la diferencia de energía entre los estados fundamental y excitado

de las especies absorbentes. El efecto del solvente en el espectro de absorción puede utilizarse para recabar información acerca de las interacciones soluto-solvente (Santo et al., 2003).

La presencia de un equilibrio intramolecular se evidencia por un corrimiento batocrómico o hipsocrómico del espectro, como se esquematiza en la **Fig. 6.1**. El solvatocromismo positivo, también conocido como batocrómico o corrimiento al rojo, ocurre cuando la banda de absorción se desplaza a una longitud de onda más larga. El solvatocromismo negativo, también conocido como hipsocrómico o desplazamiento hacia el azul, ocurre cuando la banda de absorción cambia a una longitud de onda más corta a medida que aumenta la polaridad del entorno de solvatación. Puede observarse un solvatocromismo negativo cuando, a medida que aumenta la polaridad del solvente, se produce un corrimiento hipsocrómico de una banda de absorción en el UV. Ésto ocurre como consecuencia de una mayor estabilización del estado fundamental por solvatación. Un solvatocromismo positivo, con un corrimiento batocrómico, está indicando una mayor estabilización de la molécula en el primer estado excitado (Homocianu, 2024).

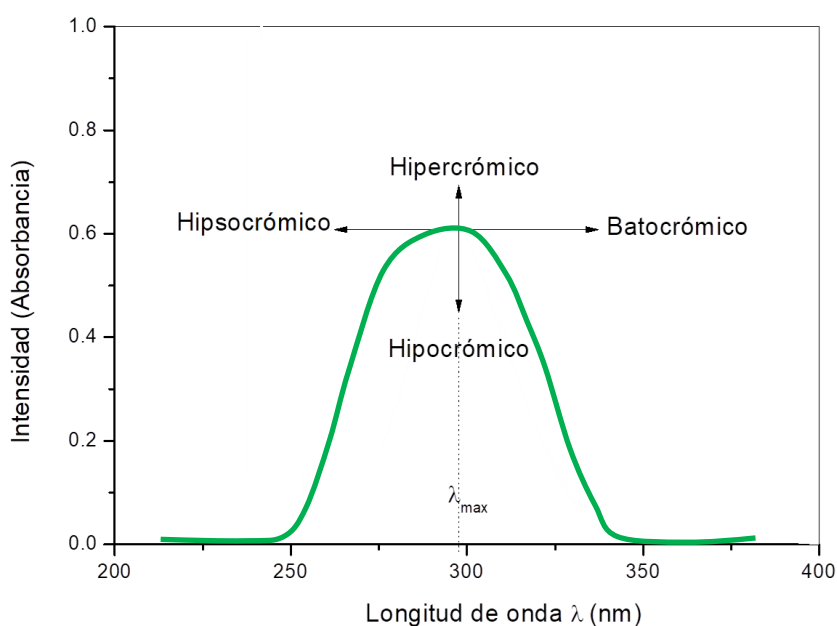


Figura 6.1. Cambios en la posición de absorción y la intensidad de la banda.

Debido a la complejidad de las interacciones en las soluciones, es posible que las teorías tradicionales no expliquen completamente todos los factores que influyen en el cambio espectral. Las teorías básicas sobre líquidos a menudo ignoran interacciones específicas, como los enlaces puente de hidrógeno y reacciones ácido-base, que pueden describirse utilizando otros métodos empíricos.

Para abordar este problema, se han desarrollado varias técnicas para cuantificar la contribución de los descriptores de los solventes a la variación espectral total utilizando Relaciones Lineales de Energía de Solventes (RLES).

La distinción entre interacciones soluto-solvente específicas y no específicas en la interpretación de determinaciones experimentales de espectros de absorción es difícil. Por tanto, es necesario considerar medidas cuantitativas de polaridad para diferenciar entre estos dos efectos. Así, se han desarrollado varias ecuaciones multiparamétricas que combinan dos o más parámetros del disolvente para explicar los aspectos particulares y distintivos del efecto del disolvente sobre un determinado compuesto, entre ellas, las de Kamlet y Taft (Almandoz et al., 2014; Miotke et al., 2017), Catalán (Catalán et al., 1995) y Laurence (Laurence et al., 2015) son las más utilizadas (Kamlet y Abboud et al., 1983; Kamlet y Doherty et al., 1983).

El método de Relaciones Lineales de Energía Libre (RLEL) de Kamlet y Taft (Miotke et al., 2017) racionaliza el efecto del solvente en términos de una combinación lineal de tres variables: el parámetro α , que describe la capacidad ácida del solvente de donar un protón mediante una unión puente hidrógeno, el parámetro β , que proporciona la medida de la capacidad básica del solvente de aceptar uniones hidrógeno y el parámetro π , que se relaciona con el efecto de polaridad-polarizabilidad del solvente y mide la capacidad del medio de estabilizar las cargas de un dipolo en virtud de sus efectos dieléctricos. Estos parámetros solvatocrómicos se relacionan mediante la **Ecuación 6.1**:

$$A = A_0 + a\alpha + b\beta + s\pi^* \quad \text{Ec. 6.1}$$

Siendo A ($v_{\text{máx}}$, en nuestro caso) la propiedad a ser correlacionada; a , b y s , los coeficientes, independientes del solvente, que miden la susceptibilidad relativa de A a los parámetros α , β y π respectivamente y A_0 la propiedad fisicoquímica a correlacionar, en un solvente inerte.

La ecuación de Catalán (Catalán, 2009) supone una mejora en el análisis multiparamétrico respecto a la ecuación de Kamlet y Taft (Homocianu, 2021; Miotke 2017; Reta, 1995). Mientras que esta última se realizó a partir de datos pertenecientes a un promedio de alrededor de 40 determinaciones realizadas por diferentes autores en diversos laboratorios, la primera se creó a partir de datos obtenidos en el mismo laboratorio para pares de estructuras homólogas. Tanto el descriptor catalán SPP (dipolaridad y polarizabilidad del solvente) como el descriptor π^* (polaridad-polarizabilidad del solvente) de Kamlet y Taft explican la polaridad del disolvente, aunque el parámetro π^* se obtuvo a partir de transiciones π - π^* de algunos colorantes

azoicos. El descriptor SPP se calculó a partir de diferentes transiciones de muchos compuestos. Si bien los procedimientos multiparamétricos han proporcionado excelentes resultados en el análisis del efecto del solvente, también existe evidencia experimental de algunas deficiencias relevantes como su incapacidad para describir el comportamiento solvatocrómico de solutos no polares que no exhiben ninguna interacción específica con el solvente (Catalán, 2009). Por lo tanto, Catalán separó la escala de polaridad SPP en dos parámetros: las escalas de polarizabilidad del solvente (SP) y dipolaridad (SdP), dando como resultado un modelo de cuatro parámetros (Homocianu, 2021). Según este modelo, las interacciones específicas se describen mediante los parámetros SA, que muestra la acidez del solvente, y SB, que proporciona la medición de la basicidad del solvente. La **Ecuación 6.2** viene dada por:

$$A = A_0 + a_{SA}SA + b_{SB}SB + c_{SP}SP + d_{SdP}SdP \quad \text{Ec. 6.2}$$

donde A ($v_{\text{máx}} = 1/\lambda/\text{cm}^{-1}$) es la propiedad fisicoquímica dependiente del solvente en un solvente determinado; A_0 es la propiedad fisicoquímica por correlacionar en fase gaseosa; SA, SB, SP y SdP, representan los parámetros independientes, aunque complementarios, que dan cuenta de las interacciones soluto-disolvente; a_{SA} , b_{SB} , c_{SP} y d_{SdP} son los coeficientes de regresión que miden la susceptibilidad relativa de las diferentes fuerzas de interacción.

Por otro lado, la ecuación de Laurence permite estimar con mayor precisión la dispersión y las interacciones electrostáticas soluto-solvente de un sistema dado (Homocianu, 2021; Laurence et al., 2015). Se basa tanto en mediciones experimentales como en cálculos teóricos (Homocianu, 2021). Según este modelo, las fuerzas intermoleculares están determinadas por el parámetro DI, que describe las interacciones de dispersión e inducción, y el parámetro ES, que describe las interacciones electrostáticas entre los multipolos permanentes del soluto y el disolvente. Si bien las interacciones específicas se describen por el parámetro α_1 , que cuantifica las interacciones soluto/solvente (acidez del enlace de hidrógeno del solvente); y el parámetro β_1 , que representa las interacciones soluto/ solvente (basicidad del enlace de hidrógeno de los solventes) (Laurence et al., 2015). Este análisis paramétrico está determinado por la **Ecuación 6.3**

$$A = A_0 + a_1\alpha_1 + b_1\beta_1 + d_1DI + eES \quad \text{Ec. 6.3}$$

donde A ($v_{\text{máx}} = 1/\lambda/\text{cm}^{-1}$) es la propiedad del soluto a correlacionar, A_0 es la propiedad fisicoquímica por correlacionar en fase gaseosa. α_1 , β_1 DI y ES representan los parámetros independientes, aunque complementarios, que explican las interacciones

solutos-disolvente; a_1 , b_1 , d_1 y e , son los coeficientes de regresión que evalúan la susceptibilidad relativa de A a las diferentes relaciones de interacción.

La metodología empleada más frecuentemente para el análisis de las interacciones soluto-solvente es el uso de mezclas binarias de solvente. La característica más importante de estas mezclas es que experimentan una variación gradual de las propiedades al modificarse progresivamente su composición.

Considerando que la absorción de radiación de las moléculas de soluto disueltas en un solvente (S) genera la excitación de las mismas (S)* según la siguiente

Ecuación 6.4:



El solvatocromismo es consecuencia de una solvatación selectiva o preferencial del estado fundamental y del estado excitado de la molécula que absorbe radiación. La solvatación selectiva o preferencial es el enriquecimiento de la capa que rodea al soluto (o región cibotáctica) por uno de los componentes del solvente.

6.1.4. SOLVATACIÓN PREFERENCIAL

Cuando un soluto polar se disuelve en una mezcla binaria de solventes, el soluto interacciona de manera diferente con cada uno de ellos, lo que resulta en que la composición de la mezcla en la proximidad del soluto sea diferente a la composición del seno de la solución. La Solvatación Preferencial (SPr) se manifiesta cuando un tipo de disolvente disuelve el soluto más fuertemente que el otro. Las propiedades espectroscópicas del soluto pueden verse significativamente alteradas por SPr.

El estudio del solvatocromismo en disolventes mixtos puede proporcionar información sobre los factores que determinan la SPr. Los parámetros se pueden utilizar para identificar qué componente del disolvente interactúa más fuertemente con el soluto y en qué medida esta interacción cambia con la composición del disolvente mezclado. Esta información se puede utilizar para diseñar nuevos disolventes con propiedades específicas, como una mayor selectividad para ciertos tipos de solutos (Homocianu, 2024).

El análisis del fenómeno de solvatación de un soluto dado es más complejo si el soluto se coloca en mezclas binarias de disolventes. Esto se debe al hecho de que la composición de la región cibotáctica puede ser o no la misma que la del seno de la solución. Además, las interacciones disolvente-disolvente pueden dar lugar a

complejos asociados que pueden competir con las moléculas de disolvente puro en la región cibotáctica.

Cuando se analiza el comportamiento de una sustancia disuelta en mezclas binarias de solventes con diferentes proporciones, se observan los cambios en los valores de Energía de transición molar (E_T) del soluto en función de la fracción molar del solvente más polar (X_2) en la mezcla. En la **Figura 6.2** se muestran ejemplos de tales gráficos. Ilustran la variedad de comportamientos encontrados en la literatura, muchos de ellos no fácilmente susceptibles de una interpretación microscópica (Sandri et al., 2021).

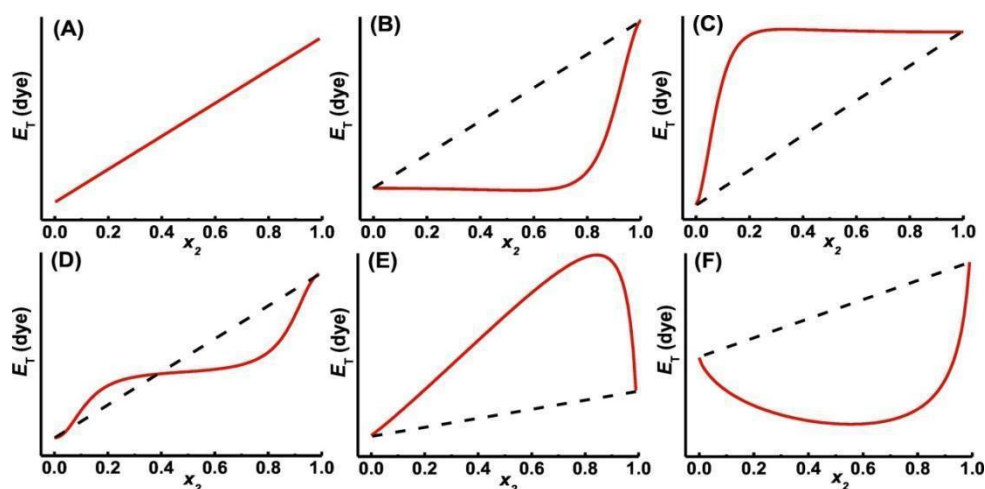


Figura 6.2. Posibles comportamientos del soluto en mezcla binaria de solventes (Sandri et al., 2021).

El gráfico **(A)** corresponde a un comportamiento ideal, donde la composición de la región cibotáctica permanece igual a la del seno de la solución para cualquier composición de solvente, es decir para cualquier valor de X_2 . Los gráficos **(B)** y **(C)** reproducen situaciones no ideales de SP_r del soluto por el componente menos o más polar, respectivamente. El gráfico **(D)** refleja un cambio de SP_r del soluto a medida que se altera la composición de la mezcla. Los gráficos **(E)** y **(F)** se consideran comúnmente como una indicación de un efecto sinérgico de los dos solventes, lo que lleva a una respuesta solvatocrómica del soluto que excede las observadas en cualquiera de los componentes puros. Se cree que las moléculas de los disolventes 1 y 2 interactúan entre sí a través de interacciones intermoleculares, formando un "tercer disolvente" en forma de complejos asociados que, a su vez, solvatan el soluto en cuestión. La acción sinérgica del sistema binario opera de dos formas, solvatando al soluto por la más polar **(E)** o por el resto menos polar **(F)** del complejo asociado (Sandri et al., 2021).

6.2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS DE ESTUDIOS DE INTERACCIONES ENTRE FLUORQUINOLONAS EN SOLUCIÓN

Varios investigadores han examinado el comportamiento espectrofotométrico de las FQ en solución. Montero y col. (1994) reportaron que las FQ cumplen con la Ley de Lambert-Beer en el rango de concentraciones de 7×10^{-6} a 58×10^{-6} M y presentan su absorción máxima a 278 nm (banda I) y una segunda banda a 323 nm (banda II). El Khateeb y col. (1998) registraron los espectros UV-Vis de Norfloxacin (NOR) en HCl 0,1 M y NaOH 0,1 M, observaron un corrimiento batocrómico en la banda I, que va de 269 nm en el medio alcalino a 280 nm en el medio ácido, también observaron un efecto hiperocrómico. Albini y col. (2003) utilizaron espectrofotometría UV-Vis y de fluorescencia para investigar las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de las FQ. Park y col. (2000) investigaron la ionización y la formación de complejos metálicos de FQ en solución acuosa utilizando espectrofotometría UV-Vis. Varios autores han reportado la determinación cuantitativa de FQ aisladas o formando complejos coloreados con iones metálicos mediante espectrofotometría UV-Vis (Aura et al., 2015; Belal et al., 2017). Por otra parte, se han realizado varios estudios con diferentes metodologías analíticas que han demostrado que las FQ interactúan en solución. Ahumada y col. (1993) y Fallati y col. (1994) propusieron la formación de interacciones intermoleculares entre la especie catiónica (H_2Q^+) y las especies neutras ($HQ^\pm$ y HQ^0) con el fin de explicar los comportamientos imprevistos de las solubilidades de NOR y Ciprofloxacino (CIP) a pH inferiores a su punto isoeléctrico. Maurer y col. (1998) descubrieron que la concentración de CIP en el interior acuoso de los liposomas podía superar su solubilidad en dos órdenes de magnitud debido a un proceso de autoasociación. Postulando la idea de que la agregación de moléculas de FQ ocurriría por interacciones tipo “stacking” entre los cromóforos aromáticos y que estas moléculas podrían interaccionar del mismo modo con otras moléculas aromáticas en solución, Son y col. (1998) reportaron la interacción de NOR con mononucleótidos y Evstigneev y col. (2006) demostraron la heteroasociación entre NOR y Nicotinamida (NIC) o flavín nucleótido y la autoasociación de NOR mediante modelado molecular en fase gaseosa y 1H -RMN. Woldegiorgis y col. (2021) estimaron el momento dipolar de NOR analizando el comportamiento solvatocrómico y calculando computacionalmente el efecto de los solventes en el comportamiento espectral. Por otra parte, Parra y col. (2023) evaluaron el efecto de la temperatura sobre la solubilidad de CIP en diferentes solventes. Concluyeron que la capacidad de generar interacciones soluto-solvente mediante la formación de uniones puente hidrógeno a través del grupo ácido

carboxílico de CIP y que la polarizabilidad de la molécula son los factores que contribuyen favorablemente a la solubilidad.

6.3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS DE ESTUDIOS DE INTERACCIONES ENTRE SULFONAMIDAS EN SOLUCIÓN

Almandoz (2014) investigó el comportamiento solvatocrómico del Sulfametoxazol (SMX) utilizando espectroscopía UV-Vis en solventes puros y en mezclas binarias. Los cambios espectrales de este soluto se correlacionaron con los parámetros Kamlet y Taft (α , β y π^*). El análisis de regresión lineal múltiple indicó que tanto la interacción específica por enlace de puente de hidrógeno como la interacción dipolar no específica juegan un papel importante en la posición de los máximos de absorción en solventes puros. El índice de SPr se calculó como una función de la composición del solvente y se observaron características no ideales en todas las mezclas binarias. Por otra parte, Rahimpour y col. (2021) estudiaron la solubilidad de Sulfanilamida (SNA) en mezclas binarias de metanol + agua, acetona + metanol, acetona + etanol, acetona + acetato de etilo, acetona + tolueno, etanol + agua, dimetilsulfóxido (DMSO) + agua, dimetilformamida (DMF) + agua, 1,4-dioxano + agua, Acetonitrilo (ACN) + agua y polietilén glicol + agua.

6.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los espectros de absorción UV-Vis fueron registrados en un espectrofotómetro Varian Cary 50, en un rango de longitud de onda entre 200-400 nm a una velocidad de escaneo de 1 nm/s⁻¹. La fuente de radiación fue una lámpara de xenón y se empleó una cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico.

6.4.1. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE: EFECTO DEL AUMENTO DE CONCENTRACIÓN

Con la finalidad de evaluar la posibilidad de formación de asociaciones moleculares entre FQ y SA en solución, se determinó el efecto del aumento de la concentración de un IFA manteniendo fija la concentración de la otra. Se realizó el barrido espectral de soluciones de NOR, CIP, SNA, SMX y de las mezclas equimoleculares de NOR-SNA, NOR-SMX, CIP-SNA, CIP-SMX a diferentes

concentraciones comprendidas en el rango de 6×10^{-3} a $1,5 \times 10^{-6}$ M. Para la preparación de las soluciones de trabajo se procedió del siguiente modo (**Tabla 6.1**)

- se pesaron 50 mg de cada FQ y 38 mg de SA,
- los IFA se disolvieron con 1 mL de NaOH 1 M, se llevaron a 25 mL finales con solución reguladora de pH 7,4 (FA). Esta solución tiene una concentración nominal de 6×10^{-3} M (**Solución A**),
- se tomaron 5 mL de la solución A de NOR, CIP, SNA y SMX y se diluyeron a 10 mL finales con solución reguladora de pH 7,4. Esta solución tiene una concentración de 3×10^{-3} M (**Solución B**),
- se tomaron 0,5 mL de la solución A de NOR, CIP, SNA y SMX y se diluyó a 10 mL finales. Esta solución tiene una concentración de 3×10^{-4} M (**Solución D**),
- diluciones posteriores de las soluciones B y D se realizaron según se detalla en la **Figura 6.2**. El diluyente utilizado fue solución reguladora pH 7,4 y el volumen final de cada dilución de 10 mL,
- se midieron los espectros de absorción de cada solución, entre 200 y 400 nm, a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Varian Cary 50.

Las soluciones reguladoras de pH se prepararon según las técnicas descritas en Farmacopea Argentina 7 Ed.

Tabla 6.1. Esquema de dilución de las soluciones de FQ y SA.

	NOR/CIP	SNA/SMX	Concentración (M)
1	5,0 mL Sc. D	-	$1,5 \times 10^{-5}$ FQ
2	5,0 mL Sc. D	1,0 mL Sc. D	$1,5 \times 10^{-5}$ FQ + 3×10^{-6} SA
3	5,0 mL Sc. D	2,0 mL Sc. D	$1,5 \times 10^{-5}$ FQ + 6×10^{-6} SA
4	5,0 mL Sc. D	5,0 mL Sc. D	$1,5 \times 10^{-5}$ FQ + $1,5 \times 10^{-5}$ SA
5	5,0 mL Sc. D	1,0 mL Sc. B	$1,5 \times 10^{-5}$ FQ + 3×10^{-5} SA
6	5,0 mL Sc. D	2,0 mL Sc. B	$1,5 \times 10^{-5}$ FQ + 6×10^{-5} SA
7	-	5,0 mL Sc. D	$1,5 \times 10^{-5}$ SA
8	1,0 mL Sc. D	5,0 mL Sc. D	$1,5 \times 10^{-5}$ SA + 3×10^{-6} FQ
9	2,0 mL Sc. D	5,0 mL Sc. D	$1,5 \times 10^{-5}$ SA + 6×10^{-6} FQ
10	5,0 mL Sc. D	5,0 mL Sc. D	$1,5 \times 10^{-5}$ SA + $1,5 \times 10^{-5}$ FQ
11	1,0 mL Sc. B	5,0 mL Sc. D	$1,5 \times 10^{-5}$ SA + 3×10^{-5} FQ
12	2,0 mL Sc. B	5,0 mL Sc. D	$1,5 \times 10^{-5}$ SA + 6×10^{-5} FQ

Sc.: solución

6.4.2. ESTUDIO TERMOCRÓMICO

El estudio termocrómico se llevó a cabo midiendo la absorbancia, entre 200 y 400 nm, de las soluciones de NOR, CIP, SNA y SMX de concentración $1,5 \times 10^{-5}$ M,

así como también de las combinaciones NOR-SNA, NOR-SMX, CIP-SNA, CIP-SMX de igual concentración. Las determinaciones se realizaron en el siguiente rango de temperatura: 25°, 35°, 45°, 55° y 65° ± 0,1 °C.

6.4.3. ESTUDIO SOLVATOCRÓMICO

6.4.3.1. En solventes puros

El estudio solvatocrómico se realizó con soluciones de NOR, CIP, SNA y SMX de concentración $1,5 \times 10^{-5}$ M. Se registraron y analizaron los espectros UV-Vis de los IFA en los siguientes solventes puros de grado analítico (**Tabla 6.2**): *n*-Hexano (Hex), ciclohexano (Cy), ACN, metanol (MeOH), etanol (EtOH), 1-propanol (PrOH), *n*-butanol (ButOH) y 1-octanol (OcOH) de marcas disponibles en el mercado nacional (Sintorgan®, Biopack®, Cicarelli®). Para ello se pesaron exactamente alrededor de 10,0 mg de NOR, CIP, SNA y SMX. Las soluciones fueron preparadas en matraces de 10,0 mL y sonicadas durante una hora. De cada una de estas soluciones se tomó una alícuota de 1,0 mL y se llevó a volumen final de 10,0 mL con los respectivos solventes.

Para analizar cuantitativamente el efecto solvatocrómico y las interacciones soluto-soluto y soluto-solvente se realizaron los análisis multiparamétricos aplicando las escalas de polaridad del solvente establecidas por Kamlet-Taft, Catalán y Laurence. En ellas se vincula el número de onda de máxima absorción ($\nu_{\text{máx}}$) como propiedad del soluto y los parámetros empíricos del solvente de la ecuación de Kamlet-Taft: α , β , π^* ; los de Catalán: SA, SB, SP, SdP y los de Laurence: DI, ES, α_1 , β_1 . El $\nu_{\text{máx}}$ en cada caso se midió tomando el punto medio entre dos posiciones del espectro donde la absorbancia es igual a 0,9 del máximo. El estudio de correlación se efectuó utilizando el programa Microsoft Excel® versión 2010 a través del análisis de datos por regresión, tomando a $\nu_{\text{máx}}$ como variable dependiente y los parámetros empíricos α , β , π^* , SA, SB, SP, SdP, DI, ES, α_1 , β_1 como variables independientes (**Tabla 6.2**).

Tabla 6.2. Naturaleza y parámetros empíricos de los solventes utilizados.

Solvente	Naturaleza	Kamlet-Taft				Catalán				Laurence			
		μD (Debye)	α	β	π^*	SA	SB	SP	SdP	DI	ES	α_1	β_1
Cy	apolares	0	0	0	0	0	0,073	0,683	0	0,78	0	0	0
Hex	apróticos	0	0	0	0,11	0	0,056	0,616	0	0,71	0	0	0
ACN		3,92	0,19	0,4	0,75	0,044	0,286	0,645	0,974	0,65	0,97	0,04	0,29
MeOH	próticos	1,70	0,98	0,66	0,6	0,605	0,545	0,608	0,904	0,61	0,90	0,61	0,55
EtOH		1,69	0,86	0,75	0,54	0,4	0,658	0,633	0,783	0,63	0,78	0,40	0,66
PrOH		1,66	0,84	0,9	0,52	0,367	0,782	0,658	0,748	0,72	0,77	0,68	0,65
ButOH		1,66	0,84	0,84	0,47	0,341	0,809	0,674	0,655	0,74	0,75	0,65	0,67
OcOH		1,80	0,77	0,81	0,4	0,299	0,923	0,713	0,454	0,78	0,63	0,66	0,74
Agua		1,85	1,17	0,47	1,09	1,062	0,025	0,681	0,997	0,65	0,89	1,54	0,37

Cy: Ciclohexano; Hex: n-Hexano; ACN: Acetonitrilo; MeOH: Metanol; EtOH: Etanol; PrOH: 1-Propanolol; ButOH: n-Butanol; OcOH: 1-Octanol; μD : momento dipolar; α : capacidad ácida del solvente; β : capacidad básica del solvente; π^* : polaridad polarizabilidad del solvente SA: acidez del solvente; SB: basicidad del solvente; SP: polarizabilidad del solvente; SdP: dipolaridad; DI: interacciones de dispersión e inducción; ES: interacciones electrostáticas; α_1 : dador de hidrógenos o acidez del solvente; β_1 : aceptor de hidrógeno o basicidad del solvente.

6.4.3.2. En mezcla binaria de solventes

Se ensayaron dos mezclas binarias de solvente: buffer-ACN y buffer-MeOH. Se preparó una solución madre de cada IFA y se realizaron diluciones con ACN o MeOH como disolventes, para obtener concentraciones desde 0-100% v/v con un intervalo de variación del 10% (Tablas 6.3 y 6.4) procediendo según se indica a continuación:

- se pesaron por triplicado, aproximadamente 0,05 g de NOR, CIP, SNA y SMX,
- se realizaron soluciones madre de cada IFA en buffer pH 7,4, en ACN y en MeOH. Las soluciones de SMX y SNA se diluyeron hasta 50 mL finales y las de NOR y CIP hasta 25 mL. Las soluciones realizadas con buffer se disolvieron primero en 1 mL de NaOH 1M, y luego se enrasaron con buffer 7,4 FA. Las soluciones metanólicas y de ACN se enrasaron directamente con el solvente (**Solución A**). Estas soluciones tienen una concentración de $2,5 \times 10^{-3}$ M,
- se tomaron 2,5 mL de la solución A de NOR, CIP y SMX; y 1,25 mL de la solución A de SNA y se diluyeron a 25 mL con cada solvente (**Solución B**). Estas soluciones tienen una concentración de 5×10^{-4} M,
- se realizó una solución C, solo para las soluciones realizadas con MeOH ó ACN, tomando 2,5 mL de la solución B y diluyendo a 25 mL con MeOH o ACN respectivamente (**Solución C**). Estas soluciones tienen una concentración de $1,25 \times 10^{-5}$ M,

- e. diluciones posteriores de las soluciones B y C de los IFA se realizaron según se detalla en la **Tabla 6.3** y las combinaciones se diluyeron según se indica la **Tabla 6.4**. El volumen final de cada dilución fue de 10 mL,
- f. se realizó un blanco para cada una de las soluciones, constituido por los volúmenes correspondientes de ACN, MeOH y buffer,
- g. se registraron los espectros de absorción a temperatura ambiente.

Tabla 6.3. Esquema de las diluciones correspondientes al ensayo de FQ o SA en mezclas binarias de solventes.

% v/v	FQ ó SA en buffer (mL)	ACN ó MeOH (mL)	FQ ó SA en ACN ó MeOH (mL)	Vol. Final con buffer (mL)
0	1	-	-	10
10	1	1	-	10
20	1	2	-	10
30	1	3	-	10
40	1	4	-	10
50	1	5	-	10
60	1	6	-	10
70	1	7	-	10
80	1	8	-	10
90	1	9	-	10
100	-	9	1	10
Blanco	-	10	-	10

Vol.: Volumen; ACN: Acetonitrilo; MeOH: Metanol

Las determinaciones espectrofotométricas se efectuaron siguiendo el procedimiento que a continuación se describe:

- a. la $v_{\text{máx}}$ fue medida tomando el punto medio entre dos posiciones del espectro donde la absorbancia es igual a $0,9 A_{\text{máx}}$.
- b. se representaron gráficamente los corrimientos espectrales de la banda de máxima absorción respecto a la composición del solvente,
- c. se analizaron los resultados aplicando el método de relaciones lineales de energía libre de Taft y Kamlet.

Tabla 6.4. Esquema de las diluciones correspondientes al ensayo de mezclas binarias de FQ y SA en mezclas binarias de solventes.

% v/v	FQ en buffer (mL)	SA en buffer (mL)	Vol. solvente ACN-MeOH (mL)	Vol. Sc.	Vol. Final (con buffer)
0	0,5	0,5	-	-	10
10	0,5	0,5	1	-	10
20	0,5	0,5	2	-	10
30	0,5	0,5	3	-	10
40	0,5	0,5	4	-	10
50	0,5	0,5	5	-	10
60	0,5	0,5	6	-	10
70	0,5	0,5	7	-	10
80	0,5	0,5	8	-	10
90	0,5	0,5	9	-	10
100	-	-	9	0,5 c/u	10
Blanco	-	-	10	-	10

Vol.: Volumen; Sc.: Solución; ACN: Acetonitrilo; MeOH: Metanol.
Las soluciones de 90 % v/v en ACN presentaron opalescencia.

Para analizar cuantitativamente el efecto solvatocrómico y las interacciones soluto-solvente se utilizó la relación de Kamlet y Taft, relacionando el número de onda experimental de máxima absorción ($\nu_{\max}$ cm⁻¹) con los parámetros solvatocrómicos α , β y π^* de las mezclas binarias buffer-ACN y buffer-MeOH en cada fracción molar (χ) de solvente, tomados de Retay col. (1995) (**Tablas 6.5 y 6.6** respectivamente). Se calculó la fracción molar de ACN y la de MeOH (X_{ACN} y X_{MeOH}) en las proximidades del soluto aplicando la **Ec. 6.5** y considerando las siguientes concentraciones: H₂O 55,55 M; KH₂PO₄ 0,0105 M; K₂HPO₄ 0,0395 M, ACN 18,80 M y MeOH 24,75 M, aplicando la siguiente ecuación:

$$\chi_{\text{sv.org.}} = \frac{\text{moles de sv. orgánico}}{\text{moles de sv.orgánico} + \text{moles de KH}_2\text{PO}_4 + \text{moles de K}_2\text{HPO}_4 + \text{moles de agua}} \quad \text{Ec. 6.5}$$

El análisis de correlación se efectuó utilizando el programa Microsoft Excel®.

Tabla 6.5. Parámetros solvatocrómicos (α , β y π^*) para la mezcla buffer-ACN.

%ACN	χ_{ACN}	α	β	π^*
0	0	1,21	0,19	1,17
10	0,036	1,16	0,34	1,15
20	0,078	1,08	0,39	1,12
30	0,127	1,01	0,41	1,06
40	0,184	0,95	0,40	0,99
50	0,252	0,90	0,40	0,95
60	0,336	0,90	0,42	0,91
70	0,441	0,88	0,44	0,85
80	0,575	0,82	0,43	0,84
90	0,753	0,71	0,40	0,80
100	1	0,32	0,37	0,75

χ_{ACN} : fracción molar de Acetonitrilo; α : capacidad ácida del solvente; β : capacidad básica del solvente; π^* : polaridad y polarizabilidad del solvente.

Tabla 6.6. Parámetros solvatocrómicos (α , β y π^*) para la mezcla buffer-MeOH.

%MeOH	χ_{MeOH}	α	β	π^*
0	0	1,21	0,19	1,17
10	0,047	1,2	0,26	1,16
20	0,101	1,17	0,36	1,15
30	0,161	1,15	0,43	1,11
40	0,230	1,1	0,5	1,08
50	0,309	1,07	0,53	1,03
60	0,402	1,04	0,54	0,98
70	0,511	1,02	0,55	0,91
80	0,642	1,02	0,54	0,82
90	0,801	1,02	0,6	0,74
100	1	1,02	0,62	0,6

χ_{MeOH} : fracción molar de Metanol; α : capacidad ácida del solvente; β : capacidad básica del solvente; π^* : polaridad y polarizabilidad del solvente.

La E_T se calculó a partir de la longitud de onda de máxima absorción del soluto aplicando la **Ec. 6.6** (Umadevi et al., 2008).

$$E_T \text{ (kcal/mol)} = h c N_A / \lambda_{\text{máx}} \text{ (nm)} = 28590 / \lambda_{\text{máx}} \text{ (nm)} \quad \text{Ec. 6.6}$$

Donde h , c y N_A son la constante de Planck, la velocidad de la luz y el número de Avogadro, respectivamente.

Se representó gráficamente E_T , en función de la fracción molar del solvente orgánico (X_2), en cada caso, a fin de observar el tipo de correlación entre las variables. Posteriormente se calculó la fracción molar de los disolventes en la región cibotáctica X_2^I (**Ec. 6.7**):

$$X_2^L = \frac{(E_{12} - E_1)}{(E_2 - E_1)} \quad \text{Ec. 6.7}$$

Donde E_{12} es la E_T (kcal/mol) en la mezcla de solventes y E_1 y E_2 son los valores de la E_T en los solventes 1 y 2, respectivamente (Sandri, 2021).

Se calculó, además, el índice de SPr (δ_{S2}) (Ec. 6.8) con respecto al disolvente 2 (ACN o MeOH) (Sandri, 2021). Un valor positivo de δ_{S2} revela preferencia del soluto por interaccionar con el solvente 2 y un valor negativo indica la preferencia por formar uniones intermoleculares con el agua.

$$\delta_{S2} = X_2^L - X_2 \quad \text{Ec. 6.8}$$

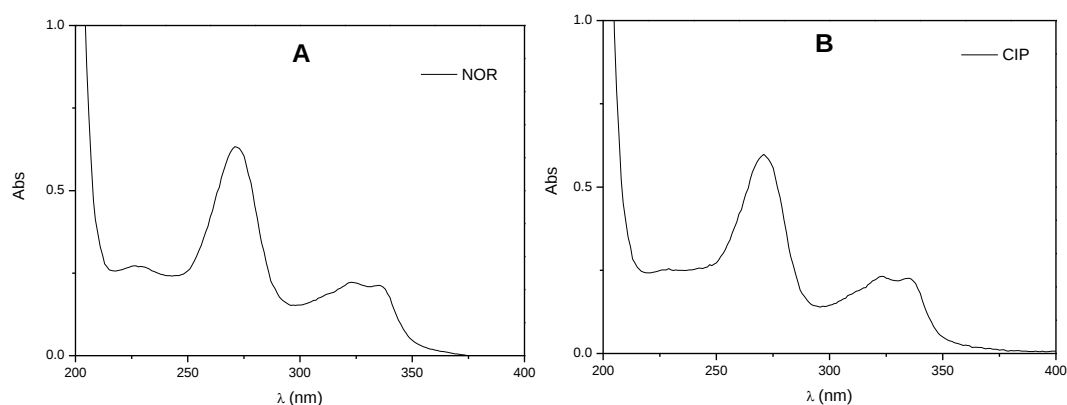
Donde X_2 es la fracción molar del disolvente 2 en el seno de la solución, mientras que X_2^L es la fracción molar de este solvente en la región cibotáctica.

6.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.5.1. FLUORQUINOLONAS EN SOLUCIÓN

6.5.1.1. Espectrofotometría UV-Visible

Los espectros de absorción obtenidos de NOR y CIP son muy semejantes. En medios acuosos neutros, presentan una banda de absorción intensa con un máximo en la región 240–290 nm (banda I correspondiente a la transición $\pi - \pi^*$), y dos bandas superpuestas centradas a 310–350 nm (banda II correspondiente a la transición $n - \pi^*$). La presencia de varias bandas implica la existencia de dos cromóforos en las moléculas de NOR y CIP (Sajwan et al., 2023). Los máximos de absorción de NOR se encuentran a 278 y 315 nm (Fig. 6.3.A) y los de CIP a 272 y 314 nm (Fig. 6.3.B).



Figuras 6.3. Espectros de absorción de A. NOR y B. CIP en buffer pH 7,4.

6.5.1.2. Termocromismo

El aumento de la temperatura ocasiona la formación de tres puntos isobásticos situados en 247,3; 276,5 y 323 nm en los espectros de absorción UV-Vis de NOR (**Figura 6.4**). Esto es indicativo de la formación de un equilibrio intermolecular entre las especies zwitteriónica y neutra presentes en la solución al pH de trabajo. Por otra parte, los espectros de NOR experimentan un desplazamiento batocrómico al aumentar la temperatura. Etter (1991) y Giacomelli y col. (1994) describieron que cuando es factible la formación de un pseudo ciclo de seis átomos, que en el caso de las FQ sería el creado por la formación de un enlace puente hidrógeno intramolecular entre el grupo carbonilo C4 y el H del grupo 3-COOH, este es muy estable. Establecieron, además, que la ruptura de este enlace está favorecida por un fenómeno endotérmico. El efecto batocrómico observado indicaría la presencia de un equilibrio intramolecular que podría tratarse de la formación de la especie zwitteriónica a partir de la ruptura del puente hidrógeno formado entre el grupo carbonilo C4 y el H del grupo 3-COOH de NOR, y el desplazamiento del H de 3-COOH hacia 4'-N, favorecida por el aumento de la temperatura.

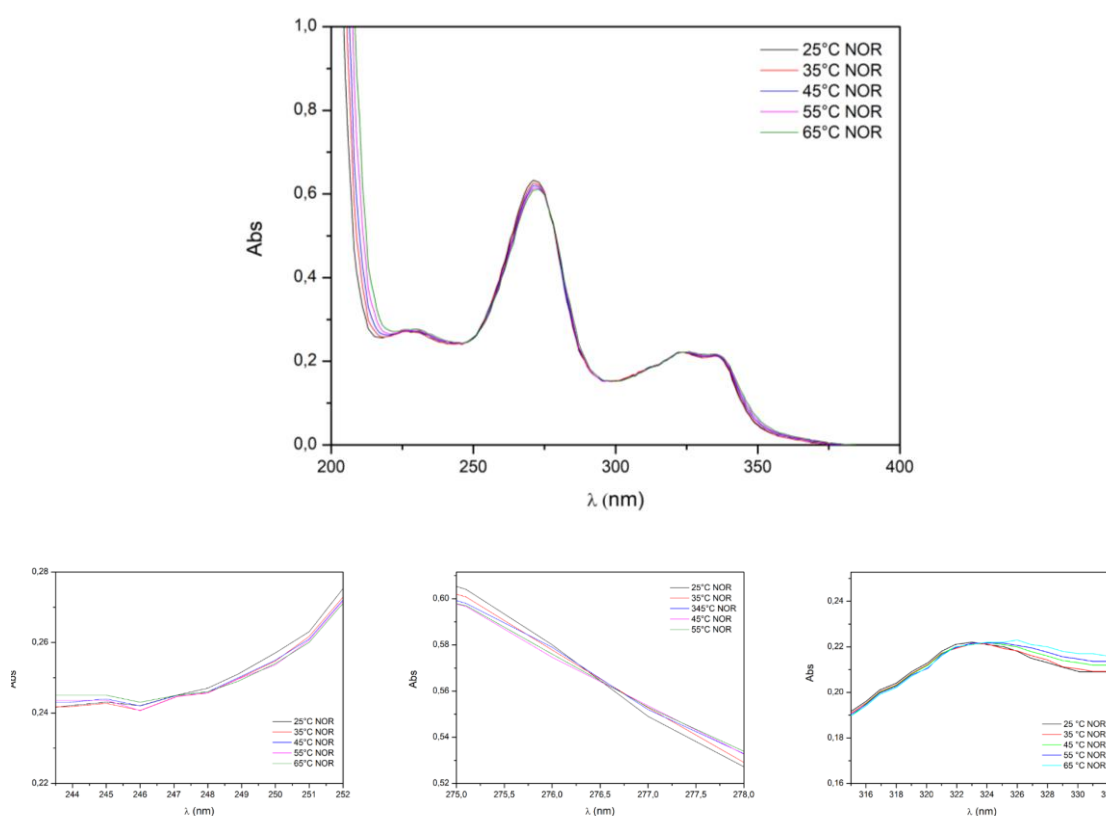


Figura 6.4. Espectros de absorción de NOR (pH= 7,4) registrados a 25°, 35°, 45°, 55° 65°C y puntos isobásticos observados a 247,3, 276,5 y 323 nm.

La **Figura 6.5** muestra cuatro puntos isosbéticos en los espectros de CIP (240, 277, 334 y 338 nm) indicando que CIP participa en interacciones intermoleculares en la solución. Ross y col. (1992) describieron que la relación entre la forma zwitteriónica de CIP y la no iónica a pH 7 es de 444/1 y, en función de los resultados obtenidos, se puede inferir que la forma zwitteriónica participa en reacciones de transferencia de carga de equilibrio intermolecular.

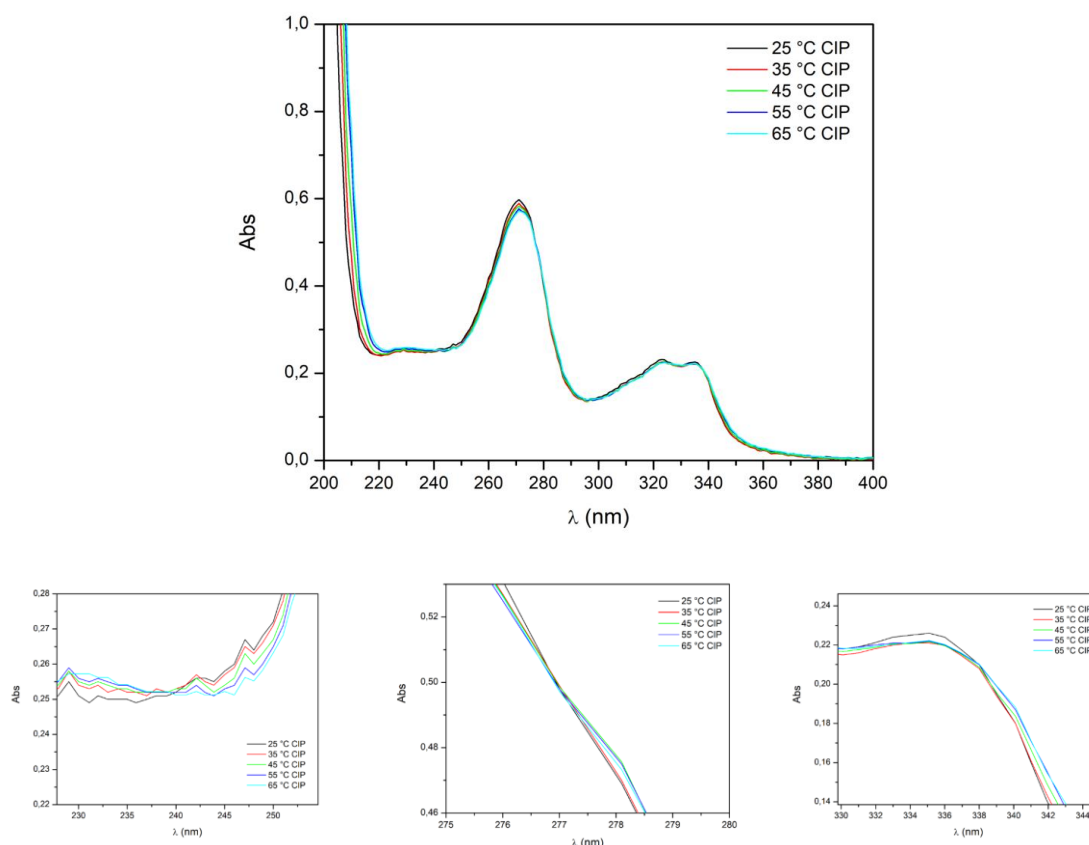


Figura 6.5. Espectros de absorción de CIP (pH= 7,4) registrados a 25°, 35°, 45°, 55° 65°C y puntos isosbéticos observados a 240, 277 y 338 nm.

6.5.1.3. Solvatocromismo en solventes puros

Los valores de los máximos de absorción al UV-Vis de NOR y CIP en los solventes ensayados se muestran en la **Tabla 6.7**. El análisis se realizó considerando los desplazamientos solvatocrómicos experimentales derivados de las transiciones electrónicas $\pi-\pi^*$ y tomando como referencia el disolvente ACN ($\lambda_{\text{máx}}$).

Tal como se observa en la **Figura 6.6**, todos los espectros de absorción UV-Vis de NOR, presentan una banda de máxima absorción comprendida entre 267,6 y 285 nm dependiendo del solvente utilizado. Se observa, además, una segunda banda débil

alrededor de 320 y 340 nm en las soluciones realizadas con solventes próticos. Considerando el espectro de absorción de NOR en ACN como referencia ($\lambda_{\text{máx}} = 284,5$ nm), observamos un **corrimiento hipsocrómico** de 16,9 nm en el máximo de absorción de NOR solubilizada en ciclohexano (solvente aprótico apolar). En Hex no se visualizan picos de máxima absorción debido a la escasa solubilidad de NOR en ese solvente. Los espectros de absorción de NOR en los solventes próticos polares ensayados presentan los siguientes **corrimientos hipsocrómicos**: agua 8,6 nm; EtOH 2,6 nm; MeOH 2,5 nm; ButOH y OcOH 1,5 nm. Es decir que, en estos solventes, a medida que aumenta la polaridad mayor es el efecto hipsocrómico, excepto para PrOH en el que se observa **corrimiento batocrómico** de 0,5 nm.

Tabla 6.7. Valores experimentales de longitud de onda y número de onda de soluciones de NOR y CIP en los distintos solventes.

Solvente	NOR		CIP	
	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\nu_{\text{máx}}$ (cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\nu_{\text{máx}}$ (cm ⁻¹)
Cy	267,6	37,37	n.s.	n.s.
Hex	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
ACN	284,5	35,15	282,5	35,40
MeOH	282	35,46	275,05	36,36
EtOH	281,9	35,47	277,55	36,03
PrOH	285	35,09	278,95	35,85
ButOH	283	35,34	281,45	35,53
OcOH	283	35,34	270,45	36,97
Agua	275,9	36,25	270,5	36,97

λ : longitud de onda; ν : número de onda ($1/\lambda \cdot 10.000$); n.s.: no soluble; Cy: Ciclohexano; Hex: n-hexano; ACN: Acetonitrilo; MeOH: Metanol; EtOH: Etanol; PrOH: 1-Propanolol; ButOH: n-Butanol; OcOH: 1-Octanol.

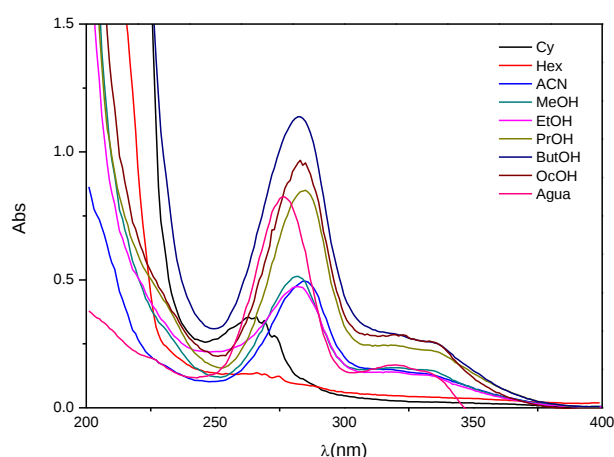


Figura 6.6. Espectros de absorción de NOR en los solventes en estudio.

Los espectros de absorción UV-Vis de CIP en los distintos solventes ensayados se pueden observar en la **Figura 6.7** y los valores de los máximos de absorción se muestran en la **Tabla 6.7**. Presentan valores comprendidos entre 270,4 y 282,5 nm dependiendo del solvente utilizado. Se observa, además, la banda II débil alrededor de 320 y 340 nm para los solventes ACN, EtOH, ButOH, PrOH, y más intensa y definida en el caso de los solventes agua, OcoH y MeOH. La baja solubilidad de CIP en solventes no polares como Cy y Hex impide obtener datos experimentales. Tomando para el análisis el espectro de absorción al UV-Vis de CIP en ACN ($\lambda_{\text{max}} = 282,5 \text{ nm}$) observamos **corrimientos hipsocrómicos e hipocrómicos** para todos los solventes ensayados. Los desplazamientos son del orden de los 12 nm para el agua, 12,05 nm para OcoH, 7,45 nm para MeOH, 5,0 nm para EtOH, 3,95 nm para PrOH y 1,05 nm para ButOH. Coincidentemente con los resultados obtenidos para NOR, a medida que aumenta la polaridad del solvente aumenta el desplazamiento hacia regiones de menores longitudes de onda.

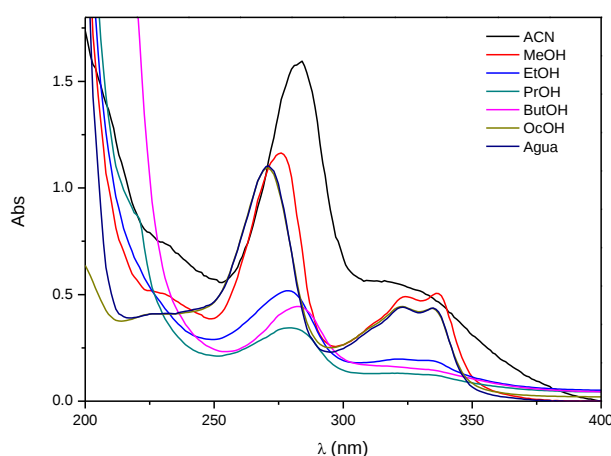


Figura 6.7. Espectros de absorción de CIP en los solventes en estudio.

El análisis de las variaciones espectrales descritas se realizó aplicando las metodologías descritas por Kamlet y Taft, Catalán y Laurence. Las **Tablas 6.8 y 6.9** muestran los coeficientes estimados y errores asociados a los parámetros solvatocrómicos obtenidos mediante el análisis de regresión lineal múltiple según Kamlet y Taft, Catalán y Laurence. Además, se informa el coeficiente de determinación y la contribución relativa de cada parámetro.

La **ecuación de Kamlet y Taft** tiene un único parámetro que representa la polaridad-polarizabilidad del solvente, π^* , mientras que los parámetros α y β describen la capacidad del solvente para donar o aceptar protones a través de un enlace de

puente hidrógeno, respectivamente. Teniendo en cuenta la magnitud y los signos de cada parámetro, observamos que la interacción del solvente con NOR queda descrita, de mayor a menor contribución, por las siguientes características: capacidad aceptora de uniones puente hidrógeno del solvente (51,99%), atribuibles a los grupos $-NH$ y $-COOH$ de NOR; capacidad dadora de uniones puente hidrógeno (25,36%), hacia los grupos $-NH$, $-O$, $-COOH$ y $-N$; y la polaridad- polarizabilidad del solvente en presencia de NOR (22,65%). Es notable que el coeficiente del parámetro π^* de la ecuación de Kamlet y Taft es el menos relevante de todos. El hecho de que los coeficientes s y b tienen signos negativos implica que el estado excitado es más estable a medida que aumenta la polaridad del disolvente. Por otra parte, el signo positivo del coeficiente α muestra la influencia contraria. En consecuencia, el efecto neto observado es definido por el signo de los coeficientes más relevantes, es decir, el aumento de la polaridad de los disolventes estabiliza el estado excitado de las transiciones electrónicas de NOR, en mayor medida que el estado basal. Las ecuaciones de Catalán y Laurence son tetraparamétricas, por lo tanto, ambas tienen la ventaja de diferenciar las contribuciones de las interacciones no específicas del solvente sobre el IFA en dos parámetros diferentes, mejorando el análisis anterior. Los resultados obtenidos del análisis empleando la **ecuación de Catalán**, muestra que la polarizabilidad del solvente, representa la mayor contribución relativa (39,25%). En cuanto al orden de magnitud, le siguen la dipolaridad (SdP), la basicidad (SB) y la acidez (SA) del solvente. Se lograron hallazgos similares con la **ecuación de Laurence**. En este caso, el parámetro π^* de Kamlet y Taft se divide en dos parámetros: DI, que representa las interacciones de dispersión e inducción electrónica, y ES, las interacciones electrostáticas entre los dipolos permanentes del soluto y el disolvente. Las interacciones específicas están representadas por α_1 y β_1 , la acidez y basicidad del disolvente, respectivamente. El análisis arrojó resultados similares a los obtenidos con la ecuación multiparamétrica de Catalán, con una contribución del **46,64%** al parámetro DI, 29,86% de e , 15,47% b_1 , y 8,03% de a_1 prevaleciendo las interacciones de dispersión e inducción, seguidas por las interacciones electrostáticas entre NOR y los solventes.

Tabla 6.8. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas obtenidas del análisis de regresión lineal múltiple de datos experimentales de NOR.

NOR					
Kamlet y Taft					
A_0	a	b	s		R^2
37,3±0,23	1,59±0,40	-3,26±0,44	-1,42±0,38		0,97
	25,36%	51,99%	22,65%		
Catalán					
A_0	a_{SA}	b_{SB}	C_{SP}	d_{SDP}	R^2
39,41±0,96	0,85±0,14	-1,42±0,11	-2,83±1,38	-2,11±0,17	0,99
	11,79%	19,70%	39,25%	29,26%	
Laurence					
A_0	a_1	b_1	d_i	e	R^2
40,41±1,13	0,67±0,13	-1,29±0,32	-3,89±1,42	-2,49±0,39	0,99
	8,03%	15,47%	46,64%	29,86%	

R^2 : coeficiente de determinación; A_0 : propiedad del soluto a correlacionar; Coeficientes de correlación en el análisis de Kamlet y Taft de: acidez (a), basicidad (b) y polaridad-polarizabilidad (s), del disolvente; Coeficientes de correlación en el análisis de Catalán de: acidez (a_{SA}), basicidad (b_{SB}), polarizabilidad (C_{SP}) y dipolaridad (d_{SDP}), del disolvente; Coeficientes de regresión en el análisis de Laurence de: acidez (a_1), basicidad (b_1) dispersión e interacciones de inducción electrónica (d_i) e interacciones electrostáticas (e), del disolvente.

Tabla 6.9. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas de los coeficientes del parámetro para el análisis de regresión lineal múltiple de datos experimentales de CIP.

CIP					
Kamlet y Taft					
A_0	a	b	s		R^2
35,09±0,63	1,33±0,73				0,97
	100,00%				
Catalán					
A_0	a_{SA}	b_{SB}	C_{SP}	d_{SDP}	R^2
35,56±0,36	1,34±0,67				0,91
	100,00%				
Laurence					
A_0	a_1	b_1	d_i	e	R^2
35,52±0,35	0,98±0,45				0,85
	100,00%				

R^2 : coeficiente de determinación; A_0 : propiedad del soluto a correlacionar ($v_{m\acute{a}x}$); Coeficientes de correlación en el análisis de Kamlet y Taft de: acidez (a), basicidad (b) y polaridad-polarizabilidad (s), del disolvente; Coeficientes de correlación en el análisis de Catalán de: acidez (a_{SA}), basicidad (b_{SB}), polarizabilidad (C_{SP}) y dipolaridad (d_{SDP}), del disolvente; Coeficientes de regresión en el análisis de Laurence de: acidez (a_1), basicidad (b_1) dispersión e interacciones de inducción electrónica (d_i) e interacciones electrostáticas (e), del disolvente.

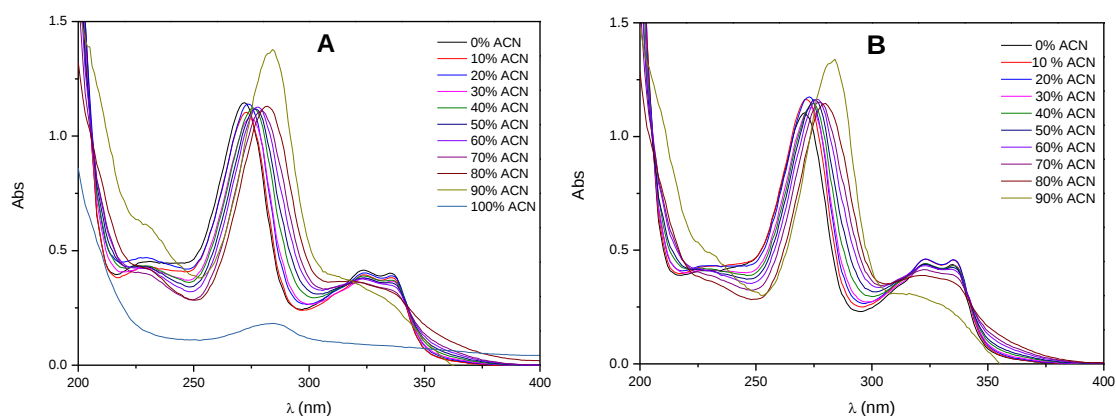
En el análisis de CIP se observó que, en los 3 modelos (Kamlet y Taft, Catalán y Laurence), la capacidad donora de puente hidrógeno del solvente es fundamental y el único parámetro relevante.

Parra y col. (2023) evaluaron el papel de diferentes interacciones intermoleculares en los procesos de disolución de CIP empleando el modelo de Kamlet y Taft. Dedujeron que los parámetros que presentaron la contribución más significativa fueron la capacidad ácida de los disolventes y la polarización de la molécula de CIP. La contribución negativa del comportamiento de las bases de Lewis sobre la solubilidad de CIP fue atribuida a interacciones soluto-soluto desfavorables entre el grupo carboxilo de una molécula de CIP y el grupo amino de otra molécula de CIP en el estado de disolución.

6.5.1.4. Solvatocromismo en mezclas de solventes:

buffer-ACN

Las Figuras 6.8 A y B muestran el perfil de absorbancia de las diluciones de NOR y CIP, que se detallaron en la Tabla 6.3, en mezclas de buffer-ACN. Se observan las dos bandas características de las FQ en cada caso. Resulta evidente, además, un desplazamiento batocrómico a medida que aumenta la concentración de ACN en la mezcla. En el caso de CIP, no se pudo realizar la medición a 100% ACN debido a la insolubilidad del IFA en ese solvente. Para NOR se observa que en la concentración de 100% ACN desaparece la banda II.



Figuras 6.8. Espectro de absorción del UV-Vis de **A.** NOR y **B.** CIP en la mezcla binaria buffer pH 7,4-ACN en distintas proporciones.

A continuación, en la Tabla 6.10, se muestran los resultados del estudio de correlación lineal de NOR y de CIP. Se aplicó solamente el método de Kamlet y

Taft por no tener disponibles datos bibliográficos de los métodos de Catalán y Laurence para los solventes empleados.

Tabla 6.10. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas de los coeficientes del parámetro para el análisis de regresión lineal múltiple de datos experimentales de FQ.

Kamlet y Taft					
	A ₀	a	b	s	R ²
NOR	32,69±0,2 6			3,55±0,27	0,98
				100,00%	
CIP	32,28±0,7 0	1,94±1,25	1,39±0,89	1,68±1,35	0,97
		38,67%	27,50%	33,49%	

A₀: propiedad del soluto a correlacionar; Coeficientes de correlación en el análisis de Kamlet y Taft de: acidez (a), basicidad (b) y polaridad-polarizabilidad (s), del disolvente; R²: coeficiente de determinación.

Se observa que el parámetro π^* (polaridad-polarizabilidad del solvente) es el único que contribuye al solvatocromismo de NOR en ésta mezcla binaria. En el caso de CIP, el aporte de los 3 parámetros es casi equitativo, con mayor influencia de α , o de la capacidad del solvente de aceptar uniones puente hidrógeno.

En la **Tabla 6.11** se presentan los valores de E_{12} , χ^L_{ACN} y δ_{S2} de NOR y CIP en las mezclas de solvente buffer-ACN.

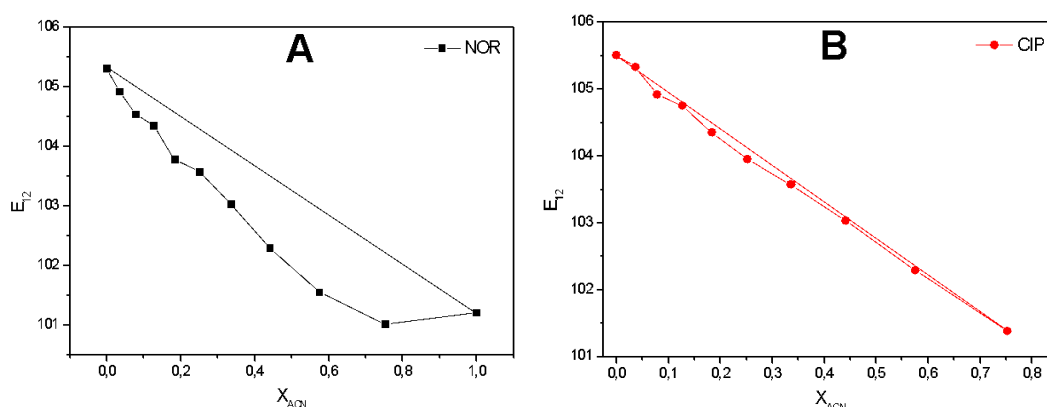
Tabla 6.11. E_{12} , χ^L_{ACN} y δ_{S2} de NOR y CIP en distintas fracciones molares de ACN (χ_{ACN}).

NOR buffer-ACN				CIP buffer-ACN		
χ_{ACN}	E_{12}	χ^L_{ACN}	δ_{S2}	E_{12}	χ^L_{ACN}	δ_{S2}
0	105,31	0	0	105,50	0	0
0,036	104,92	0,09	0,06	105,33	0,03	-0,01
0,078	104,54	0,19	0,11	104,92	0,09	0,01
0,127	104,35	0,23	0,11	104,75	0,12	-0,01
0,184	103,78	0,37	0,19	104,35	0,18	0,00
0,252	103,57	0,42	0,17	103,95	0,24	-0,01
0,336	103,03	0,56	0,22	103,57	0,30	-0,03
0,441	102,29	0,74	0,29	103,03	0,39	-0,05
0,575	101,55	0,92	0,34	102,29	0,51	-0,07
0,753	101,01	1,05	0,30	101,39	0,65	-0,10
1	101,21	1	0			

χ_{ACN} : fracción molar de acetonitrilo; E_{12} : energía de transición (kcal/mol) en la mezcla de solventes; χ^L_{ACN} : fracción molar de acetonitrilo en la región cibotáctica; δ_{S2} : solvatación preferencial.

Las Figuras **6.9. A y B** muestran la relación entre E_{12} y χ_{ACN} para NOR y CIP respectivamente. La línea recta que une los puntos correspondientes a E_{12} de la

solución acuosa y de la solución en ACN puro representa a la situación ideal en la cual la composición del solvente en la región cibotáctica es la misma que en el seno de la solución, y se utiliza para observar la tendencia en la distribución de los puntos experimentales, carece de significado estadístico. Se observa que, E_{12} de la banda I de NOR no presenta relación lineal con respecto a χ_{AC} . Esto indica la existencia de SP_r por ACN en todas las proporciones ensayadas se correlaciona con el signo positivo del valor de δ_{S2} , en donde queda confirmada la capacidad de NOR de establecer interacciones intermoleculares con ACN. Para CIP en cambio, en la **Figura 6.9. B** se observa una relación prácticamente lineal entre E_{12} y χ_{AC} ; esto indica que el solvente que rodea al soluto presenta las mismas características que el resto del solvente, es decir que no se evidencia SP_r significativa en este medio, esto corresponde a un comportamiento ideal, donde la composición del solvente en la región cibotáctica permanece igual a la de la solución en masa para cualquier valor de X_2 . Este comportamiento se corrobora con el valor de δ_{S2} que es cercano a cero en todas las proporciones de ACN.



Figuras 6.9. E_{12} de A. NOR y B. CIP vs χ_{ACN} .

6.5.1.5. Solvatocromismo en mezclas de solventes:

MeOH-buffer

Las **Figuras 6.10. A y B** muestran el perfil de absorbancia de las diluciones que se detallaron en **Tabla 6.5** trabajando con NOR y CIP en mezclas binarias de buffer-MeOH pH 7,4. Se observan las dos bandas características de las FQ y un desplazamiento batocrómico a medida que aumenta la concentración de MeOH en la mezcla. En el caso de CIP, no se pudo realizar la medición a 100% MeOH debido a la insolubilidad del IFA en este solvente. Para NOR se observa que en la concentración de 100% MeOH la banda II sufre un efecto hipocrómico.

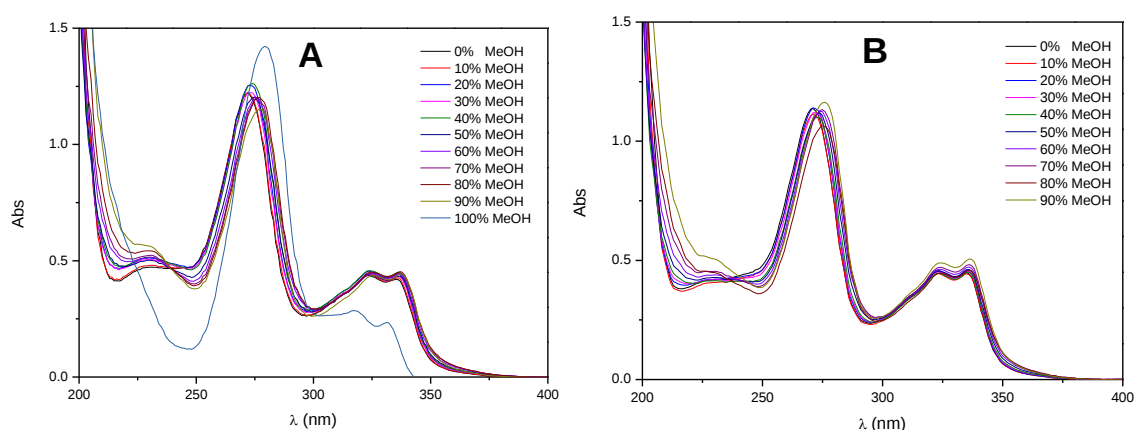


Figura 6.10. Espectro de absorción de **A.** NOR y **B.** CIP en buffer-MeOH en distintas proporciones.

En la **Tabla 6.12** se muestran los resultados del estudio de correlación lineal de NOR y CIP en mezclas binarias de buffer-MeOH.

Tabla 6.12. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas de los coeficientes del parámetro para el análisis de regresión lineal múltiple de datos experimentales de NOR y CIP.

	Kamlet y Taft			
	A_0	a	b	s
NOR	35,09±0,15			1,37±0,15
				100,00%
CIP	34,68±0,16	1,00±0,25		0,87±0,13
		53,54%		46,45%

A_0 : propiedad del soluto a correlacionar; Coeficientes de correlación en el análisis de Kamlet y Taft de: acidez (a), basicidad (b) y polaridad-polarizabilidad (s), del disolvente.

A partir del análisis de correlación (**Tabla 6.12**) se observa que para NOR el único parámetro con relevancia es π^* . En el caso de CIP, los dos parámetros de mayor relevancia son α y π^* , siendo la capacidad del solvente buffer-MeOH de ceder uniones puente hidrógeno, el factor que más contribuye en la interacción intermolecular en solución.

La **Tabla 6.13** presenta los valores calculados de E_{12} , χ^L_{ACN} y δ_{S2} para NOR y CIP en mezclas de buffer-MeOH.

Tabla 6.13. E_{12} , χ^L_{MeOH} y δ_{S2} de NOR y CIP en distintas χ_{MeOH} .

NOR buffer-MeOH				CIP buffer-MeOH		
χ_{MeOH}	E_{12}	χ^L_{MeOH}	δ_{S2}	E_{12}	χ^L_{MeOH}	δ_{S2}
0	105,11	0	0	105,50	0	0
0,05	105,31	-0,09	-0,13	105,50	0	-0,05
0,10	104,73	0,15	0,05	105,33	0,11	0,01
0,16	104,73	0,15	-0,01	105,33	0,11	-0,05
0,23	104,35	0,31	0,08	105,13	0,24	0,01
0,31	104,35	0,31	0,00	104,75	0,49	0,18
0,40	103,78	0,54	0,14	104,54	0,62	0,22
0,51	103,78	0,54	0,04	104,35	0,74	0,23
0,64	103,59	0,62	-0,02	104,14	0,88	0,24
0,80	103,59	0,62	-0,18	103,95	1,00	0,20
1	102,66	1	0			

χ_{MeOH} : fracción molar de metanol; E_{12} : energía de transición (kcal/mol) en la mezcla de solventes; χ^L_{MeOH} : fracción molar de metanol en la región cibotáctica; δ_{S2} : solvatación preferencial.

A continuación, en las **Figuras 6.11 A y B** se grafica E_{12} en función de la fracción molar de MeOH para cada FQ. En la **Figura 6.11.A** se observa que NOR se encuentra preferencialmente solvatado por el buffer cuando la proporción de MeOH es de 10 % y de 80 % a 100% v/v. En cambio, NOR se encuentra solvatado preferencialmente por MeOH cuando el % v/v de MeOH es del 20, 40 y 60 %, y no muestra SPr cuando el porcentaje de MeOH en el solvente es del 30, 50 y 70-80 % v/v. En el caso de CIP (**Figura 6.11.B**), la región cibotáctica se encuentra enriquecida en buffer cuando la proporción de MeOH en la mezcla de solventes es igual o menor al 40 % v/v. Por otra parte, CIP es solvatado preferencialmente por MeOH cuando la proporción de este solvente en la mezcla supera el 40%.

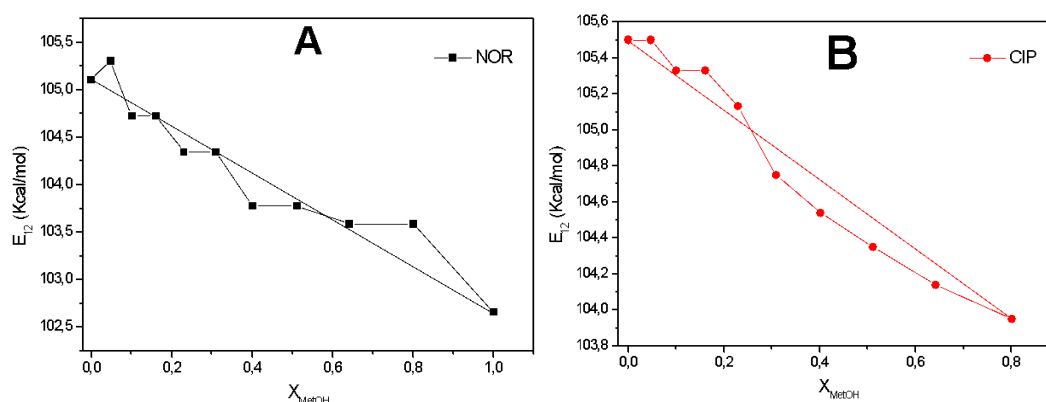


Figura 6.11. E_{12} de **A. NOR** y **B. CIP** vs χ_{MeOH} .

Es importante señalar que los solventes ACN y MeOH no se utilizan para desarrollar formas farmacéuticas debido a su alta toxicidad, sin embargo, en algunos casos se utilizan en procedimientos de purificación de fármacos y en algunas técnicas de microencapsulación. Además, el MeOH es la fase móvil más común en la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (Cárdenas et al., 2016). Es por ello que los resultados obtenidos son útiles para poner en evidencia e interpretar el comportamiento de los IFA en solución.

La **Tabla 6.14** presenta un resumen de los resultados obtenidos para el análisis cuantitativo del efecto solvatocrómico mediante los modelos multiparamétricos de Kamlet-Taft, Catalán y Laurence. Además, se incluye el comportamiento de FQ disuelta en mezclas binarias de solventes con distintas proporciones (SPr). Se observa que, en el caso de NOR, el parámetro electrónico es el factor más relevante, mientras que para CIP lo es la acidez del disolvente, independientemente de si se trata de disolventes puros o mezclas binarias de solventes.

Tabla 6.14. Resumen de los parámetros más relevantes por solvatocromismo en solventes puros y en mezclas de solventes; y Solvatación Preferencial.

	Solvato solventes puros			Solvato mezcla de solventes		SPr mezcla de solventes	
	KyT	Catalán	Laurence	B-ACN	B-MeOH	B-ACN	B-MeOH
NOR	β	SP	DI	π^*	π^*	ACN	20-40-60% MeOH
CIP	α	SA	α_1	α	α	-	>40%MeOH

Solvato: Solvatación; SPr: solvatación preferencial; K y T: Kamlet y Taft; B: buffer; ACN: Acetonitrilo; MeOH: Metanol; α : capacidad ácida del solvente; β : capacidad básica del solvente; π^ : polaridad polarizabilidad del solvente; SA: acidez del solvente; SP: polarizabilidad del solvente; DI: Interacciones de dispersión e inducción; α_1 : dador de hidrógenos o acidez del solvente.*

6.5.2. SULFONAMIDAS EN SOLUCIÓN

6.5.2.1. Espectrofotometría UV-Visible

Los espectros de absorción obtenidos para las SA en buffer pH 7,4 presentan un máximo comprendido entre 250-270 nm. Particularmente el máximo de absorción registrado para SNA se observa a los 260 nm (**Figura 6.12.A**) y el de SMX a los 256,05 nm (**Figura 6.12.B**).

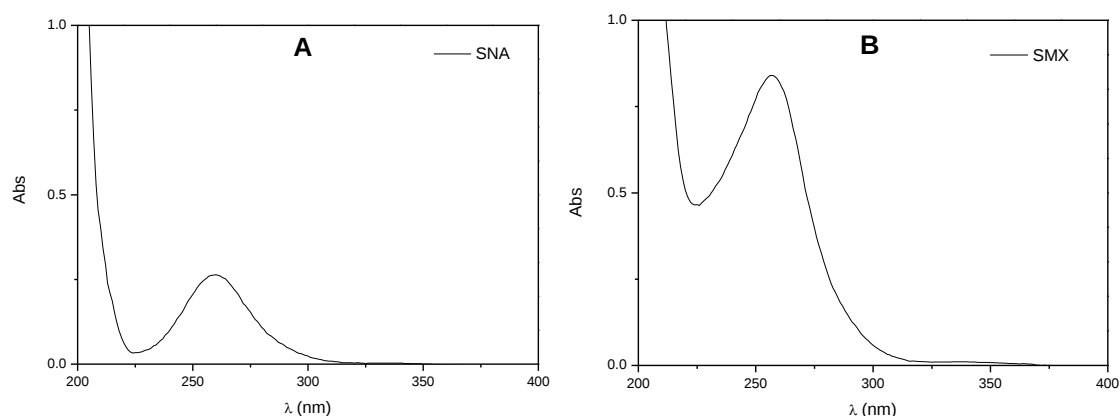


Figura 6.12. Espectro de absorción de **A.** SNA y **B.** SMX en buffer 7,4.

5.5.2.2. Termocromismo

En la **Figura 6.13** se observan los espectros UV-Vis de SNA registrados en el rango de temperatura comprendido entre 25 y 65 °C y es posible diferenciar dos puntos isobéuticos, uno situado en 229 nm y el otro en 272 nm. En la **Figura 6.14** se observan los espectros UV-Vis de SMX registrados en las mismas condiciones que los de SNA. En este caso también se forman dos puntos isobéuticos, pero están desplazados hacia regiones de menor energía, a 262 y 323 nm. En ambos casos, este comportamiento es indicativo de la formación de un equilibrio intramolecular de cada SA en solución, que podría atribuirse al existente entre la especie aniónica y la no iónica predominantes en el valor de pH al cual fue realizado el ensayo.

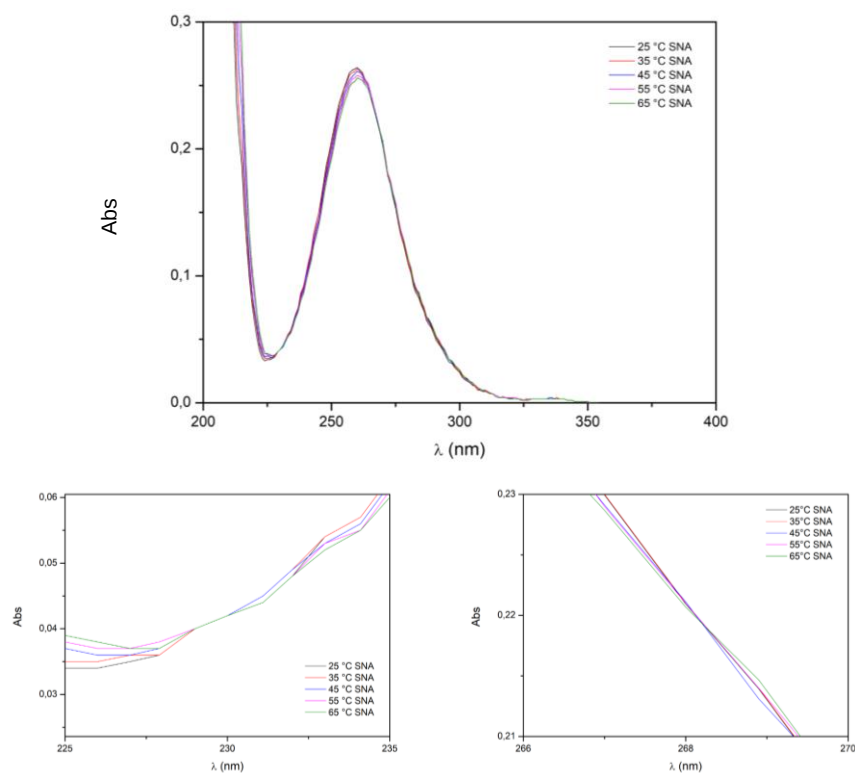


Figura 6.13. Espectros de absorción de SNA (pH= 7,4) registrados a 25°, 35°, 45°, 55°, 65 °C y puntos isobésticos observados a 229 y 272 nm.

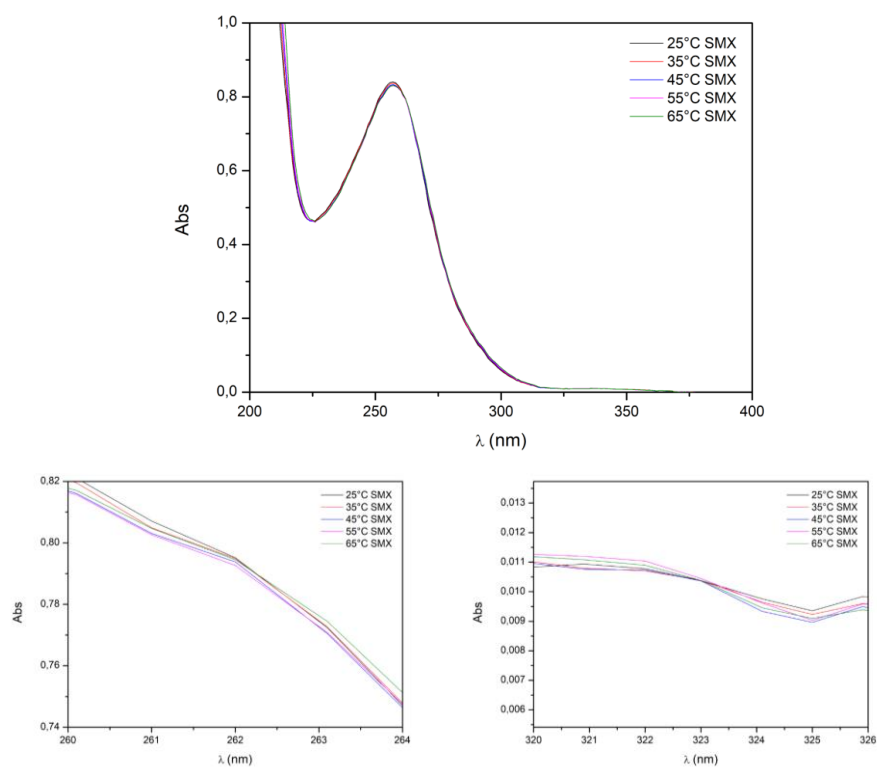


Figura 6.14. Espectros de absorción de SMX (pH= 7,4) registrados a a 25°, 35°, 45°, 55°, 65 °C y puntos isobésticos observados a 262 y 323 nm.

5.5.2.3. Solvatocromismo en solventes puros

En la **Tabla 6.15** se observan los resultados de longitud de onda de máxima absorción y número de onda para ambas SA en los solventes ensayados, los IFA no se disolvieron en ciclohexano y hexano.

Tabla 6.15. Valores experimentales de longitud de onda de máxima absorción y número de onda de SNA y SMX en los distintos solventes.

Solvente	SNA		SMX	
	$\lambda_{\text{máx}}(\text{nm})$	$\nu_{\text{máx}}(\text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\text{máx}}(\text{nm})$	$\nu_{\text{máx}}(\text{cm}^{-1})$
Cy	n.s.		n.s.	
Hex	n.s.		n.s.	
ACN	262,1	38,17	260,5	38,39
MeOH	265,1	37,82	271,05	36,89
EtOH	262,1	38,17	270,05	37,03
PrOH	263,0	38,17	269,55	37,10
ButOH	262,1	38,24	266,45	37,53
OcOH	258,0	38,68	256,0	39,06
Agua	260,0	38,47	256,05	39,05

n.s.: no soluble; Cy: ciclohexano; Hex: n-Hexano; ACN: Acetonitrilo; MeOH: Metanol; EtOH: Etanol; PrOH: 1-Propanolol; ButOH: n-Butanol; OcOH: 1-Octanol.

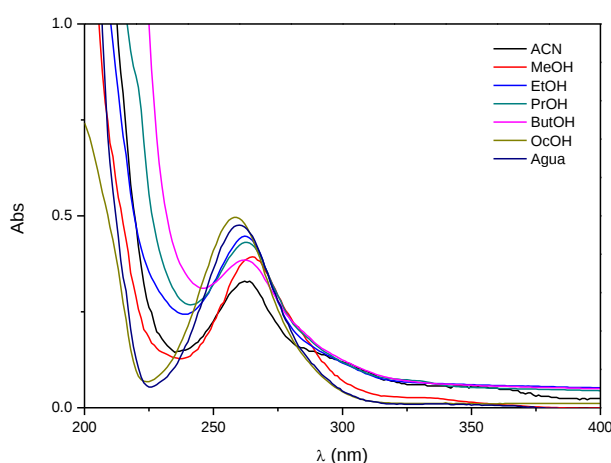


Figura 6.15. Espectro de absorción de SNA en los solventes en estudio.

Los espectros UV-Vis de SNA (**Figura 6.15**) exhiben una banda de máxima absorción con máximos comprendidos entre 258 y 265,1 nm. Considerando los desplazamientos solvatocrómicos experimentales derivados de las transiciones electrónicas $\pi-\pi^*$ y tomando como referencia al solvente de naturaleza aprótica, ACN ($\lambda_{\text{máx}} = 262,1 \text{ nm}$) observamos que en MeOH y PrOH solventes polares próticos, ocurren corrimientos batocromicos del orden de 3 y 0,9 nm respectivamente. Se observan corrimientos hipsocromicos con 1-octanol (4,1 nm) y agua (2,1 nm).

Por último, no hay corrimiento en EtOH ni en ButOH (solventes de naturaleza polar prótica).

Según se observa en la **Tabla 6.12**, los espectros UV-Vis de SMX (**Figura 6.16**) exhiben una banda de máxima absorción con máximo comprendido entre 256 y 271,05 nm. Tomando como referencia al solvente de naturaleza aprótica, ACN ($\lambda_{\text{max}} = 260,5$ nm) se observa que ocurren corrimientos batocrómicos en los solventes polares próticos MeOH, EtOH, PrOH y ButOH, del orden de 10,55, 9,55, 9,05 y 5,95 nm respectivamente. Por otra parte, en agua y OcOH los corrimientos de los máximos de absorción son hipsocrómicos y de 4,45 y 4,5 nm respectivamente.

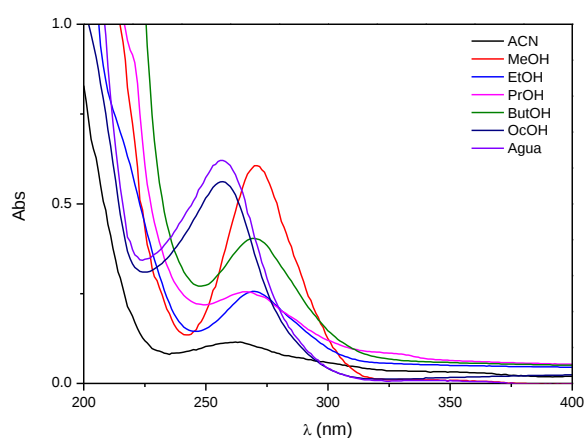


Figura 6.16. Espectros de absorción de SMX en los solventes en estudio.

Las **Tablas 6.16 y 6.17** muestran los coeficientes y errores asociados con todos los parámetros de las regresiones lineales múltiples en el análisis de solvatocromismo realizado mediante las ecuaciones de Kamlet y Taft, Catalán y Laurence para SNA y SMX respectivamente. Además, se informa el coeficiente de determinación y la contribución relativa de cada parámetro.

La ecuación multiparamétrica de **Kamlet y Taft** describe que β , es decir la capacidad aceptora de uniones puente hidrógeno del solvente (con los grupos funcionales $-\text{NH}_2$ y $-\text{SO}_2\text{NH}$) es el parámetro más importante en el solvatocromismo de esta sustancia (51,99%). Estas interacciones estabilizarían más el estado excitado que el fundamental dando como resultado los desplazamientos hipsocrómicos observados. En la **ecuación de Catalán**, se observa solo la contribución del parámetro SP (polarizabilidad del solvente). Por el contrario, en la **ecuación de Laurence** el parámetro α no tiene significancia y el parámetro más importante es el ES (58,44%) seguido por β (30,87%) y por último DI (10,33%).

Esta última ecuación integra lo que muestran las dos primeras, la importancia del parámetro de polaridad así como también la basicidad del solvente.

Tabla 6.16. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas de cada parámetro obtenido del análisis de regresión lineal múltiple de datos experimentales de SNA.

SNA					
Kamlet y Taft					
A_0	a	b	s		R^2
37,3±0,23	1,59±0,40	3,26±0,44	1,42±0,38		0,97
	25,36%	51,99%	22,65%		
Catalán					
A_0	a_{SA}	b_{SB}	C_{SP}	d_{SDP}	R^2
32,90±1,05			7,94±1,41		0,97
			100,00%		
Laurence					
A_0	a_1	b_1	d_i	e	R^2
45,70±0,51	0,04±0,02	3,21±0,15	1,07±0,29	6,08±0,31	0,99
	0,41%	30,87%	10,33%	58,44%	

R^2 : coeficiente de determinación; A_0 : propiedad del soluto a correlacionar; Coeficientes de correlación en el análisis de Kamlet y Taft de: acidez (a), basicidad (b) y polaridad-polarizabilidad (s), del disolvente; Coeficientes de correlación en el análisis de Catalán de: acidez (a_{SA}), basicidad (b_{SB}), polarizabilidad (C_{SP}) y dipolaridad (d_{SDP}), del disolvente; Coeficientes de regresión en el análisis de Laurence de: acidez (a_1), basicidad (b_1) dispersión e interacciones de inducción electrónica (d_i) e interacciones electrostáticas (e), del disolvente.

Tabla 6.17. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas de los coeficientes del parámetro para el análisis de regresión lineal múltiple de datos experimentales de SMX.

SMX					
Kamlet y Taft					
A_0	a	b	s		R^2
36,76±1,09			1,77±0,65		0,97
			100,00%		
Catalán					
A_0	a_{SA}	b_{SB}	C_{SP}	d_{SDP}	R^2
50,25±1,52	0,85±0,42	6,97±0,84		10,14±1,27	0,98
	4,74%	38,79%		56,47%	
Laurence					
A_0	a_1	b_1	d_i	e	R^2
59,99±3,25		12,54±1,89		17,33±2,77	0,97
		42,00%		58,00%	

R^2 : coeficiente de determinación; A_0 : propiedad del soluto a correlacionar; Coeficientes de correlación en el análisis de Kamlet y Taft de: acidez (a), basicidad (b) y polaridad-polarizabilidad (s), del disolvente; Coeficientes de correlación en el análisis de Catalán de: acidez (a_{SA}), basicidad (b_{SB}), polarizabilidad (C_{SP}) y dipolaridad (d_{SDP}), del disolvente; Coeficientes de regresión en el análisis de Laurence de: acidez (a_1), basicidad (b_1) dispersión e interacciones de inducción electrónica (d_i) e interacciones electrostáticas (e), del disolvente.

En el caso de SMX (**Tabla 6.17**) el parámetro más importante descrito por la ecuación multiparamétrica de **Kamlet y Taft** es el de la polaridad-polarizabilidad del solvente con el 100% de contribución, indicando que esta sustancia presenta mayor estabilidad en el estado excitado que en el fundamental. La **ecuación de Catalán** coincide en que el parámetro más importante es el que explica la dipolaridad del solvente con el 56,47% de contribución, también se observa una contribución del parámetro SB, que proporciona la medición de la basicidad del solvente (38,79%), seguido de una menor contribución del parámetro SA. En la ecuación de **Laurence** se observa lo mismo que en la de Catalán, el parámetro ES es el más importante (58%) seguido por β_1 (42%).

5.5.2.4. Solvatocromismo en mezclas de solventes:

buffer-ACN

Las **Figuras 6.17. A y B**, muestran el perfil de absorbancia de las diluciones que se detallaron en **Tabla 6.4** trabajando con SNA y SMX en mezclas binarias de buffer-ACN. Se observa la banda característica de las SA y el desplazamiento batocrómico a medida que aumenta la concentración de ACN en la mezcla, como sucede con las FQ.

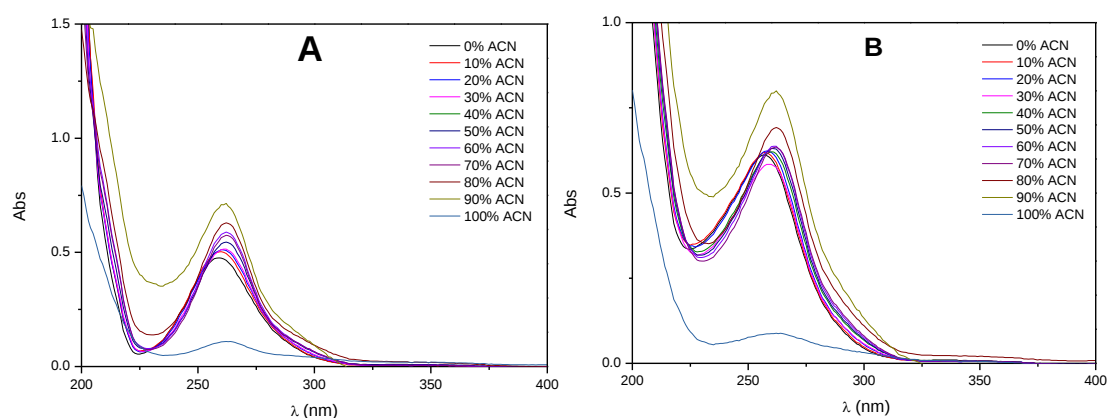


Figura 6.17. Espectro de absorción para: **A.** SNA y **B.** SMX en buffer pH 7,4-ACN en distintas proporciones.

A continuación, se muestran los resultados del estudio de correlación lineal de SNA y SMX en mezclas binarias de buffer-ACN, aplicando la ecuación multiparamétrica de Kamlet y Taft (**Tabla 6.18**).

Tabla 6.18. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas de los coeficientes de los parámetros para el análisis de regresión lineal múltiple de SNA y SMX en buffer-ACN.

Kamlet y Taft					
	A_0	a	b	s	R^2
SNA	38,98±0,16		1,79±0,42		0,98
			100%		
SMX	37,46±0,27	0,57±0,17	1,03±0,32	2,08±0,31	0,98
		15,49%	27,99%	56,52%	

A_0 : propiedad del soluto a correlacionar; Coeficientes de correlación en el análisis de Kamlet y Taft de: acidez (a), basicidad (b) y polaridad-polarizabilidad (s), del disolvente; R^2 : coeficiente de determinación.

Para SNA, el parámetro β (capacidad aceptora de uniones puente hidrógeno del solvente), es el único que contribuye al solvatocromismo. En SMX de acuerdo con la ecuación de correlación lineal, los parámetros de importancia que intervienen son π^* (56,52%) y β (27,99%) y α (15,49%), siendo el parámetro π^* (polaridad-polarizabilidad del solvente) es el de mayor significancia.

La **Tabla 6.19** presenta E_{12} , χ^L_{ACN} y δ_{S2} de SA en distintas fracciones molares de ACN (χ_{ACN}).

Tabla 6.19. E_{12} , χ^L_{ACN} y δ_{S2} de SA en distintas fracciones molares de ACN (χ_{ACN}).

SNA buffer-ACN				SMX buffer-ACN		
χ_{ACN}	E_{12}	χ^L_{ACN}	δ_{S2}	E_{12}	χ^L_{ACN}	δ_{S2}
0	110,41	0	0	111,49	0	0
0,036	109,97	-0,09	0,31	111,29	0,13	0,09
0,078	109,75	0,15	0,42	110,82	0,44	0,36
0,127	109,57	0,15	0,52	110,60	0,58	0,45
0,184	109,33	0,31	0,64	110,20	0,85	0,66
0,252	109,15	0,31	0,72	110,01	0,97	0,72
0,336	109,15	0,54	0,63	109,78	1,12	0,79
0,441	109,15	0,54	0,53	109,57	1,26	0,82
0,575	109,11	0,62	0,42	109,33	1,41	0,84
0,753	109,73	0,62	-0,23	109,73	1,15	0,40
1	109,11	1	0	109,97	1	0

χ_{ACN} : fracción molar de acetonitrilo; E_{12} : energía de transición (kcal/mol) en buffer-acetonitrilo;
 χ^L_{ACN} : fracción molar de acetonitrilo en la región cibotáctica y δ_{S2} : solvatación preferencial.

La relación entre E_{12} y la fracción molar de ACN (χ^L_{ACN}) se grafica en las **Figuras 6.18. A y B** para SNA y SMX respectivamente. En ambos casos se observa que E_{12} varía en forma no lineal respecto a la χ^L_{ACN} demostrando que tanto SNA como SMX se solvatan preferencialmente por ACN, excepto SNA cuando la composición del

solvente es 90 % ACN. Se ha descrito que las moléculas de agua generan redes fuertes de uniones puente hidrógeno que no son fácilmente alteradas por la presencia del cosolvente, este comportamiento puede explicar los elevados valores de δ_{S2} , que reflejan que el agua interactúa preferentemente entre sus mismas moléculas antes que con las de SA, entonces moléculas aisladas de ACN interactúan con el soluto formando parte de la esfera de solvatación. En regiones ricas en ACN, este solvente interactúa con la red de moléculas de agua generando agregados agua-ACN y por lo tanto el valor de δ_{S2} disminuye (Almandoz et al., 2014^b).

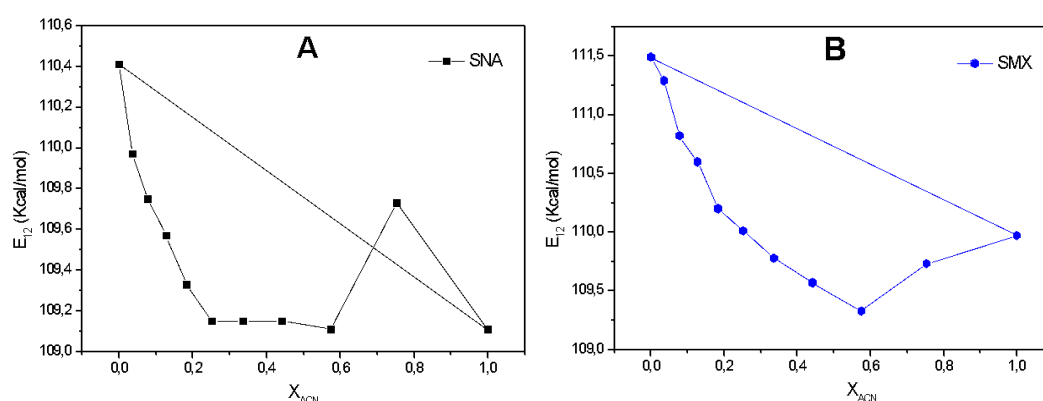


Figura 6.18. E_{12} de: A. SNA y B. SMX vs X_{ACN} .

5.5.2.5. Solvatocromismo en mezclas de solventes:

buffer-MeOH

Las Figuras 6.19. A y B muestran el perfil de absorbancia de las diluciones que se detallaron en Tabla 6.4 trabajando con SNA y SMX en mezclas binarias de solventes buffer pH 7,4-MeOH:

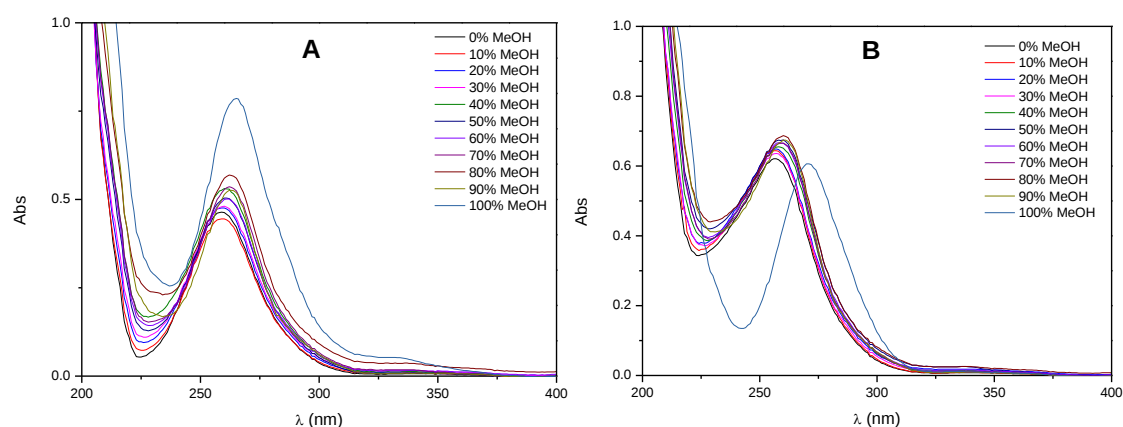


Figura 6.19. Espectro de absorción de: A. SNA y B. SMX en buffer-MeOH.

A continuación, se muestran los resultados del estudio de correlación lineal de SNA y SMX en mezcla binaria de buffer-MeOH, aplicando la ecuación multiparamétrica de Kamlet y Taft (**Tabla 6.20**).

Tabla 6.20. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas de los coeficientes del parámetro para el análisis de regresión lineal múltiple de datos experimentales de SA.

	Kamlet y Taft			
	A_0	a	b	s
SNA	36,69±0,29	0,47±0,37 29,17%		1,14±0,15 70.83%
SMX	39,56±1,77	4,66±2,25 52,27%		4,25±0,91 47,72%

A_0 : propiedad del soluto a correlacionar; Coeficientes de correlación en el análisis de Kamlet y Taft de: acidez (a), basicidad (b) y polaridad-polarizabilidad (s), del disolvente.

En el caso de SA, los parámetros que se destacan son los mismos para ambas, con la diferencia que el parámetro más relevante para SNA es π^* (70,83%) y para SMX, se destaca el parámetro α (52,27%).

La **Tabla 6.21** presenta E_{12} , χ^L_{ACN} y δ_{S2} de SA en distintas fracciones molares de MeOH χ^L_{MeOH} .

Tabla 6.21. Se muestran los parámetros E_{12} , χ^L_{ACN} y δ_{S2} de SA en distintas proporciones de MeOH.

SNA buffer-MeOH				SMX buffer-MeOH		
χ_{MeOH}	E_{12}	χ^L_{MeOH}	δ_{S2}	E_{12}	χ^L_{MeOH}	δ_{S2}
0	110,39	0	0	111,47	0	0
0,05	110,18	0,09	0,05	111,47	0,00	-0,05
0,10	110,18	0,09	-0,01	111,47	0,00	-0,10
0,16	110,18	0,09	-0,07	111,25	0,04	-0,12
0,23	109,97	0,18	-0,05	111,03	0,07	-0,16
0,31	109,54	0,37	0,06	110,82	0,11	-0,20
0,40	109,54	0,37	-0,03	110,82	0,11	-0,29
0,51	109,13	0,55	0,04	110,60	0,14	-0,37
0,64	108,92	0,64	0,00	110,39	0,18	-0,46
0,80	108,92	0,64	-0,16	109,97	0,25	-0,55
1	108,09	1	0	105,50	1	0

χ_{MeOH} : fracción molar de metanol; E_{12} : energía de transición (kcal/mol) en buffer-metanol; χ^L_{MeOH} : fracción molar de metanol en la región cibotáctica; δ_{S2} : solvatación preferencial.

A continuación, las figuras que se presentan corresponden a E_{12} vs fracción molar de MeOH para SA. En la **Figura 6.20.A** se observa que SNA presenta un comportamiento muy dependiente de la composición del solvente. En las concentraciones 10, 50 y 70 v/v la región cibotáctica se encuentra enriquecida en MeOH, en las concentraciones 30, 40, 60 y 90 % v/v predomina el buffer y en las concentraciones 20 y 80 % v/v no presenta SPr. SMX (**Fig. 6.20.B**), sin embargo, presenta SPr por el buffer en las distintas proporciones ensayadas.

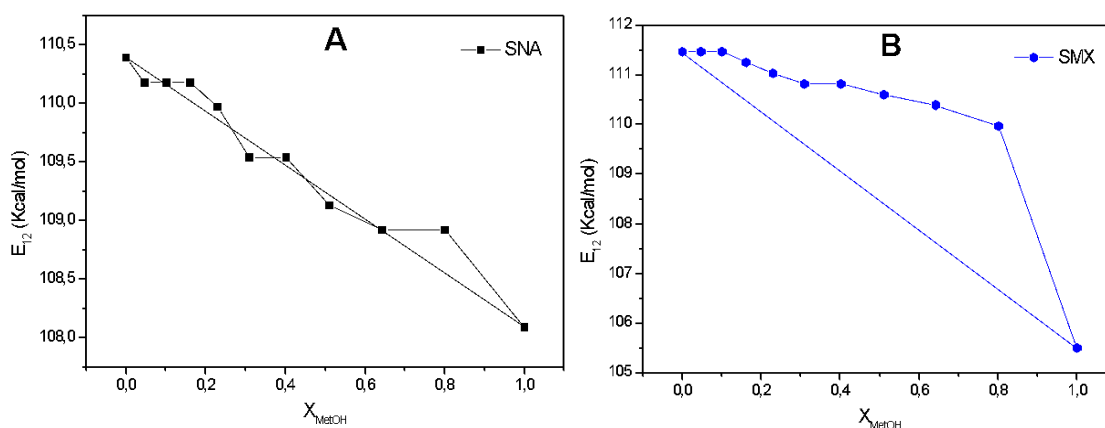


Figura 6.20. E_{12} de: **A.** SNA y **B.** SMX vs χ_{MeOH} .

La **Tabla 6.22** presenta un resumen de los resultados obtenidos para el análisis cuantitativo del efecto solvatocrómico de las SA mediante los modelos multiparamétricos de Kamlet-Taft, Catalán y Laurence. Además, se incluye el comportamiento de SA disuelta en mezclas binarias de solventes con distintas proporciones (SPr). Se observa que, en el caso de SNA y SMX, el parámetro electrónico es el factor más relevante, independientemente de si se trata de disolventes puros o mezclas binarias de solventes.

Tabla 6.22. Resumen de los parámetros más relevantes obtenidos por solvatocromismo en solventes puros y en mezclas de solventes; y Solvatación Preferencial.

	Solvato en solventes Puros			Solvato en Mezcla de solventes		SPr mezcla de solventes	
	KyT	Catalán	Laurence	B-ACN	B-MeOH	B-ACN	B-MeOH
SNA	β	SP	ES	β	π^*	0-80%ACN	10-50-70% MeOH
SMX	π^*	SdP	ES	π^*	α y π^*	ACN	MeOH

Solvato: Solvatación; SPr: solvatación preferencial; K y T: Kamlet y Taft; B: buffer; ACN: Acetonitrilo; MeOH: Metanol; α : capacidad ácida del solvente; β : capacidad básica del solvente; π^* : polaridad polarizabilidad del solvente; SP: polarizabilidad del solvente; SdP: dipolaridad; ES: interacciones electrostáticas.

6.5.3. MEZCLAS DE FQ-SA EN SOLUCIÓN

6.5.3.1. Espectrofotometría UV-Visible: Efecto del aumento de concentración de FQ

Se analizaron soluciones de NOR y CIP en el rango de concentraciones comprendido entre 3×10^{-6} M y 6×10^{-5} M, manteniendo fija la concentración de SA ($1,5 \times 10^{-5}$ M) en todos los casos. El pH de las soluciones fue de 7,4; se obtuvieron los espectros de absorción que se presentan en la **Figura 6.21 A-B** y **Figura 6.22 A-B**.

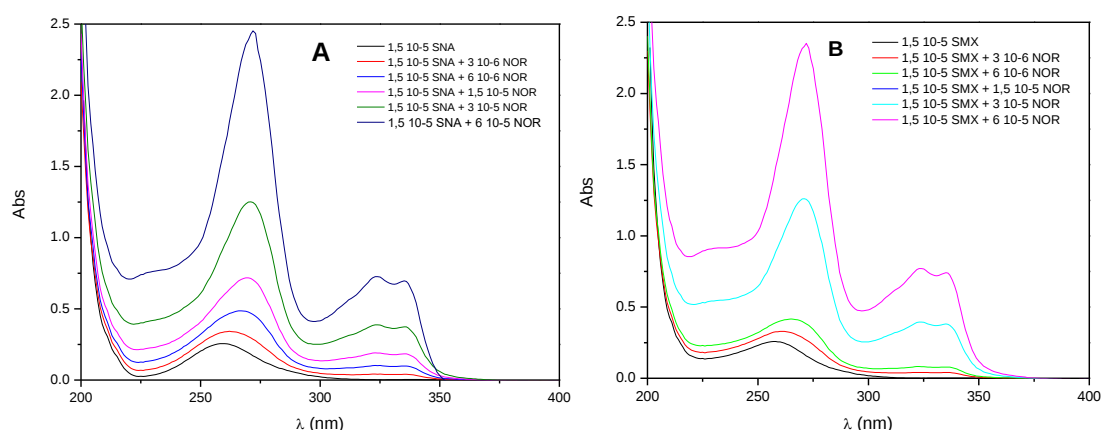


Figura 6.21. Espectros de absorción de soluciones de NOR en concentraciones crecientes en presencia de concentración fija de: **A.** SNA y **B.** SMX, a pH= 7,4.

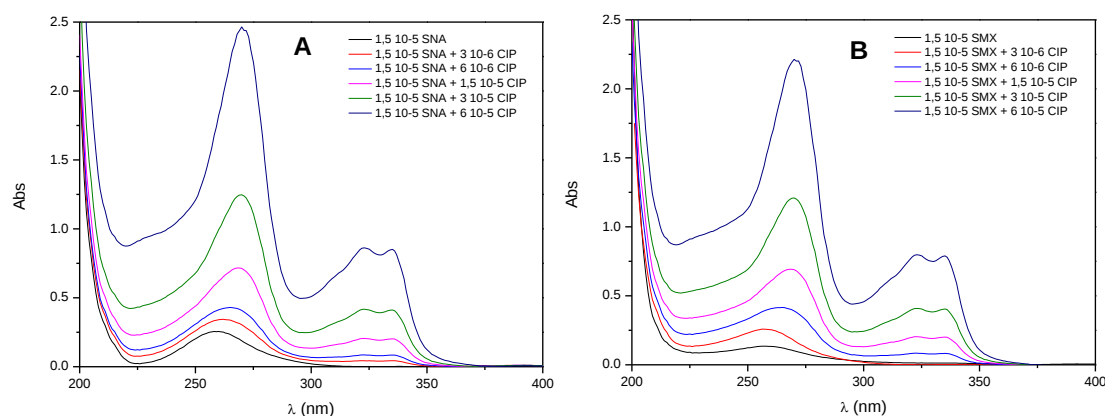


Figura 6.22. Espectros de absorción de soluciones de CIP en concentraciones crecientes en presencia de concentración fija de **A.** SNA y **B.** SMX, a pH= 7,4.

Se observa que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración, según determinaciones espectrofotométricas realizadas sobre soluciones de concentración creciente FQ en presencia de una concentración fija de SA. También se puede notar que esta relación es lineal. La falta de puntos isobésticos y este comportamiento indican que, en el rango de concentración

estudiado (de aproximadamente 3×10^{-6} a 3×10^{-4} M), y mediante esta metodología, no se encuentra una asociación molecular entre FQ y SA en solución acuosa. Este resultado es coincidente con el reportado por Lecomte y col. (1996), quienes evaluaron el grado de extensión del “stacking” de pefloxacin en solución, mediante ^1H , ^{13}C y ^{19}F RMN y determinaron que, a concentraciones inferiores a 10^{-4} M, esta sustancia se encontraría en solución en forma monomérica. La ausencia de puntos isobésticos, en este rango de concentraciones, se puede explicar considerando que el espectro UV-Vis de SA presentan un único máximo de absorción coincidente con la longitud de onda de máxima absorción de FQ.

Por otra parte, se analizaron soluciones de SNA y SMX en el rango de concentraciones comprendido entre 3×10^{-6} M y 6×10^{-5} M, manteniendo fija la concentración de FQ ($1,5 \times 10^{-5}$ M), en soluciones de pH 7,4; se obtuvieron los espectros de absorción que se presentan en las **Figuras 6.23. A y B. 6.24 A y B.**

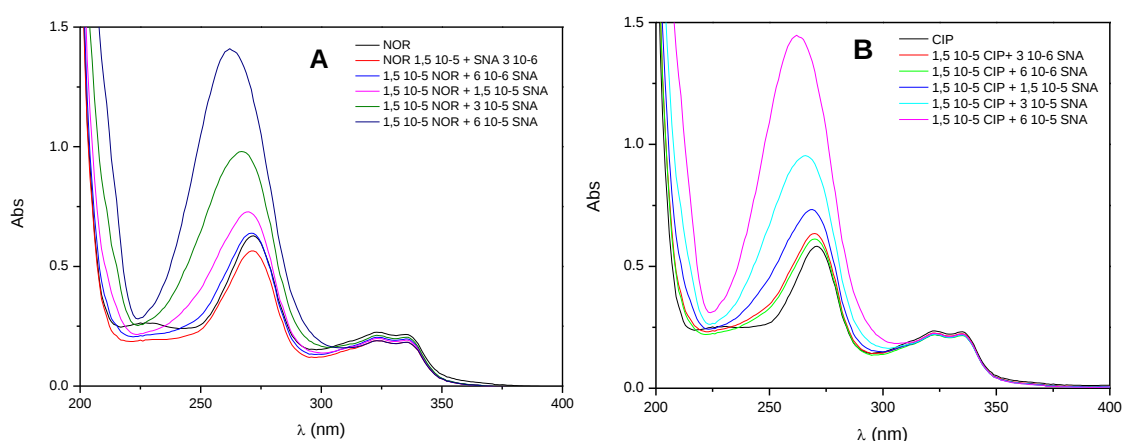


Figura 6.23. Espectros de absorción de soluciones de SNA en concentraciones crecientes en presencia de concentración fija de **A.** NOR y **B.** CIP, a pH= 7,4.

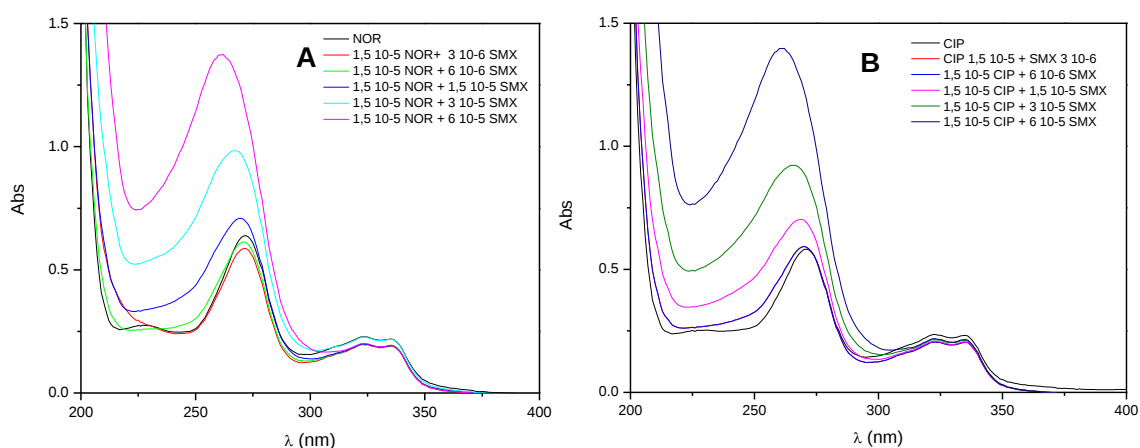


Figura 6.24. Espectros de absorción de soluciones de SMX en concentraciones crecientes en presencia de concentración fija de: **A.** NOR y **B.** CIP, a pH= 7,4.

Se puede observar que cuando se incrementa la concentración de SA, la absorbancia de la solución aumenta. En el rango de longitudes de onda comprendido entre 310-350 nm la señal no varía debido a la presencia de concentraciones casi constantes de FQ. Sin embargo, se observan puntos isosbéticos en el rango correspondiente a (280-290 nm), esto es indicativo de interacción intermolecular y formación de heterocomplejos en la solución acuosa en las condiciones del ensayo (Baranovskii et al., 2007).

Aiyama y col. (1992) describieron que a medida que aumenta la concentración de las soluciones, muchas moléculas de estructura aromática muestran un coeficiente de extinción más bajo. Este hecho se cree que es el resultado de la autoasociación de las moléculas del soluto. Además, cuando hay más de una especie en una solución, tales como monómeros y dímeros, se observan con frecuencia puntos isosbéticos. Por otra parte, se puede observar la heteroasociación molecular en los espectros de absorción de soluciones que incluyen la concentración estable de una sustancia y las concentraciones aumentadas del segundo componente. Un indicio de heteroasociación en este caso es un desplazamiento batocrómico e hipercrómico de una banda de absorción, con una mayor absorción a medida que aumenta la concentración de la solución (Bolotin et al., 2006).

6.5.3.2. Termocromismo

La evaluación del efecto de la temperatura sobre los espectros UV-Vis de las mezclas de FQ-SA indica la presencia de puntos isosbéticos: **Figura 6.25** NOR-SNA (223- 281- 341 nm), **Figura 6.26** NOR-SMX (243- 277,5 – 337,5 nm), **Figura 6.27** CIP-SNA (238- 274,5- 301- 325- 332- 337 nm) y **Figura 6.28** CIP-SMX (224 – 275,8- 300 – 325- 334- 337,5 nm). Este comportamiento es semejante al observado al analizar los IFA en forma individual, e indicativo de la formación de equilibrio intramolecular.

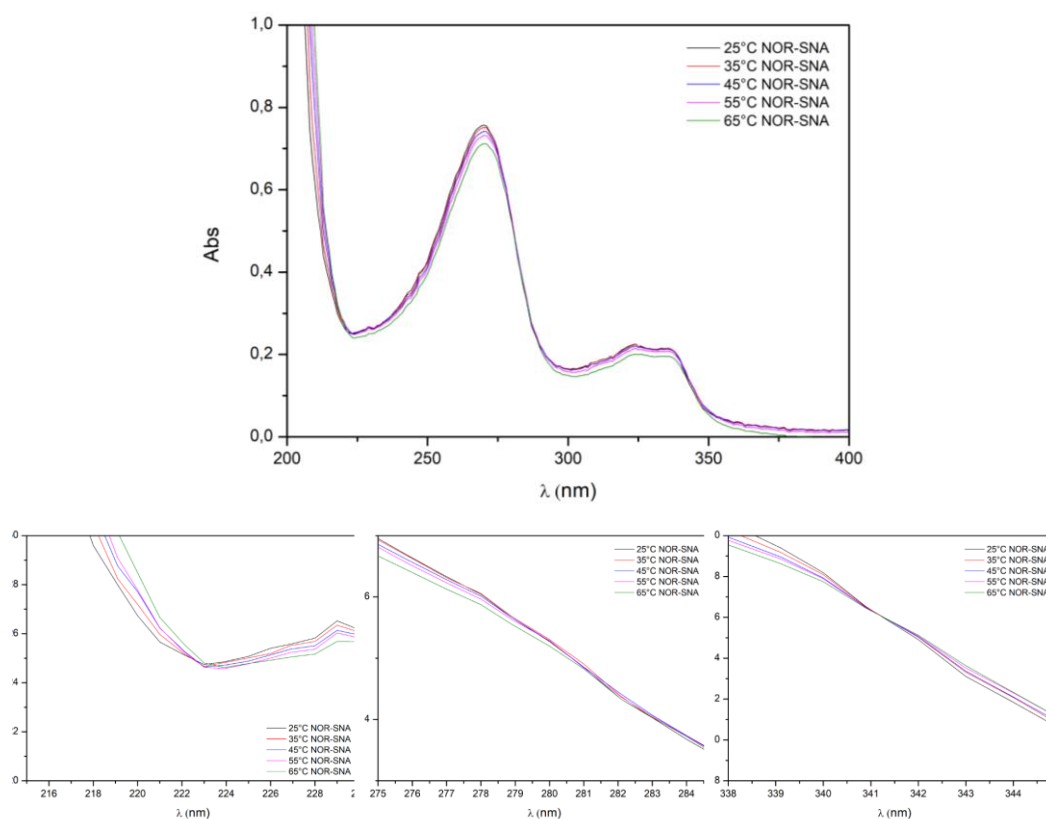


Figura 6.25. Espectros de absorción de NOR-SNA (pH= 7,4) registrados a 25°, 35°, 45°, 55°, 65 °C y puntos isobésticos observados a 223- 281- 341 nm.

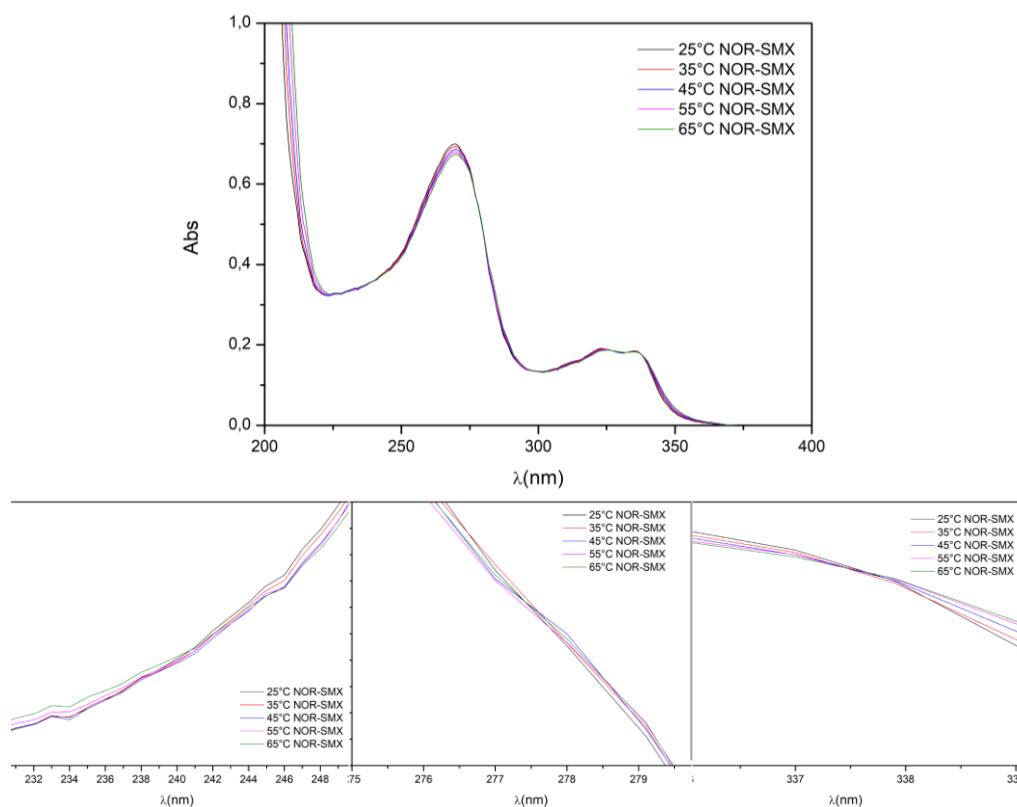


Figura 6.26. Espectros de absorción de NOR-SMX (pH= 7,4) registrados a 25°, 35°, 45°, 55°, 65 °C y puntos isobésticos observados a 243- 277,5 – 337,5 nm.

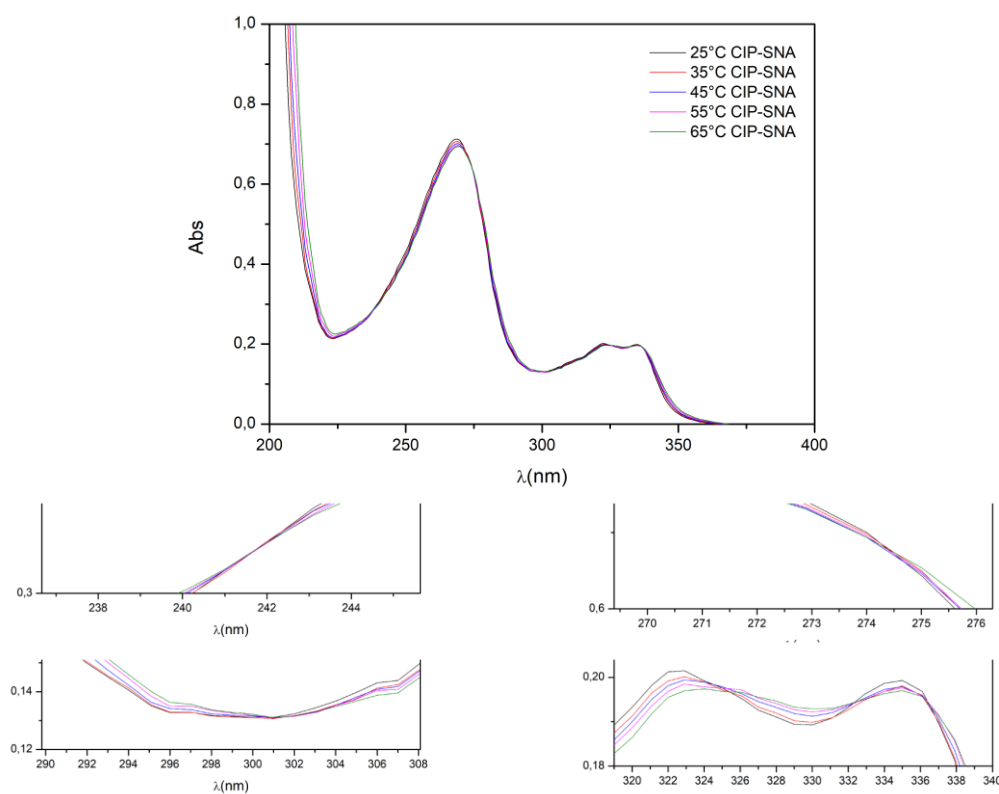


Figura 6.27. Espectros de absorción de CIP-SNA ($\text{pH} = 7,4$) registrados a 25°, 35°, 45°, 55°, 65 °C y puntos isobásticos observados a 238- 274,5- 301- 325- 332- 337 nm.

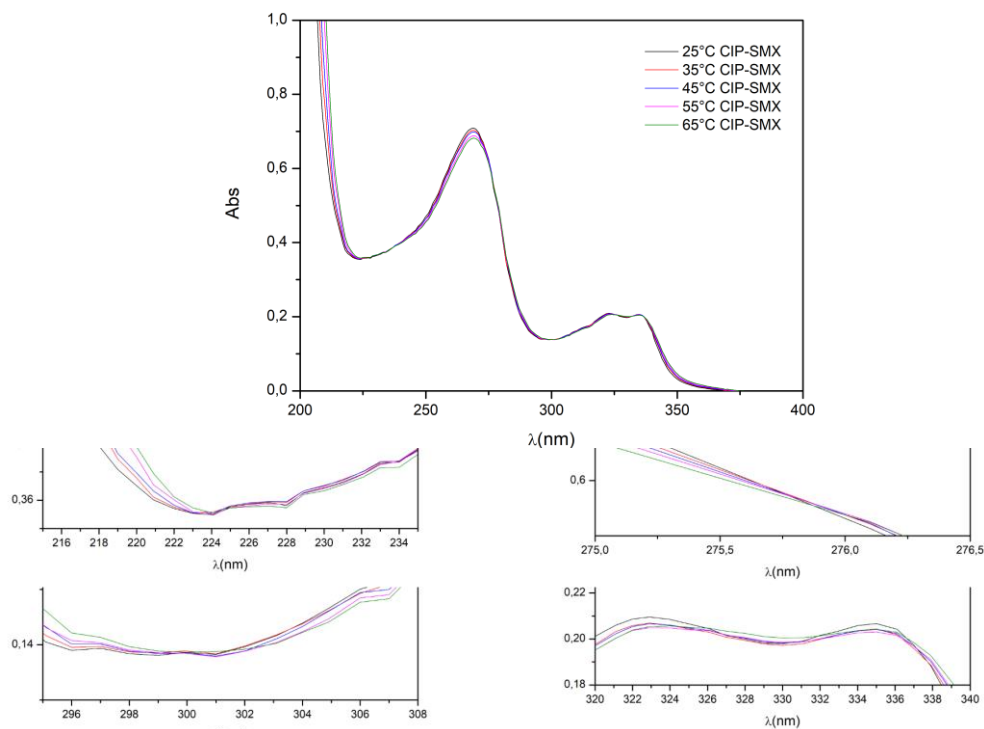


Figura 6.28. Espectros de absorción de CIP-SMX ($\text{pH} = 7,4$) registrados a 25°, 35°, 45°, 55°, 65 °C y puntos isobásticos observados a 224 – 275,8- 300 – 325- 334- 337,5 nm.

6.5.3.3. Solvatocromismo en mezclas de solventes:

buffer-ACN

Las Figuras 6.29 y 6.30 muestran el perfil de absorbancia de las diluciones que se detallaron en **Tabla 6.4** trabajando con NOR, CIP, SNA, SMX y mezcla equimolar de FQ-SA en mezclas binarias de buffer-ACN.

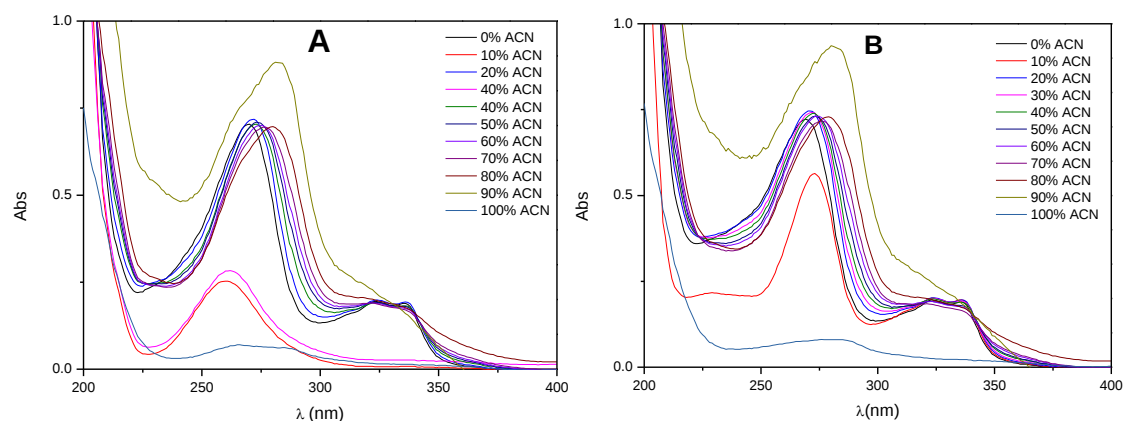


Figura 6.29. Espectro de absorción de la mezcla equimolecular de: **A.** NOR-SNA y **B.** NOR-SMX, en buffer pH 7,4-ACN en distintas proporciones.

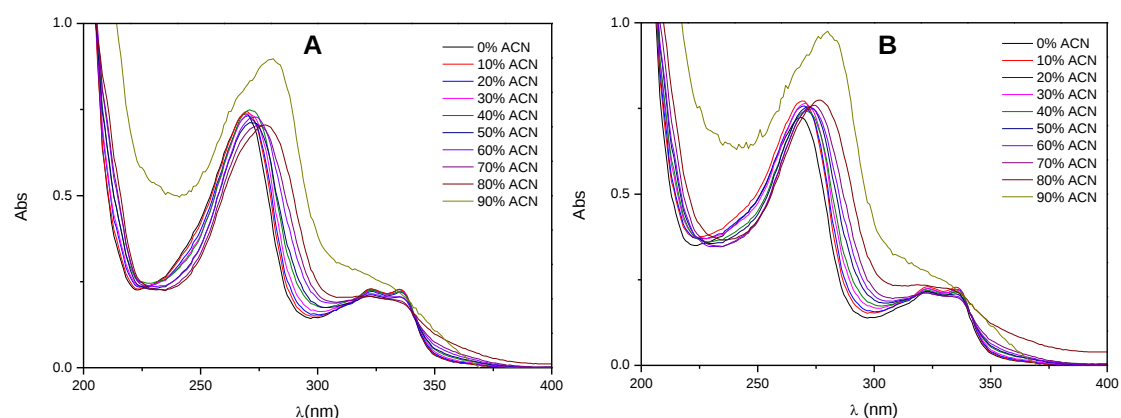


Figura 6.30. Espectro de absorción de la mezcla equimolecular **A.** CIP-SNA y **B.** CIP-SMX, en buffer pH 7,4-ACN en distintas proporciones.

A continuación, se muestran los estudios de correlación lineal de mezclas equimolares de FQ-SA en mezclas binarias de buffer-ACN. Se aplicó solamente el método de Kamlet y Taft por no tener disponibles datos bibliográficos de los parámetros para mezclas binarias de solventes utilizados, según los métodos de Catalán y Laurence (**Tabla 6.23**).

Tabla 6.23. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas de los coeficientes del parámetro analizado, para el análisis de regresión lineal múltiple de datos experimentales de FQ-SA en buffer-ACN.

Kamlet y Taft					
	A ₀	a	b	s	R ²
NOR-SNA	31,75±1,38	3,51±1,56 28,77%		8,69±2,58 71,23%	0,85
NOR-SMX	34,34±0,40			2,36±0,41 100%	0,9
CIP-SNA	34,25±0,32			2,60±0,32 100%	0,98
CIP-SMX	34,38±0,21			2,55±0,22 100%	0,99

A_0 : propiedad del soluto a correlacionar; Coeficientes de correlación en el análisis de Kamlet y Taft de: acidez (a), basicidad (b) y polaridad-polarizabilidad (s), del disolvente; R^2 : coeficiente de determinación.

En las 4 mezclas equimolares ensayadas se observa que el parámetro π^* , es quién más contribuye al solvatocromismo. En el caso de NOR-SNA, también tiene una contribución del parámetro α (28,77%).

La **Tablas 6.24 y 6.25** presentan E_{12} , χ^L_{ACN} y δ_{S2} de mezclas equimolares en distintas fracciones molares de ACN (χ_{ACN}).

Tabla 6.24. E_{12} , χ^L_{ACN} y δ_{S2} de mezcla equimolar de NOR-SA en distintas fracciones molares de ACN (χ_{ACN}).

NOR-SNA buffer-ACN				NOR-SMX buffer-ACN		
χ_{ACN}	E_{12}	χ^L_{ACN}	δ_{S2}	E_{12}	χ^L_{ACN}	δ_{S2}
0,000	106,29	0	0	106,68	0	0
0,034	109,78	176,58	176,55	104,92	0,51	0,48
0,073	105,72	-28,84	-28,91	105,89	0,23	0,16
0,118	109,33	154,27	154,16	105,13	0,45	0,33
0,170	105,11	-59,33	-59,50	105,33	0,39	0,22
0,232	104,92	-69,09	-69,32	104,92	0,51	0,28
0,306	104,52	-89,47	-89,78	104,71	0,57	0,27
0,397	103,99	-116,40	-116,80	104,16	0,73	0,34
0,510	102,64	-184,42	-184,93	103,05	1,05	0,54
0,655	103,22	-155,35	-156,01	103,57	0,90	0,25
1,000	106,31	1	0	103,24	1	0

χ_{ACN} : fracción molar de acetonitrilo; E_{12} : energía de transición (kcal/mol) en buffer-acetonitrilo; χ^L_{ACN} : fracción molar de acetonitrilo en la región cibotáctica; δ_{S2} : solvatación preferencial.

Tabla 6.25. E_{12} , χ_{ACN}^L y δ_{S2} de mezcla equimolar de CIP-SA en distintas fracciones molares de ACN (χ_{ACN}).

CIP-SNA buffer-ACN				CIP-SMX buffer-ACN		
χ_{ACN}	E_{12}	χ_{ACN}^L	δ_{S2}	E_{12}	χ_{ACN}^L	δ_{S2}
0	106,48	0	0	106,92	0	0
0,036	106,31	0,06	0,03	106,50	0,13	0,10
0,078	106,09	0,13	0,06	106,29	0,20	0,13
0,127	105,91	0,19	0,07	106,09	0,27	0,15
0,184	105,72	0,26	0,09	105,89	0,33	0,16
0,252	105,33	0,39	0,16	105,54	0,44	0,21
0,336	104,92	0,52	0,22	105,11	0,58	0,27
0,441	104,52	0,66	0,26	104,71	0,71	0,31
0,575	103,40	1,03	0,52	103,82	0,99	0,48
0,753	103,76	0,91	0,26	104,14	0,89	0,23

1
 χ_{ACN} : fracción molar de acetonitrilo; E_{12} : energía de transición (kcal/mol) en buffer-acetonitrilo; χ_{ACN}^L : fracción molar de acetonitrilo en la región cibotáctica; δ_{S2} : solvatación preferencial.

A continuación, las figuras que se presentan corresponden a E_{12} vs χ_{ACN} para mezcla equimolar de FQ-SA. En la **Figura 6.31.A**, se puede ver que NOR-SNA tiene SP_r por el buffer en las concentraciones de 10 y 30% v/v, para las demás concentraciones se solvata preferencialmente por ACN. En el caso de NOR-SMX, se observa que presenta SP_r por ACN. Para las mezclas CIP-SA y CIP-SMX en buffer-ACN, teniendo en cuenta la **Figura 6.31.B**, observamos que la SP_r es por el ACN en ambos casos y en todas las proporciones ensayadas. Para las dos mezclas, el perfil de SP_r es similar.

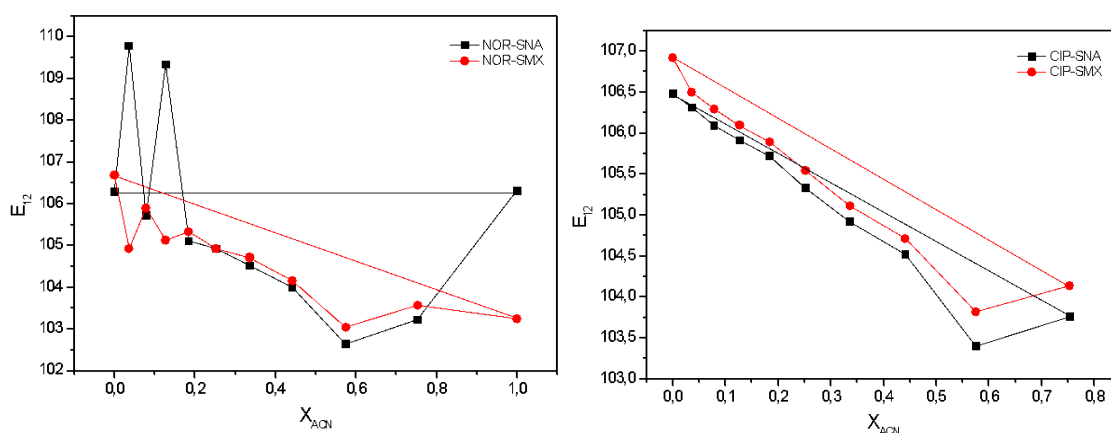


Figura 6.31. E_{12} de **A.** NOR-SNA (negro) y NOR-SMX (rojo) vs χ_{ACN} ; y **B.** CIP-SNA (negro) y CIP-SMX (rojo) vs χ_{ACN} .

6.5.3.4. Solvatocromismo en mezclas de solventes:

buffer-MeOH

Las Figuras 6.32 y 6.33 muestran el perfil de absorbancia de las diluciones que se detallaron en **Tabla 6.4** trabajando con FQ y SA y mezcla equimolar de FQ-SA en mezcla binaria de solventes buffer pH 7,4-MeOH:

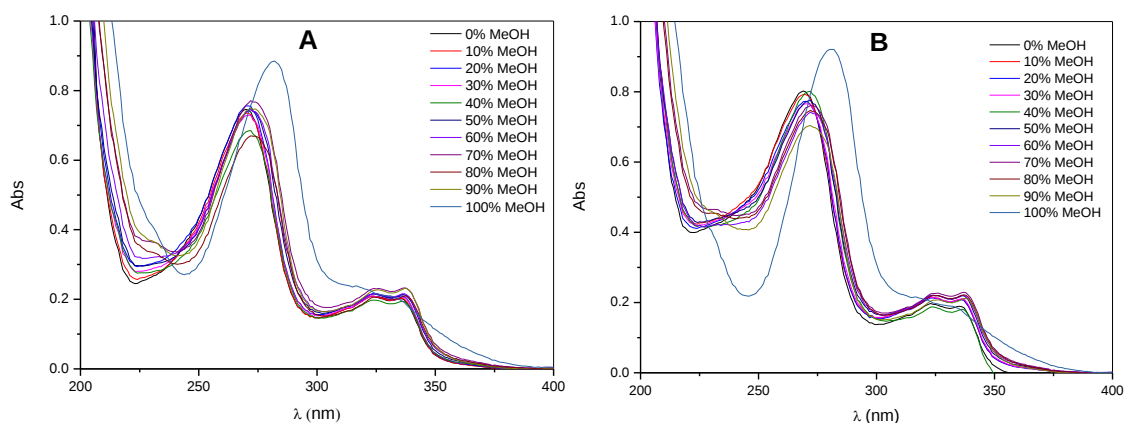


Figura 6.32. Espectro de absorción de la mezcla equimolecular de **A.** NOR-SNA y **B.** NOR-SMX, en buffer pH 7,4-MeOH en distintas proporciones.

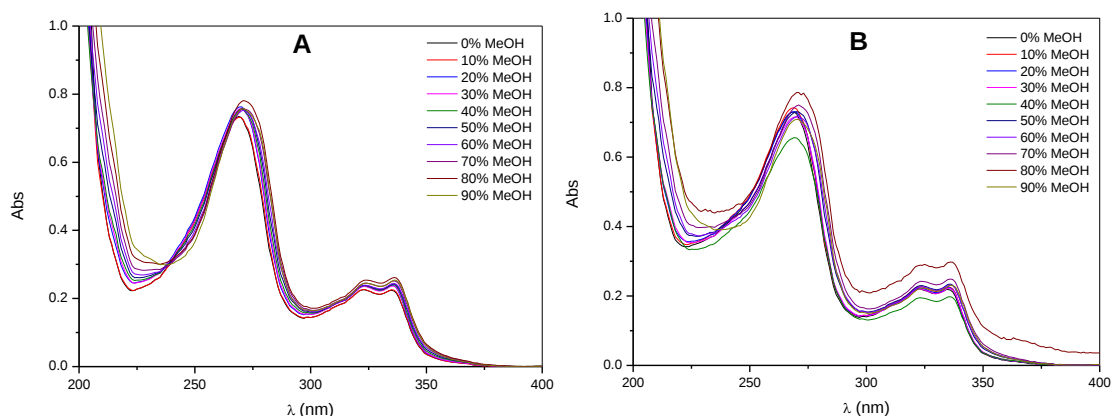


Figura 6.33. Espectro de absorción de la mezcla equimolecular **A.** CIP-SNA y **B.** CIP-SMX, en buffer pH 7,4-MeOH en distintas proporciones.

A continuación, se muestran los estudios de correlación lineal de mezclas equimolares de FQ-SA en mezclas binarias de buffer-MeOH. Se aplicó solamente el método de Kamlet y Taft por no tener disponibles datos bibliográficos de los parámetros para mezclas binarias de solventes utilizados, según los métodos de Catalán y Laurence (**Tabla 6.26**).

Tabla 6.26. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas de los coeficientes del parámetro para el análisis de regresión lineal múltiple de datos experimentales de FQ-SA en buffer-MeOH.

	Kamlet y Taft			
	A ₀	a	b	s
NOR-SNA	34,93±0,34			1,89±0,34 100.00%
NOR-SMX	32,12±1,41			4,35±1,28 100.00%
CIP-SNA	35,14±0,22	1,37±0,33 78,18%		0,38±0,17 21,82%
CIP-SMX	34,93±0,38	2,05±0,35 100.00%		

A₀: propiedad del soluto a correlacionar; Coeficientes de correlación en el análisis de Kamlet y Taft de: acidez (a), basicidad (b) y polaridad-polarizabilidad (s), del disolvente; R²: coeficiente de determinación.

Con respecto a las mezclas FQ-SA, se observa que para las mezclas que contienen NOR el único parámetro que contribuye es π^* . En el caso de las mezclas que contienen CIP el parámetro que más contribuye es α , para CIP-SNA también está el aporte de π^* (21,82%).

La Tablas 6.27 y 6.28 presentan E₁₂, χ^L_{ACN} y δ_{S2} de mezclas equimolares en distintas fracciones molares de MeOH (χ_{MeOH}).

Tabla 6.27. E₁₂, χ^L_{ACN} y δ_{S2} de mezcla equimolares de NOR-SA en distintas proporciones de MeOH.

NOR-SNA buffer-MeOH				NOR-SMX buffer-MeOH		
χ_{MeOH}	E ₁₂	χ^L_{MeOH}	δ_{S2}	E ₁₂	χ^L_{MeOH}	δ_{S2}
0	106,29	0	0	106,68	0	0
0,05	105,89	0,09	0,04	106,68	0,00	-0,05
0,10	105,89	0,09	-0,01	106,29	0,09	-0,01
0,16	105,70	0,14	-0,03	106,29	0,09	-0,07
0,23	105,70	0,14	-0,09	105,70	0,22	-0,01
0,31	105,31	0,22	-0,08	105,70	0,22	-0,09
0,40	105,31	0,22	-0,18	105,11	0,34	-0,06
0,51	104,92	0,31	-0,20	105,11	0,34	-0,17
0,64	104,92	0,31	-0,33	104,92	0,39	-0,26
0,80	104,92	0,31	-0,49	105,11	0,34	-0,46
1	101,93	1	0	102,11	1	0

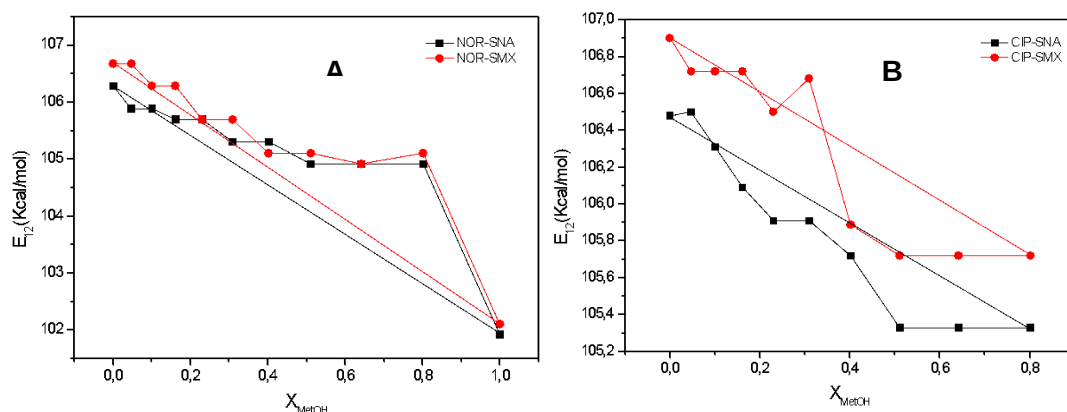
χ_{MeOH} : fracción molar de Metanol; E₁₂: energía de transición (kcal/mol) en buffer-Metanol; χ^L_{MeOH} : fracción molar de Metanol en la región cibotáctica; δ_{S2} : solvatación preferencial.

Tabla 6.28. E_{12} , χ_{ACN}^L y δ_{S2} de mezcla equimolares de CIP-SA en distintas proporciones de MeOH.

CIP-SNA buffer-MeOH				CIP-SMX buffer-MeOH		
χ_{MeOH}	E_{12}	χ_{MeOH}^L	δ_{S2}	E_{12}	χ_{MeOH}^L	δ_{S2}
0	106,48	0	0	106,90	0	0
0,05	106,50	-0,02	-0,06	106,72	0,15	0,10
0,10	106,31	0,15	0,05	106,72	0,15	0,05
0,16	106,09	0,34	0,18	106,72	0,15	-0,01
0,23	105,91	0,49	0,26	106,50	0,34	0,11
0,31	105,91	0,49	0,18	106,68	0,19	-0,12
0,40	105,72	0,66	0,26	105,89	0,85	0,45
0,51	105,33	1,00	0,49	105,72	1,00	0,49
0,64	105,33	1,00	0,36	105,72	1,00	0,36
0,80	105,33	1,00	0,20	105,72	1,00	0,20

χ_{MeOH} : fracción molar de Metanol; E_{12} : energía de transición (kcal/mol) en buffer-Metanol; χ_{MeOH}^L : fracción molar de Metanol en la región cibotáctica; δ_{S2} : solvatación preferencial.

A continuación, las figuras que se presentan corresponden a E_{12} vs fracción molar de MeOH para mezcla equimolar de FQ-SA. En la **Figura 6.34.A**, se distingue la preferencia de NOR-SNA por el buffer en el rango de 20-100%. Para el caso de NOR-SMX, la SPr es con el buffer en todas las concentraciones. En ambos casos el perfil de SPr es similar. En la **Figura 6.34.B**, se observa, en cambio, SPr por MeOH en casi todas las proporciones ensayadas en CIP-SNA. En la combinación CIP-SMX ocurre SPr por el buffer en la composición 50 % v/v buffer MeOH y solvatación por MeOH en el rango de composición 60 – 80 % v/v.



Figuras 6.34. E_{12} de **A.** NOR-SNA (negro) y NOR-SMX (rojo) vs χ_{MeOH} ; y **B.** CIP-SNA (negro) y CIP-SMX (rojo) vs χ_{MeOH} .

La **Tabla 6.29** presenta un resumen de los resultados obtenidos para el análisis cuantitativo del efecto solvatocrómico mediante los modelos multiparamétricos de

Kamlet-Taft para FQ-SA disuelta en mezclas binarias de solventes con distintas proporciones, además se muestra SP_r. Se observa que, para las mezclas FQ-SA el parámetro electrónico es un factor relevante y presente en todas las combinaciones. Con respecto a SP_r para las mezclas FQ-SA se observa que se solvatan preferentemente por el solvente orgánico ACN. En cambio, las mezclas NOR-SA se solvatan por buffer (en los medios buffer-MeOH) y las CIP-SA se solvatan por MeOH.

Tabla 6.29 Resumen de los resultados obtenidos para FQ-SA por solvatocromismo en mezclas de solventes y Solvatación Preferencial.

	Solvato mezcla de solvente		SP _r mezcla de solventes	
	B-ACN	B-MeOH	B-ACN	B-MeOH
NOR-SNA	$\pi^* > \alpha$	π^*	10-30% B	B
NOR-SMX	π^*	π^*	ACN	B
CIP-SNA	π^*	$\alpha > \pi^*$	ACN	MeOH
CIP-SMX	π^*	α	ACN	MeOH

Solvato: Solvatación; B: Buffer; SP_r: solvatación preferencial; ACN: Acetonitrilo; MeOH: Metanol; α : capacidad ácida del solvente; π^* : polaridad polarizabilidad del solvente.

6.6. CONCLUSIONES

Las FQ, CIP y NOR son sustancias anfóteras. Por lo tanto, en pH fisiológico (7,4) coexisten las especies neutras (zwitteriónica y no iónica). Las formas catiónica y aniónica predominan en soluciones ácidas y en básicas, respectivamente. En este mismo pH (7,4), presentan equilibrio intramolecular, entre las especies zwitteriónicas y no iónica (**Fig 6.35**), esto se demuestra en el análisis termocrómico.

Las SA, a pH fisiológico (7,4) se comportan de manera diferente, SNA está presente en forma no iónica y SMX en las formas aniónica y no iónica (**Fig 6.36**).

En este trabajo, se pone de manifiesto que NOR y CIP forman heterocomplejos en la solución con SNA o SMX, en el rango de concentraciones analizadas.

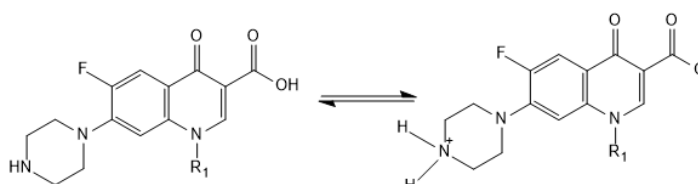


Figura 6.35. Equilibrio intramolecular para FQ, entre las especies zwitteriónicas y no iónica.

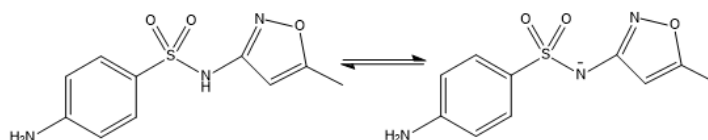


Figura 6.36. Equilibrio intramolecular para SMX, entre la especie no iónica y aniónica.

En conclusión, los estudios realizados permitieron cumplir con el objetivo planteado, ya que los ensayos de incremento de concentración, termocromismo, solvatocromismo y SPr resultaron ser herramientas efectivas para evaluar el comportamiento en solución de las FQ y SA. Se logró describir satisfactoriamente la capacidad de interacción intra e intermolecular de estos IFA, tanto entre sí como con los solventes en estudio. Además, la evidencia de formación de heterocomplejos aporta información relevante sobre la formación de posibles interacciones en el estado sólido, lo que respalda la utilidad de los estudios realizados.

6.7. BIBLIOGRAFÍA

Ahumada, A. A.; Seeck, J.; Allemandi, D.; Manzo, R. H. The pH/Solubility Profile of Norfloxacin. *S. T. P. Pharma Sciences* **1993**, 3, 250–253.

Aiyama, R.; Nagai, H.; Sawada, S.; Yokokura, T.; Itokawa, H.; Nakanishi, M. Determination of Self-Association of Irinotecan Hydrochloride (CPT-11) in Aqueous Solution. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1992**, 40 (10), 2810–2813. <https://doi.org/10.1248/cpb.40.2810>.

Albini, A.; Monti, S. Photophysics and Photochemistry of Fluoroquinolones. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, 32 (4), 238. <https://doi.org/10.1039/b209220b>.

Almandoz, M. C.; Sancho, M. I.; Blanco, S. E. Spectroscopic and DFT Study of Solvent Effects on the Electronic Absorption Spectra of Sulfamethoxazole in Neat and Binary Solvent Mixtures. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, 118, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.08.060>.

Almandoz, M. C.; Sancho, M. I.; Duchowicz, P. R.; Blanco, S. E. UV–Vis Spectroscopic Study and DFT Calculation on the Solvent Effect of Trimethoprim in Neat Solvents and Aqueous Mixtures. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, 129, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.02.191>.

Aura, R.; Silvia, I.; Eleonora, M.; Gabriel, H. Quinolone Antibacterials: Commentary and Considerations Regarding UV Spectra and Chemical Structure. *Acta Medica Marisiensis* **2015**, 61 (4), 328–336. <https://doi.org/10.1515/amma-2015-0084>

Baranovskii, S. F.; Bolotin, P. A. Association of Riboflavin, Caffeine, and Sodium Salicylate in Aqueous Solution. *J. Appl. Spectrosc.* **2007**, 74 (2), 211–218. <https://doi.org/10.1007/s10812-007-0033-8>.

Belal, F.; El-Enany, N.; Wahba, M. E. K. Analytical Methods for the Determination of Some Selected 4-Quinolone Antibacterials. *Rev. Anal. Chem.* **2017**, 36 (2). <https://doi.org/10.1515/revac-2015-0020>.

Bolotin, P. A.; Baranovsky, S. F.; Evstigneev, M. P. Spectrophotometric Investigation of the Hetero-Association of Caffeine and Thiazine Dye in Aqueous Solution. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2006**, 64 (3), 693–697. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.08.005>.

Cárdenas, Z. J.; Jiménez, D. M.; Almanza, O. A.; Jouyban, A.; Martínez, F.; Acree, W. E., Jr. Solubility and Preferential Solvation of Sulfanilamide, Sulfamethizole and Sulfapyridine in Methanol + Water Mixtures at 298.15 K. *J. Solution Chem.* **2016**, 45 (10), 1479–1503. <https://doi.org/10.1007/s10953-016-0513-7>.

CRC Handbook of Chemistry and Physics 79th Edition, 79th ed.; Lide, D. R., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1998.

Day JH. Thermochromism. *Chemical Reviews*, 1963, 63, 65-79.

El Khateeb, S. Z.; Abdel Razek, S. A.; Amer, M. M. Stability-Indicating Methods for the Spectrophotometric Determination of Norfloxacin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, 17 (4–5), 829–840. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(97\)00271-9](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(97)00271-9).

Etter, M. C. Hydrogen Bonds as Design Elements in Organic Chemistry. *J. Phys. Chem.* **1991**, 95 (12), 4601–4610. <https://doi.org/10.1021/j100165a007>.

Evstigneev, M. P.; Rybakova, K. A.; Davies, D. B. Complexation of Norfloxacin with DNA in the Presence of Caffeine. *Biophys. Chem.* **2006**, 121 (2), 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2005.12.003>.

Evstigneev, M. P.; Rybakova, K. A.; Davies, D. B. Heteroassociation of Antibiotic Norfloxacin with Aromatic Vitamins in Aqueous Solution. *Biophysics (Oxf.)* **2006**, 51 (4), 592–598. <https://doi.org/10.1134/s0006350906040129>.

Fallati, C.S.; Ahumada, A.A.; Manzo, R.H. El Perfil de Solubilidad de la Ciprofloxacina en Función del pH. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, **1994**, 13, 73-7

Giacomelli, L.; Cattana, R.; Anunziata, J.; Silber, J. J.; Hedrera, M.; Salerno, A.; Perillo, I. Competition between Inter- and Intramolecular Hydrogen Bonding in Molecules with Donor and Acceptor Groups. Solvatochromic and Thermochromic Evidence in *n*-(Nitrophenyl)Alkylenediamines. *J. Phys. Org. Chem.* **1994**, 7 (3), 162–168. <https://doi.org/10.1002/poc.610070308>.

Kałka, A. J.; Turek, A. M. Compensation of Temperature Effects on Spectra through Evolutionary Rank Analysis. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2021**, 245, 118770. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118770>.

Lecomte, S.; Tabary, X.; Moreau, N. J.; Chenon, M. T. NMR Investigation of Pefloxacin-Cation-DNA Interactions, Part I-Influence of pH and Concentration. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1996**, 34, 458–466.

Maurer, N.; Wong, K. F.; Hope, M. J.; Cullis, P. R. Anomalous Solubility Behavior of the Antibiotic Ciprofloxacin Encapsulated in Liposomes: A ¹H-NMR Study. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1998**, 1374 (1–2), 9–20. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(98\)00125-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(98)00125-4).

Montero, M. T.; Hernández-Borrell, J.; Nag, K.; Keough, K. M. W. Fluoroquinolone Distribution in a Phospholipid Environment Studied by Spectrofluorimetry. *Anal. Chim. Acta* **1994**, 290 (1–2), 58–64. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(94\)80040-5](https://doi.org/10.1016/0003-2670(94)80040-5).

Park, H.; Jeong, G.; Lee, H.; Lee, J.; Baek, G. Ionization and Divalent Cation Complexation of Quinolone Antibiotics in Aqueous Solution. *Bulletin of The Korean Chemical Society* **2000**, 21, 849–854.

Parra, M. A.; Cerquera, N. E.; Ortiz, C. P.; Cárdenas-Torres, R. E.; Delgado, D. R.; Peña, M. Á.; Martínez, F. Solubility of Ciprofloxacin in Different Solvents at Several Temperatures: Measurement, Correlation, Thermodynamics and Hansen Solubility Parameters. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2023**, 150 (105028), 105028. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2023.105028>.

Rahimpour, E.; Acree, W. E., Jr; Jouyban, A. Prediction of Sulfonamides' Solubilities in the Mixed Solvents Using Solvation Parameters. *J. Mol. Liq.* **2021**, 339 (116269), 116269. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116269>.

Reichardt, C. Solvents and Solvent Effects: An Introduction. *Org. Process Res. Dev.* **2007**, 11 (1), 105–113. <https://doi.org/10.1021/op0680082>.

Ross, D. L.; Riley, C. M. Physicochemical Properties of the Fluoroquinolone Antimicrobials. II. Acid Ionization Constants and Their Relationship to Structure. *Int. J. Pharm.* **1992**, 83 (1–3), 267–272. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(82\)90032-1](https://doi.org/10.1016/0378-5173(82)90032-1).

Sajwan, R. K.; Lakshmi, G. B. V. S.; Singh, A. K.; Solanki, P. R. Study of pH-dependent Fluorescent Property of Fluoroquinolone Antibiotics. *Applied Research* **2023**, 2 (2). <https://doi.org/10.1002/appl.202200026>.

Son, G.-S.; Yeo, J.-A.; Kim, J.-M.; Kim, S. K.; Moon, H. R.; Nam, W. Base Specific Complex Formation of Norfloxacin with DNA. *Biophys. Chem.* **1998**, 74 (3), 225–236. [https://doi.org/10.1016/s0301-4622\(98\)00178-1](https://doi.org/10.1016/s0301-4622(98)00178-1).

Umadevi, M.; Christy, A. J.; Sudha, R. H.; Rajkumar, B. J. M.; Ramakrishnan, V. Preferential Solvation of Acridine in Binary Mixtures. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2008**, 71 (3), 773–778. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2008.01.032>.

Woldegiorgis, K.; Belay, A.; Kebede, A.; Abebe, T. Estimating the Ground and Excited State Dipole Moments of Levofloxacin and Norfloxacin Drugs Using Solvatochromic Effects and Computational Work. *J. Spectrosc. (Hindawi)* **2021**, 2021, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2021/7214182>

Capítulo 7

ESTUDIO DEL ESTADO SÓLIDO

7.1. INTRODUCCIÓN	170
7.2. REPORTES DEL ESTADO SÓLIDO DE NOR.....	172
7.2.1. Polimorfos y fase amorfa de NOR	172
7.2.2. Hidratos y Solvatos de NOR.....	172
7.2.3. Sales de NOR.....	173
7.2.4. Cocristales de NOR.....	174
7.2.5. NOR con metales	174
7.3. ESTADO SÓLIDO DE CIPROFLOXACINO	175
7.3.1. Polimorfos de CIP.....	175
7.3.2. Hidratos y Solvatos de CIP.....	175
7.3.3. Sales de CIP	176
7.3.4. Cocristales de CIP.....	177
7.3.5. CIP con metales	177
7.4. ESTADO SÓLIDO DE SULFANILAMIDA.....	177
7.4.1. Polimorfos de SNA	178
7.4.2. Hidratos y Solvatos de SNA	179
7.4.3. Sales de SNA	179
7.4.4. Cocristales de SNA	179
7.4.5. SNA con metales.....	179
7.5. ESTADO SÓLIDO DE SULFAMETOXAZOL.....	179
7.5.1. Polimorfos de SMX.....	179
7.5.2. Hidratos y Solvatos de SMX.....	179

7.5.3. Sales de SMX.....	180
7.5.4. Cocristales de SMX.....	180
7.5.5. SMX con metales	180
7.6. MATERIALES Y MÉTODOS	181
7.6.1. Técnicas utilizadas en la identificación y Caracterización	181
7.6.2. Procedimiento para la identificación y determinación de pureza de IFA y COF	183
7.6.3. Obtención de nuevas formas sólidas.....	184
7.6.4. Métodos de caracterización de sólidos multicomponentes.....	189
7.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	191
7.7.1. Identificación de los diferentes polimorfos.....	191
7.7.2. Análisis de los sólidos multicomponentes obtenidos	205
7.8. CONCLUSIÓN	224
7.7. BIBLIOGRAFÍA	225

7.1. INTRODUCCIÓN

Los cocristales farmacéuticos se consideran una oportunidad para adaptar las propiedades biofarmacéuticas y farmacéuticas de los medicamentos, es decir, mejorar la biodisponibilidad, la estabilidad, la permeabilidad, la solubilidad, entre otras propiedades, sin comprometer la actividad farmacológica. Tal como se mencionó en el **Capítulo 1**, los cocristales se definen como cristales multicomponentes, también llamados Derivados No Covalentes (DNC) formados por proporciones estequiométricas de dos o más compuestos sólidos. Durante la investigación sobre la formación de cocristales se enfrentan varios desafíos, empezando por la falta de previsibilidad de la asociación con los Coformadores (COF), para que los cocristales sean patentables. Además, las propiedades finales de la forma sólida tampoco son predecibles, cada sistema presenta sus propios desafíos. Después del descubrimiento y caracterización de los cocristales, definir las condiciones para la viabilidad a mayor escala es otra tarea difícil (Ferreira et al., 2023). Sin embargo, presentan la gran ventaja de utilizar procedimientos relativamente económicos para su formación y, principalmente, respetuosos con el medioambiente (Stoler et al., 2015).

En el presente capítulo se detallan los resultados obtenidos al diseñar, desarrollar y caracterizar nuevas formas sólidas constituidas por Fluorquinolonas (FQ) y/o Sulfonamidas Antibacterianas (SA) y con compuestos considerados seguros para el uso humano.

El diseño y la preparación de formas sólidas multicomponentes farmacéuticas es un proceso integral y de múltiples etapas, ilustrado en la **Figura 7.1**. El primer paso es la elección del Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA), que debe ser escogido teniendo en cuenta la resolución de un problema específico, en nuestro caso se plantea en los objetivos de la tesis. Luego se realiza la búsqueda de COF o contraiones, identificando los sintones supramoleculares más adecuados. Se debe tener en cuenta que la elección debe restringirse a compuestos seguros para el uso en humanos (GRAS: del inglés *Generally Regarded as Safe*). Se considera que, aproximadamente un tercio de los compuestos orgánicos y cerca del 80 % de los IFA comercializados exhiben polimorfismo. También, se ha observado que el polimorfismo es muy frecuente en algunas familias de fármacos más que en otras. En el caso de las SA, se considera que un 60 % exhibe polimorfismo (Byrn, 1999). Por otra parte, Norfloxacin (NOR) presenta varios polimorfos, pudiendo transformarse durante el almacenamiento. El estudio de la variación polimórfica del IFA suele ser el primer paso en la síntesis supramolecular, con el objetivo de identificar y caracterizar nuevas

formas polimórficas posibles, así como revelar posibles hidratos o solvatos de la molécula en estudio. Luego de la caracterización polimórfica de los IFA y COF se procede a la obtención de las formas sólidas multicomponentes mediante técnicas tales como, por ejemplo: cristalización por evaporación, y cristalización por enfriamiento, molienda pura/seca, molienda asistida por solvente (LAG: del inglés, *Liquid Assisted Solvent*) que consiste en la adición de cantidades catalíticas de disolvente para promover la reacción, entre otras. El paso final de este proceso implica la caracterización de las formas sólidas, que incluye: el Análisis Térmico (AT) por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC: del inglés *Differential Scanning Calorimetry*) y Termogravimetría (TG). La observación mediante Microscopio Óptico (MO) con Luz Polarizada (MLP) y con Platina de Calentamiento (HSM). La caracterización estructural basada en Difracción de Rayos X (DRX) de Polvo (DRXP) y Monocristal (DRXM), Resonancia Magnética Nuclear (RMN): de estado sólido (RMN-ES) y protónica (^1H -RMN). Y la Espectroscopía vibracional: Espectroscopía infrarroja con transformada de fourier (FT-IR) y FT-Raman. Por último, se realiza la determinación de las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas y en última instancia, la evaluación del rendimiento de la nueva forma.

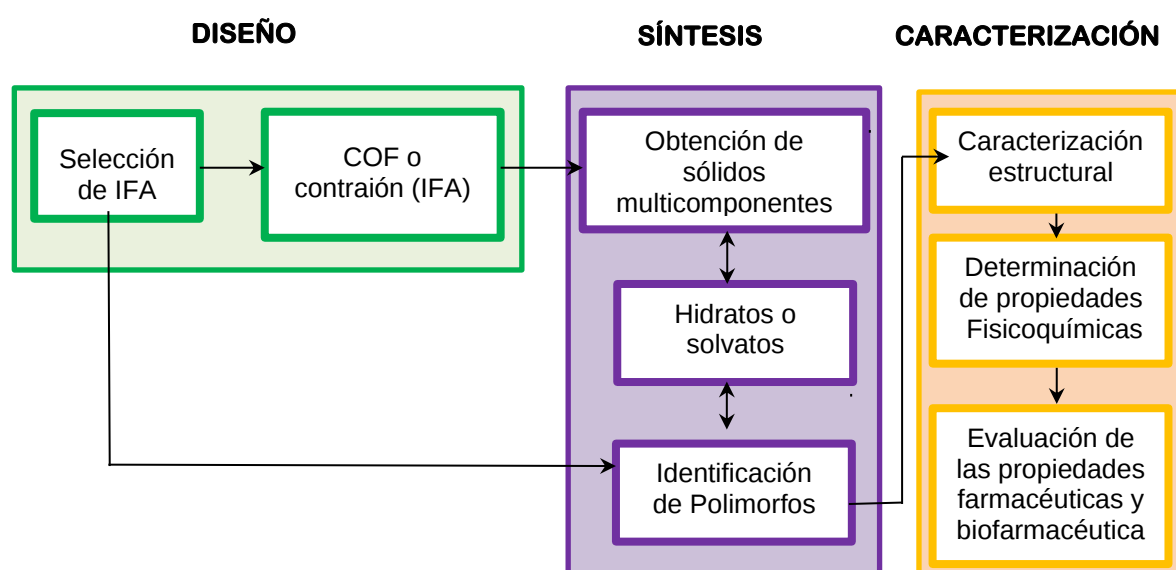


Figura 7.1. Representación esquemática de los procesos de diseño, síntesis y caracterización en el desarrollo y selección de polimorfos de ingredientes farmacéuticos activos y formas cristalinas multicomponentes (Domingos et al., 2015).

En casos particulares, el COF puede ser también un IFA, conformando un aducto molecular IFA-IFA. Esta ha sido una estrategia muy empleada en los últimos años para ofrecer una terapia sinérgica. Muestra ventajas potenciales de reducción de la dosis, de la toxicidad y, si se trata de un antimicrobiano, de la resistencia al IFA,

y como consecuencia la mejora de la eficacia terapéutica. Dado que los sólidos multicomponentes IFA-IFA tienen un mayor grado de imprevisibilidad que el de las combinaciones de IFA-COF, son más elegibles para futuras patentes. Como consecuencia, existe un fuerte incentivo en la actualidad para diseñar sólidos multicomponentes IFA-IFA (Yeh et al., 2018).

7.2. REPORTES DEL ESTADO SÓLIDO DE NOR

Diversas formas sólidas de NOR se encuentran reportadas en la literatura, las más representativas se describen a continuación.

7.2.1. POLIMORFOS Y FASE AMORFA DE NOR

Hasta el momento se han descrito 3 polimorfos de NOR denominados A, B y C. Šuštar y col. (1993) caracterizaron una fase amorfa y dos polimorfos anhidros de NOR (A y B) mediante DSC, TG, DRXP, FT-IR, espectrofotometría UV-Vis y ^1H -RMN. Así, concluyeron que el polimorfo A es la fase más estable y que la relación existente entre los dos es monotrópica. Barbas y col. (2006), refutando el trabajo publicado por Šuštar y col. (1993), analizaron los polimorfos A y B de NOR utilizando DRXP, DSC, FT-IR, Raman y ^{13}C -RMN-ES, y describieron una relación enantiotrópica entre ambas formas cristalinas. Barbas y col. (2007), caracterizaron un nuevo polimorfo C, además de elucidar la estructura cristalina monoclinica del polimorfo A por DRXM. Puigjaner (2010), reinvestigó al polimorfo A monoclinico informado por Barbas (2007) y concluyó que se había realizado una identificación errónea de dicha estructura e indicó que la verdadera forma del polimorfo A de NOR es triclinica, además reportó dos nuevos polimorfos sesquihidrato (I y II).

7.2.2. HIDRATOS Y SOLVATOS DE NOR

Por lo general, los hidratos son menos solubles que sus formas anhidras porque la interacción entre el compuesto y las moléculas de agua le confiere una estabilidad termodinámica adicional. NOR es un ejemplo que contradice esa regla, ya que sus hidratos tienen en común la presencia de la forma zwitteriónica del compuesto, que da como resultado una mayor solubilidad acuosa a las formas hidratadas. Esto implica que el proceso de hidratación juega un papel importante al influir en la biodisponibilidad de NOR, y ha convertido a sus hidratos en un interesante objeto de estudio (Puigjaner et al., 2010).

NOR anhidro captura rápidamente la humedad en condiciones ambientales para formar diferentes hidratos. Se han reportado una gran variedad de formas hidratadas de NOR, como dihidrato, trihidrato, pentahidrato, hemipentahidrato, sesquihidrato I y II y un solvato de metanol (MeOH) (Chongcharoen et al., 2008; Florence et al., 1984; Hu et al., 2002; Katdare et al., 1986; Puigjaner et al., 2010; Ravindra et al., 2009; Roy et al., 2008). Katdare y col. (1986) prepararon y caracterizaron las formas anhidras, sesquihidrato y dihidrato, empleando DSC, TG y DRXP. Mazuel (1991) realizó la recopilación bibliográfica de las propiedades físicas y los métodos de análisis de NOR. Florence (2000) investigó a NOR dihidrato por DRXM. Hu y col. (2002) evaluaron el proceso de hidratación de NOR aplicando DSC, TG y FT-IR y observaron que a medida que aumenta el porcentaje de humedad en la muestra, el grupo funcional COOH se transforma en COO^- y el NH en NH_2^+ , concluyendo que el agua induce la transferencia de protones en el estado sólido generando a la especie zwitteriónica y favoreciendo la transformación de las uniones de tipo puente hidrógeno en uniones iónicas. Roy (2008) elucidó la estructura cristalina del dihidrato y de los hidratos 1,25 y 1,125 de NOR por DRXM, DRXP y TG. Ravindra (2009) investigó a NOR sesquihidrato elucidando su estructura cristalina y realizó el estudio de estabilidad estableciendo que la forma más estable a temperatura ambiente es la forma I (NOR 1,5 H_2O) y que la forma II (NOR 3 H_2O), es la más estable a baja temperatura (-40 °C). Bratu (2011) describió un solvato de NOR y ácido acético en una relación estequiométrica 1:1 que cristaliza en un sistema triclinico.

7.2.3. SALES DE NOR

El proceso de cristalización entre NOR y ácidos dicarboxílicos (p. ej., ácidos succínico, malónico y maleico) produce sales debido a la transferencia completa de protones del grupo COOH del ácido al átomo N del anillo piperazinilo. Las sales de NOR con ácidos carboxílicos mostraron un aumento de solubilidad comprendido entre 20 y 45 veces respecto a la forma anhidra de NOR. Los investigadores describieron este fenómeno mediante un cambio en la energía cristalina de la sal ($\Delta H_{\text{solvatación}}$) y la mayor tendencia de las sales a ionizarse (Bashiman et al., 2022).

Se han publicado sales farmacéuticas de NOR con los siguientes ácidos: fumárico, ftálico, isoftálico, 2-amino isoftálico, 5- amino isoftálico, tartárico, 3-hidroxibenzoico, naftalen-1,5-disulfónico, naftalen-2-sulfónico, salicílico, 4-hidroxibenzoico, oxálico, succínico, glutárico, maleico, acesulfamato y pícrico (Costa et al., 2023; Huang et al., 2013; Madeira et al., 2020; Santos et al., 2020; Surov et al., 2018).

7.2.4. COCRISTALES DE NOR

Existen múltiples antecedentes de preparación de formas cristalinas multicomponentes que incluyen a NOR. En 2006, Basavoju y col. (2006) informaron la formación de un cocrystal con isonicotinamida solvatado con cloroformo, obtenido mediante evaporación del solvente, donde NOR existe en estado zwitteriónico y forma enlaces (N---HO) con el COF. Ese diseño se reflejó en una solubilidad mejorada para la FQ (aproximadamente 3 veces mayor) en comparación con la forma anhidra. Velaga y col. (2008) describieron la formación de una sal con sacarina formando, a su vez, un cocrystal con otra molécula de sacarina, obtenidos mediante la evaporación del solvente. El resultado fue el sacarinato de NOR-sacarina dihidrato. En 2019, Ferreira y col. sintetizaron un cocrystal con ribofavina utilizando la técnica mecanoquímica. O'Malley y col. (2022) descubrieron 27 nuevas sales y cocristales iónicos moleculares ternarios partiendo de NOR, Ciprofloxacino (CIP) y enrofloxacino, con los siguientes ácidos α o ω -dicarboxílicos: glutárico, adípico, pimélico, subérico, azeláico, sebáico, aplicando el método de evaporación de solvente y LAG. Fael y col. (2022) estudiaron un cocrystal con resorcinol en dos formas cristalinas diferentes, una anhidra y otra monohidratada. Ferreira y col. (2022) descubrieron un nuevo cocrystal NOR-sacarinato y un cocrystal-solvato aplicando mecanoquímica. Un cocrystal con ácido nicotínico, se caracterizó en 2023. Este estudio examinó la formación de cocristales de NOR con dos isómeros estructurales del ácido nicotínico, picolínico e isonicotínico (Ferreira et al., 2023).

Se comprobó la formación de aductos multicomponentes IFA-IFA de NOR con: CIP (Pinto Vitorino et al., 2013), sulfatiazol (Gopi et al., 2016), diclofenaco, diflunisal, ácido mefenámico e indometacina como sales supramoleculares (Bhattacharya et al., 2018) y mezclas binarias con metronidazol (Salceanu et al., 2018). Recientemente se investigó el cocrystal de NOR y naringenina, un activo antitumoral (Zeng et al., 2024).

7.2.5. NOR CON METALES

NOR forma complejos metálicos con Cu, Tb, Ni, Ti, Cr, Mn, Fe, Ba, V, Zn, Cd, Mg, Ag, W, Co, Pd y Bi (Chen et al., 2000 y 2001; Gao et al., 1995; Katsarou et al., 2008; Liu et al., 2014; Mjos et al., 2016; Refat et al., 2010; Tong et al., 2005).

7.3. ESTADO SÓLIDO DE CIPROFLOXACINO

Las diferentes formas sólidas de CIP que se han reportado en bibliografía se describen a continuación. ¿(Mesallati et al., 2016).

7.3.1. POLIMORFOS DE CIP

No se han descrito fases polimórficas de CIP hasta la fecha. Sin embargo, si se han encontrado para sales de CIP.

CIP amorfo puro es difícil de obtener debido a la baja solubilidad, la fuerte red cristalina que forma y la degradación térmica del fármaco. A pesar de estas dificultades, Mesallati y col. (2016) fueron los pioneros en informar sobre la preparación exitosa de CIP amorfo puro. Se han aplicado varias técnicas, pero sólo el secado por aspersión en agua pura dio como resultado un producto completamente amorfo. Además, si bien muchos métodos de procesamiento generaron la forma zwitteriónica, el secado por aspersión en una mezcla de etanol/agua produjo la forma neutra. La caracterización de estos materiales sólidos fue examinada mediante DRXP, FT-IR y TG-DSC (Pinto Vitorino et al., 2019).

7.3.2. HIDRATOS Y SOLVATOS DE CIP

Turel y col. (1997) informaron el hexahidrato, (CIP.6H₂O), en el cual la estructura cristalina puso en evidencia que la molécula de CIP se encuentra en forma zwitteriónica. Li y col. (2006) llevaron a cabo el estudio del estado sólido de CIP en sus formas anhidra e hidratada empleando DSC, TG, DRXP y ensayos de disolución. Con esta última técnica observaron que la forma anhidra presenta mayor velocidad de disolución que la hidratada (Al-Omar et al., 2005). Este comportamiento puede deberse a la cristalización del hidrato, que tiene una solubilidad significativamente menor (Falatti et al., 1994). CIP anhidra muestra una única endoterma de fusión con una temperatura de inicio a 270,8 °C. El termograma DSC del hidrato exhibió dos transiciones endotérmicas. El primer pico con una temperatura de inicio de 101,7 °C se atribuyó al proceso de deshidratación, esto fue confirmado por las exploraciones en TGA. La segunda endoterma a 269,9 °C fue debida a la formación de la fase deshidratada. Mahapatra y col. (2010) obtuvieron el patrón de difracción de DRXM de la forma anhidra, que cristaliza en el grupo espacial triclinico P-1. Sus características higroscópicas han sido analizadas por DRXP. Se corroboró una conversión irreversible entre la forma anhidra e hidratada. Además, Fabianni y col. (2011) publicaron un

solvato constituido por CIP zwitteriónico y 2,2-difluoroetanol en una relación estequiométrica 2:3. Posteriormente, Mafra y col. (2012) aislaron y determinaron la estructura de dos nuevos hidratos, (formas II y III) manteniendo la misma estructura, aunque con diferentes estequiometrías, que son 3,7 y 4,8 hidratos para II y III, respectivamente. Además, estos autores demostraron que la forma anhidra se transforma en el hidrato II simplemente por exposición al vapor de agua ($RH > 90\%$) o por suspensión en agua. Por otra parte, los datos de DRXP muestran que el hidrato II se convierte nuevamente en forma anhidra a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ aproximadamente (Pinto Vitorino et al., 2019).

Sólo se pueden encontrar dos solvatos en la literatura. Li y col. (2007) informaron el análisis por DRXM del hemisolvato metanólico de CIP zwitteriónica con moléculas de MeOH desordenadas a lo largo de un doble eje de rotación.

7.3.3. SALES DE CIP

Aunque CIP tiene dos grupos ionizables que son capaces de reaccionar con un ácido o una base, las únicas sales farmacéuticas útiles provienen de la neutralización de su grupo amino 7-piperazínico (pK_a 8,74) con un compuesto ácido. De hecho, la mayoría de los medicamentos que contienen CIP están compuestos por clorhidrato de CIP. Prasanna y col. (2001), analizaron la estructura cristalina de la sal de CIP con lactato (CIP-LA $\cdot$ 1,5 H₂O). Elshaer y col. (2013) evaluaron la formación de sales con aminoácidos., descubrieron que CIP formaba sales con ASP y GLU. Solo se han reportado dos estructuras salinas con un Antiinflamatorio No Esteroideos (AINES) como contraíón. Bag y col. (2014) describieron la síntesis y caracterización de CIP con diflunisal (CIP-DIF) e indoprofeno hidratada (CIP-INDP-H₂O), en las sales reportadas, han tenido lugar interacciones iónicas entre la piperazina protonada de CIP y el ion carboxilato de los coformadores. Zhang y col. (2016) seleccionaron ácidos orgánicos para reaccionar con CIP en diferentes proporciones. Informaron de la síntesis de cuatro nuevas sales. Dos de ellas son sales de CIP con ácido fumárico en proporción 2:1 y 1:1. La otra sal se obtuvo con ácido cítrico, lo que dio como resultado CIP-AC 2:1 y finalmente la reacción con ácido maleico produjo la sal CIP-MA 1:1 (Pinto Vitorino et al., 2019). Los ácidos carboxílicos como el ácido fumárico, maleico y adípico formaron enlaces iónicos con CIP produciendo sales, debido a los valores de $\Delta pK_a > 4$ entre el fragmento de piperazina de CIP ($pK_a = 8,74$) y los ácidos estudiados, lo que indica la ocurrencia de transferencia de protones y formación de sales. Estas sales mostraron diferentes velocidades de disolución en comparación con CIP HCl o CIP base en soluciones acuosas de diferentes pH (Bashimam et al., 2022). Chadha y col. (2016),

prepararon una sal con ácido hipúrico (CIP-AH) con una estequiometría 1:1. Se obtuvo un monocristal mediante la técnica de difusión de vapor. Se demostró una mejora de la solubilidad 22 veces mayor y una velocidad de disolución más rápida que la de CIP.

7.3.4. COCRISTALES DE CIP

En 2020, Shemchuk y col. notificaron dos cocristales de CIP con timol y tres con carvacrol. La actividad antimicrobiana contra *E. coli* fue aproximadamente el doble que la correspondiente a CIP o a la Mezcla Física (MF). Almeida y col. (2020) usaron el ácido Nicotínico (NIC) y el ácido Isonicotínico (INA) como COF por preparación mediante método mecanoquímico: molienda pura y LAG con etanol (EtOH). El estudio de solubilidad reveló una mejor solubilidad acuosa que el fármaco original. Golovnev y col. (2018) propusieron un "cocrystal de sal" cuando se cristaliza una cantidad específica de ácido barbitúrico con CIP que permite que las moléculas del ácido ionizado y no ionizado cristalicen simultáneamente. Aquí, los enlaces de hidrógeno intermoleculares N---HO y O---HO formados por moléculas de agua y los iones componentes forman una red 3D estable (Bashimam et al., 2022).

7.3.5. CIP CON METALES

Tres de los grupos funcionales presentes en la estructura del CIP (el ácido 3-carboxílico, el NH básico en el anillo 7-piperazinilo y el oxígeno del carbonilo en la posición 4) hacen que sea un buen ligando para formar quelatos con iones metálicos. De hecho, se ha sintetizado y descrito una amplia variedad de complejos metálicos en los que puede actuar como ligando bidentado, no identificado y como puente, con los siguientes iones: VO^{+2} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ce^{3+} , Mg^{2+} , Bi^{3+} , Zn^{2+} (Pinto Vitorino et al., 2019; Psomas et al., 2013).

7.4. ESTADO SÓLIDO DE SULFANILAMIDA

Desde mediados del siglo pasado, las SA se han utilizado como moléculas modelo para estudios sobre el polimorfismo cristalino, tal como lo mencionó Caira (2007) en su artículo de revisión. Este grupo de moléculas presentan múltiples grupos funcionales con propiedades aceptoras y donoras de puente hidrógeno, que permiten la formación de complejos supramoleculares estables en solución y posibilitan la generación de cocristales en diferentes formas (Bashimam et al., 2022). Es así que

Sulfanilamida (SNA) y Sulfametoxazol (SMX), pertenecientes a las SA, experimentan polimorfismo.

7.4.1. POLIMORFOS DE SNA

Los parámetros geométricos de los cristales de SNA se estudiaron experimentalmente y se describieron en la literatura. Se encontró que muestran polimorfismo y se presentan en cuatro formas cristalinas (α , β , γ y δ). Lin y col. (1970) emplearon la calorimetría diferencial de barrido para detectar el polimorfismo en la sulfanilamida-d4, y reportaron los termogramas y calores de fusión y transición para las cuatro formas de cristales de este compuesto, así como para la SNA no deuterada (Yang et al., 1972). Toscani y col. (1995) estudiaron las formas α , β y γ de la SNA y determinaron la monotropía de la forma α en el rango de temperatura explorado a presión ordinaria. Los autores concluyeron que la forma α era metaestable en todas las condiciones investigadas, mientras que las formas β y γ poseían dominios de estabilidad. Se encontró que la forma β es estable a temperatura ambiente, mientras que la forma γ corresponde al polimorfo más estable en condiciones de alta temperatura y presión, siendo una forma enantiotrópica de mayor energía a presión normal. Ehiwe y col. (2016) estudiaron los dos polimorfos β y γ que están relacionados enantiotrópicamente y dedujeron que la conversión de SNA- β a SNA- γ se puede inducir a temperaturas elevadas, aunque otros informes incluyen el uso de espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR del inglés Near InfraRed Spectroscopy). Se prepararon los dos polimorfos y se analizaron mediante DRX y DSC. La estructura de la variedad polimórfica δ se obtuvo sólo recientemente, aunque se sabía que existía desde hace más de 30 años. En los polimorfos α , β y γ , ambos átomos de oxígeno del sulfonilo de la SNA participan en interacciones $N-H\cdots O+S$ que definen la red primaria de enlaces de H, mientras que en el polimorfo δ solo un átomo de oxígeno sulfonilo por molécula participa en esta red de enlaces de hidrógeno, formando dos enlaces de H con los grupos sulfamida de dos moléculas vecinas diferentes. Portieri y col. (2004) descubrieron que la β -sulfanilamida era la forma estable a temperatura ambiente y que las formas α y γ volvían a la forma β durante el almacenamiento. También obtuvieron la forma δ , pero no pudieron producir una cantidad suficiente de esa forma para la caracterización espectroscópica. Gelbrich y col. (2008) determinaron que la forma δ era otra forma estable además de la forma β (Ogruc Ildiz et al., 2012). En un estudio teórico reciente, Ildiz y Akyuz informaron la existencia de cuatro confórmeros de SNA I, II, III y IV (Srivastav et al., 2021).

7.4.2. HIDRATOS Y SOLVATOS DE SNA

Hasta el momento no se han reportado en la literatura hidratos o solvatos de SNA.

7.4.3. SALES DE SNA

SNA cuenta con un pKa muy elevado, como se describe en el **Capítulo 4**. Es por ello que no forma sales de importancia farmacéutica.

7.4.4. COCRISTALES DE SNA

Yeh y col. (2018) prepararon cocristales de sulfatiazol y SNA 1:1 con MeOH, por el método de enfriamiento de la solución.

7.4.5. SNA CON METALES

Se utilizaron métodos espectrométricos, AT, DRXM e investigación electroquímica para caracterizar dos complejos de cobre (II) con SNA, $[\text{Cu}_3(\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{S}_2)_4(\text{C}_3\text{H}_6\text{NO})_2\text{Cl}_6]_n$ y $[\text{Cu}(\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{S}_2)(\text{C}_3\text{H}_6\text{NO})\text{Cl}_2]$ (Chebout et al., 2022).

7.5. ESTADO SÓLIDO DE SULFAMETOXAZOL

7.5.1. POLIMORFOS DE SMX

SMX existe en cuatro formas polimórficas diferentes (I, II, III, IV). Yang y col. (1972) identificaron tres polimorfos y los caracterizaron por DSC, TG, FT-IR y DRXP. Prince y col. (2005) investigaron las formas III y IV usando DRXM. La microscopía con platina de calentamiento reveló que el polimorfo III se transforma en la forma II al calentarse entre 145 y 150 °C, lo que se verificó mediante espectroscopía Raman. La forma II luego se transforma en la forma I alrededor de 166 °C, que posteriormente funde a 170 °C.

7.5.2. HIDRATOS Y SOLVATOS DE SMX

Gillory y col. (1985) descubrieron y caracterizaron al semihidrato de SMX.

7.5.3. SALES DE SMX

Caira (2007) informó que el tan conocido complejo formado por SMX y Trimetoprima (TMP) 5:1 es una sal debido a la transferencia completa de protones desde SMX a TMP. Wang y col. (2021) informaron una sal de SMX con la sustancia antiviral amantadina. Se caracterizó exhaustivamente mediante DRX, AT y espectroscópicos SMX-piperazina (Roy et al., 2023).

7.5.4. COCRISTALES DE SMX

Imchalee y col. (2015) describieron la formación de un cocrystal con ácido L-málico que se realizó con éxito mediante el proceso de gas-antisolvente a 45 °C utilizando acetona como disolvente y CO₂ como antidisolvente. Al aplicar el método de calentamiento por sello a la mezcla SMX-TMP, Zaini y col. (2017) descubrieron, mediante técnicas de DRXP y DSC, que la fase sólida resultante fue un cocrystal IFA-IFA. Posteriormente, el equipo de Zaini investigó el cocrystal de SMX-TMP utilizando la técnica de suspensión y el método de molienda. Garnero y col. (2012) desarrollaron y caracterizaron un complejo de SMX e hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD) con el fin de investigar sus interacciones en solución acuosa y en estado sólido. Alsubaie y col. (2018) obtuvieron cuatro cocristales de SMX con 1,2di(4piridil)etileno, 1,3di(4piridil)propano, 4,4'bipiridina y 4-fenilpiridina y se determinaron sus estructuras cristalinas. Nath y col. (2022), describieron la formación de cocristales iónicos de SMX y de sulfatiazol-urea. Roy et al. (2022) reportaron la preparación de un cocrystal 1:1 de SMX con succinimida (SMX-SUC) mediante LAG con acetonitrilo (ACN). La formación de la fase cocrystalina se confirmó mediante DRX y AT, la formación del cocrystal fue rápida, en solo 1 minuto de molienda.

7.5.5. SMX CON METALES

Se sintetizaron y caracterizaron diferentes complejos metálicos de SMX. Los ensayos de ¹H-RMN, UV-Vis, FT-IR y DRXP confirmaron la coordinación de ambos ligandos a metales a través de los átomos de nitrógeno y oxígeno del grupo sulfonamida. Los complejos metálicos de SMX fueron activos contra cepas bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas. El complejo SMX Zn (II) mostró más actividad que su IFA libre (Rostamizadeh et al., 2019).

7.6. MATERIALES Y MÉTODOS

La Materia Prima Comercial (MPC) utilizada, se adquirió comercialmente (pureza >99%) y se utilizó sin purificación previa. Se detallan a continuación los laboratorios productores y los números de lote de las sustancias empleadas en este trabajo de Tesis Doctoral:

- * NOR Parafarm, Argentina, L130666,
- * CIP Roux-Ocefa, L31359,
- * SNA Parafarm, Argentina L 802001,
- * SMX Parafarm, Argentina L98071,
- * Ácido Cítrico anhidro (CIT) Biopack, L 160306,
- * Ácido DL Málico (MAL) Cicarelli, L64219,
- * Ácido L+ Tartárico (TART), Cicarelli L60057.

Los solventes y demás reactivos, tales como acetato de etilo, diclorometano, MeOH, cloroformo, ACN, acetona, éter de petróleo, hidróxido de amonio, EtOH, fueron de grado analítico y de marcas disponibles en el mercado nacional (Sintorgan®, Biopack®, Cicarelli®), y se utilizaron sin purificación previa.

7.6.1. TÉCNICAS UTILIZADAS EN LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

7.6.1.1. Cromatografía en Capa Delgada

Para la Cromatografía en Capa Delgada (CCD), se utilizaron placas de sílica gel 60 F254, de 250 µm de espesor, con indicador de fluorescencia UV254 y soporte de aluminio (Merck®). Para el secado de las muestras sólidas se utilizó sílica gel anhidra con indicador, empleando un desecador y vacío proporcionado por una trampa de agua.

Para la caracterización de FQ y SA por CCD se siguió la metodología descrita en el **Capítulo 5, Sección 5.2.1.**

Para la caracterización de los ácidos orgánicos empleados se siguió la metodología que a continuación se describe (Marsh et al., 1951): los sólidos se disolvieron en EtOH y se realizó una siembra puntual sobre papel Wathman N° 1 como fase estacionaria. La fase móvil fue butanol:ácido fórmico:agua (1:1:1). El revelador

fue una solución de azul de bromofenol (400 mg/mL) en EtOH 96°, alcalinizada con hidróxido de sodio (NaOH) 0,5 M a pH 6,5.

7.6.1.2. Temperatura de Fusión

El rango de fusión se determinó mediante el Fusiómetro de tubo capilar MPA100 Optimelt Automated Melting Point System, con una velocidad de calentamiento de 1°C/min. Los valores de Temperatura de Fusión (TF) se informaron en °C y con un promedio de tres determinaciones.

7.6.1.3. Microscopía Óptica y Microscopía de Luz Polarizada

La morfología y cristalinidad de las muestras fueron observadas utilizando un Microscopio óptico Olympus CX 31 con sistema adaptable de luz polarizada.

7.6.1.4. Microscopía de Platina Calentable

Se utilizó un microscopio marca Leitz Wetzlar, (Germany) con una magnificación de 10X. Cada muestra, previamente mortereada, fue inmersa en aceite de silicona de alto Punto de Fusión (PF) con la finalidad de detectar desprendimiento de burbujas provocadas por procesos de deshidratación o descomposición. Posteriormente se procedió a calentar cada muestra a una velocidad inicial de 10°C/min y de 1°C/min en cercanías del PF. Las temperaturas determinadas en el caso de la platina Kofler utilizada en esta tesis tuvieron una incerteza de ± 3 °C y las velocidades de calentamiento no fueron lineales. Sin embargo, fue útil para el análisis complementario de las muestras estudiadas, y en algunos casos se encontró una buena concordancia entre las temperaturas obtenidas por kofler y DSC.

7.6.1.5. Microscopía Electrónica de Barrido

Se tomaron fotografías de las muestras en un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) LW JSM 6510 con un aumento comprendido entre 80 y 190 X.

7.6.1.6. Análisis Térmico

Las mediciones de DSC y TG se registraron en los analizadores Discovery DSC y Discovery TGA (TA Instrument Inc., New Castle, DE, EE. UU.), respectivamente, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min bajo N₂ (99,99% de pureza, caudal velocidad de 50 mL/min). Para las mediciones de DSC, se utilizaron recipientes de aluminio prensados. Los ejes de temperatura DSC y TG se calibraron con indio (99,99% de pureza, PF= 156,6 °C) y el punto de Curie de Ni (358,2 °C),

respectivamente. Se emplearon muestras con una masa de 2-4 mg. Se utilizaron recipientes de aluminio vacíos como referencias. Los datos se procesaron con el software TRIOS_Full_v4.1.1.33073 (TA Instruments Inc.).

7.6.1.7. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

Los IFA, COF y aductos se analizaron mediante FT-IR en el rango de longitud de onda de 400-4000 cm^{-1} . Los espectros se registraron en un microscopio de infrarrojos Nicolet iN 10 (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, EE. UU.). Las muestras (polvos o partículas de cristal trituradas suavemente con una espátula) se depositaron en un sedimento de KBr (dispersión al 2% p/p) y los espectros se adquirieron acumulando 16 exploraciones a una resolución de 8 cm^{-1} . El KBr utilizado fue de grado espectroscópico (Merck, Alemania) y se secó 24 h a 80 °C.

7.6.1.8. Resonancia Magnética Nuclear protónica

Los espectros ^1H -RMN se registraron en un espectrómetro Bruker AC 200 FT (200,13 MHz), a temperatura ambiente. Las muestras fueron disueltas en DMSO- d_6 . Los corrimientos químicos se expresaron en ppm.

7.6.1.9. Difracción de Rayos X de Polvo

Los patrones de DRXP de las muestras se obtuvieron, a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) en el siguiente difractómetro: PANalytical PW1710 (Philips, Holanda) con ánodo de $\text{CuK}\alpha$ longitud de onda ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, 40 kV, 20 mA). La medición se llevó a cabo con un tamaño de paso de 0,02 ° y un tiempo de 2 s/paso. El intervalo de medición fue entre 2 y 45 °2 θ . El procesamiento de los datos experimentales se efectuó con el programa Philips Analytical PC-ADP Diffraction software (del paquete de programas del difractómetro).

7.6.2. PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PUREZA DE IFA Y COF

La materia prima extraída del envase ó MPC que fue sometida a los métodos de procesamiento que se describen más adelante (**Figura 7.2**), se la denomina Materia Prima Procesada (MPP). Tanto a la MPC como a la MPP, se le realizaron pruebas de pureza e identidad, para determinar el tipo de polimorfo presente. La pureza se controló mediante la determinación de:

- * TF
- * CCD
- * TG y DSC
- * MO
- * La identidad de los IFA y COF fue verificada por:
- * DRXP
- * FT-IR y DRIFT
- * ^1H -RMN

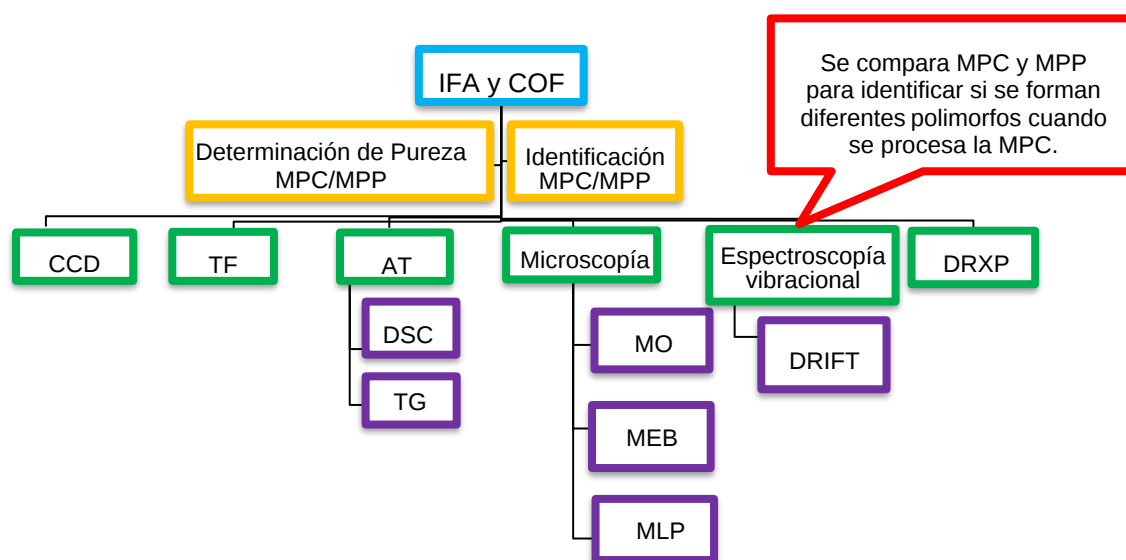


Figura 7.2. Procedimiento para identificación y determinación de pureza MPC y MPP.

7.6.3. OBTENCIÓN DE NUEVAS FORMAS SÓLIDAS

7.6.3.1. Preparación de Mezclas Físicas

Para crear MF binarias, se colocaron cantidades pesadas, en relación estequiométrica 1:1 de IFA+IFA o IFA+COF en un mortero de ágata y se mezclaron suavemente con una espátula de acero durante un minuto. Hasta su caracterización, se guardaron en desecadores con vacío y sílica gel. Las MF se denominarán como la suma del IFA+IFA o IFA+COF, seguido de la sigla MF.

7.6.3.2. Preparación de sólidos multicomponentes

El cribado de cocristales se puede llevar a cabo utilizando métodos en soluciones, (cristalización por ultrasonidos, evaporación o fluidos supercríticos) y en seco. Los métodos de solución pueden implicar problemas con la precipitación del IFA o del COF o el impedimento de la formación de cocristales cuando la diferencia de solubilidad entre los dos componentes es grande. Además, estos métodos tienden a requerir una gran cantidad de experimentos a la luz de la diversidad de solventes requeridos, con un impacto ambiental desfavorable. En cambio, los métodos de cribado que utilizan el estado sólido, como la molienda pura, LAG y la cristalización inducida por calor, generalmente requieren una gran cantidad de muestra y no son de alto rendimiento, lo que resalta la necesidad de un sistema de cribado de cocristales de alto rendimiento y pequeña escala que utilice estado sólido (Yamashita et al., 2013).

En esta Tesis Doctoral se decidió trabajar con compuestos en una relación estequiométrica (1:1) ya que es la proporción más adecuada para el diseño de cocristales farmacéuticos y que ha mostrado mayor frecuencia de interacción, en comparación con aquellos con relaciones 1:2 ó 2:1; y aumenta la probabilidad de interacción supramolecular entre un IFA y un COF (Perlovich et al., 2015). Para la búsqueda de aductos moleculares se realizaron varios procedimientos. En todos los casos, se sometió al mismo procedimiento a la MPC, con fines comparativos. Las mezclas estudiadas fueron FQ+SA; FQ+COF y SA+COF. Las diferentes metodologías empleadas para la obtención de las muestras sólidas cristalinas o amorfas se detallan a continuación:

MOLIENDA

Existen dos técnicas diferentes para la síntesis de aductos moleculares a través de la molienda. Históricamente, el primer método fue el de molienda pura (en seco), que consiste en mezclar los componentes y en molerlos manualmente, usando un mortero y un pilón (**Fig 7.3.A**), o mecánicamente, utilizando un molino de bolas o un molino vibratorio. La segunda técnica LAG o amasado es cuando se añade al proceso de molienda un disolvente, que puede disolver total o parcialmente los componentes originales (**Fig 7.3.B**), se incrementarán las oportunidades de colisiones moleculares y se facilitará la relajación de las moléculas de soluto (Lu et al., 2011). Esta metodología se introdujo originalmente como un medio para aumentar la velocidad de formación de cocristales en estado sólido, aunque pronto se observó que proporcionaba beneficios adicionales sobre los procedimientos de molienda pura, incluido un mayor rendimiento,

mayor cristalinidad del producto, capacidad para controlar la formación de polimorfos y un alcance significativamente mayor de reactivos y productos. Tanto la molienda pura como el LAG se han establecido como métodos altamente eficientes de cribado de cocristales, sales, y formas polimórficas de compuestos farmacéuticos (Friščić et al., 2009).

Se puede encontrar una gran cantidad de ejemplos en la literatura que describen la molienda de sólidos puros mediante mortero y pilón o molinos automatizados para producir cocristales y eutécticos. Hay tres mecanismos reconocidos que ocurren durante la molienda en estado sólido: difusión molecular de la molienda, formación eutéctica y cocrystalización mediada por fase amorfa. La difusión molecular de la molienda se describe como un proceso por el cual la superficie del sólido se vuelve móvil ya sea por vaporización o transferencia de energía a la superficie de los sólidos. En el caso del eutéctico, primero se forma el líquido eutéctico que luego cristaliza hasta el sólido final. Por último, se describe que el cocrystal surge de la fase amorfa de los sólidos originales. En todos estos casos, la característica común es la formación de una fase intermedia (gas, líquido o sólido amorfo) que tiene una mayor movilidad y/o energía con respecto a los materiales de partida. Se ha demostrado que la adición de cantidades catalíticas de disolvente a la matriz de molienda mejora la eficiencia de la preparación y aumenta la cristalinidad del producto final de los cocristales. Estas observaciones y estudios posteriores han llevado a la práctica común de LAG, para la preparación de DNC (Stoler et al., 2015).

Para la formación de los sólidos multicomponentes se pesó aproximadamente 1 mmol de cada uno de los IFA o COF a ensayar y se colocaron sendas cantidades de cada par IFA-IFA ó IFA-COF en el mortero. Se realizó la técnica de molienda en seco y con adición de solvente. Se adicionaron 5 mL (fraccionados en alícuotas de aproximadamente 1 mL) de ACN por cada mmol y se molió por un tiempo de 30 y 60 min. La MPP se almacenó en un desecador con sílica gel, al abrigo de la luz. También se realizaron LAG con agregado de EtOH o de una solución de ácido acético 1,13 M, en lugar de ACN. Pero solo con ACN se obtuvieron resultados interesantes y reproducibles, como se indicará en secciones posteriores.

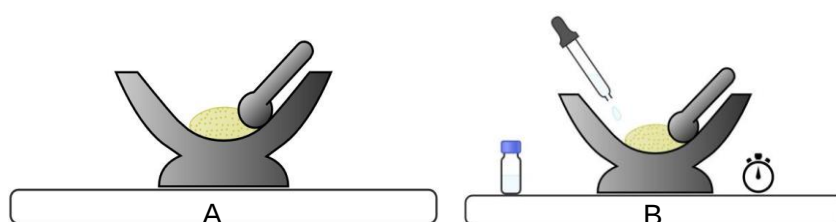


Figura 7.3. Molienda **A.** en seco y **B.** LAG.

MOLIENDA ASISTIDA POR SOLVENTE SEGUIDO DE EVAPORACIÓN

La estructura cristalina del producto de una reacción de cocrystalización es, sin duda, el dato más importante para los químicos sintéticos supramoleculares. Desafortunadamente, el tamaño de las partículas obtenido de una molienda limita la caracterización estructural mediante la técnica estándar de DRXM. En aquellos casos en los que la molienda y la cocrystalización de la solución proporcionan productos diferentes de manera consistente, a veces es posible sembrar una solución sobresaturada de los componentes del aducto con el material obtenido por molienda (**Fig 7.4**), lo que lleva a la cristalización de la fase deseada. En los casos en los que fracasan los experimentos de crecimiento de la solución y de siembra, los avances recientes DRXP y el software de análisis de datos permiten un enfoque bastante rutinario para la solución de estructura cristalina a partir de datos de polvo (Frišćić et al., 2009). A las mezclas obtenidas por LAG (ACN) se las disolvió en ACN y se dejó evaporar.

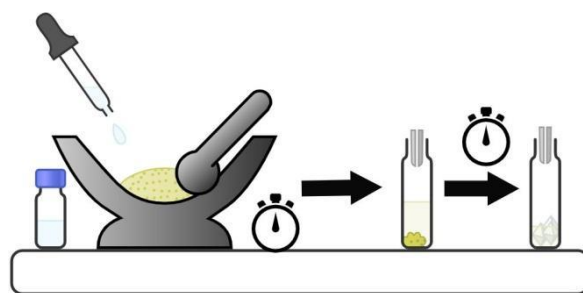


Figura 7.4. LAG seguido de evaporación.

DIFUSIÓN DE VAPOR

Este método está basado en la saturación líquido-vapor de un solvente polar y de baja presión de vapor (el solvente) por parte de otro solvente de baja polaridad y elevada presión de vapor (el antisolvente), ambos colocados en distintos recipientes, pero en un mismo sistema hermético. El sólido por ensayar se disuelve en el solvente. El antisolvente comienza a difundir desde el recipiente exterior hacia el interior del receptáculo que contiene la solución. Por efecto de antisolvencia el compuesto comenzará a precipitar lentamente desde el seno de la solución (Cunha, 2008). En el caso de los ensayos realizados en este trabajo, se buscó la precipitación del aducto molecular por efecto del cambio de pH en la solución, por ello el solvente empleado fue una solución de NaOH 0,3 M y el antisolvente una solución de ácido acético 2 M. En los perfiles de solubilidad aparente versus pH para los IFA en estudio,

se observa que en el rango de pH comprendido entre 6 y 8 la solubilidad es mínima. Con la finalidad de observar la variación del pH de la solución, se colocó, además, otro recipiente que contiene la misma solución, pero con el indicador de pH que vira en el rango de pH en el que ocurre la precipitación. El esquema se muestra a continuación (Fig. 7.5).

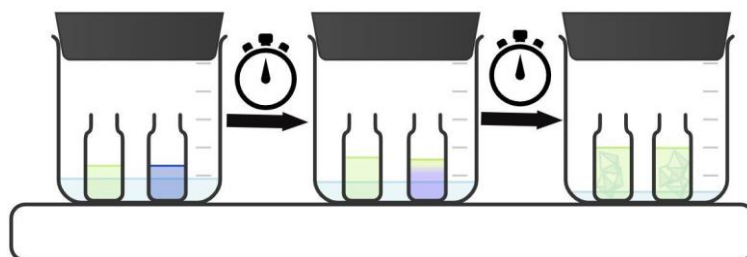


Figura 7.5. Cristalización por difusión de vapor.

Los IFA y COF a ensayar se pesaron y disolvieron con NaOH 0,3 M. Al vial “indicador” se le agregaron, además, 2 gotas de azul de bromotimol. Los dos recipientes se introdujeron en un frasco de vidrio de boca ancha saturado con ácido acético 2 M y se tapó herméticamente. El frasco se almacenó en un sitio oscuro, fresco y aislado de vibraciones. Cada 2 días se realizaron observaciones y control de pH. Se filtraron al vacío los sólidos precipitados y se secaron sobre sílica gel. Se calculó el rendimiento.

EVAPORACIÓN LENTA

Es un método operacionalmente simple, basado en la evaporación lenta del solvente desde una solución no saturada del sólido. El esquema se muestra a continuación (Fig. 7.6).

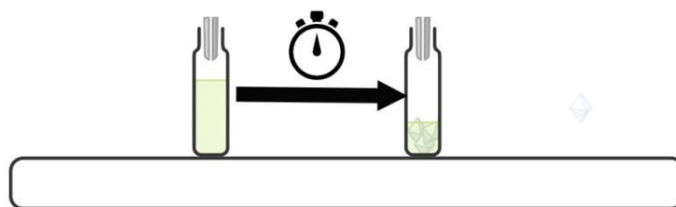


Figura 7.6. Método de evaporación.

Se pesaron los IFA y COF a ensayar y se disolvieron en una solución acuosa de ácido acético 1 M. Se tapó la boca del frasco con un film al que se le realizaron pequeñas perforaciones para permitir la evaporación lenta del solvente. Los recipientes se almacenaron en un sitio oscuro, fresco y aislado de vibraciones.

PREPARACIÓN DE UNA SOLUCIÓN SATURADA Y DISMINUCIÓN LENTA DE LA TEMPERATURA CON AGREGADO DE SOLVENTE

Se preparan soluciones saturadas de las sustancias a ensayar, disueltas en solventes orgánicos, calentadas a temperatura próxima a ebullición (**Fig. 7.7**). Posteriormente se adiciona un cosolvente calentado a igual temperatura y se deja enfriar lentamente (Paluch et al., 2013).

En nuestro caso se incorporaron 1,5 mmol del COF seleccionado (TART, CIT, MAL) en un vial con 20 mL de agua destilada a T° ambiente y se calentaron hasta 70 °C. Se agregaron 1,5 mmol de NOR y luego la cantidad necesaria de EtOH 96° caliente (a 70 °C) para formar una solución etanólica al 50% (v/v). Una vez que el sólido se disolvió totalmente, se disminuyó la temperatura gradualmente hasta temperatura ambiente y se colocó el recipiente en la heladera durante 2 días.

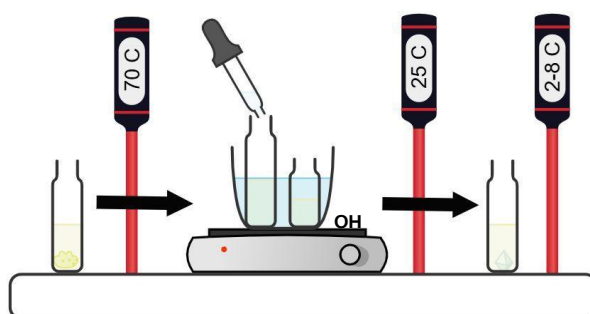


Figura 7.7. Enfriamiento lento de disoluciones saturadas.

7.6.4. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE SÓLIDOS MULTICOMPONENTES

Todas las muestras preparadas se controlaron por CCD en cuanto a su pureza química. La caracterización de MPP y aductos obtenidos se efectuó mediante técnicas físico-químicas tales como (**Figura 7.8**):

- * CCD
- * AT: TG, DSC
- * Caracterización morfológica: MO, MLP, MPC, MEB.

La elucidación estructural se realizó aplicando las siguientes metodologías:

- * FT-IR o DRIFT
- * ^1H -RMN
- * UV-Vis
- * DRXP

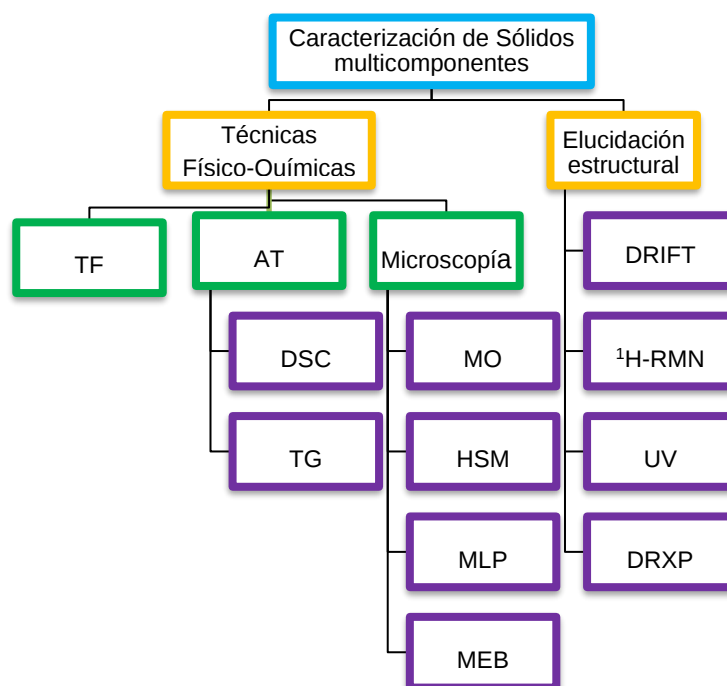


Figura 7.8. Técnicas analíticas utilizadas para la caracterización de sólidos multicomponentes.

La identificación inicial de los sólidos multicomponentes se realizó mediante técnicas termoanalíticas, es decir, DSC y TG. Dado que aún no existe un conocimiento cabal sobre la termodinámica de la formación de los cocristales, los investigadores suelen utilizar los puntos de fusión para compararlos con los de los compuestos individuales. Las TF se utilizan habitualmente para describir, evaluar o imitar la energía de la red cristalina. Por lo tanto, el uso de puntos de fusión para evaluar las características de la red cristalina es físicamente viable (Perlovich et al., 2015). La DSC se utiliza ampliamente para investigar el estado de compatibilidad y las alteraciones estructurales en las moléculas (Vemuri et al., 2021). Por otra parte, constituye un método diagnóstico rápido para distinguir una combinación eutéctica de un cocrystal (Cherukuvada y Guru Row, 2014; Cherukuvada y Nangia, 2014; Prasad et al., 2014), además de ser utilizada para el cribado *in situ* y la caracterización térmica de cocristales (Lu et al., 2008; Yamashita et al., 2013; Yamashita et al., 2014). Por esta razón, se analizaron mediante DSC y TG todas las muestras que exhibieron TF distinta a la de los compuestos de partida.

También se ha utilizado la microscopía para indicar la formación de un cocrystal, aunque este método solo sirve si se observa un cambio significativo en la morfología respecto a los componentes individuales, por ello se toman fotografías tanto a los materiales de partida como a los aductos obtenidos.

A fin de predecir las interacciones intermoleculares que se establecen entre IFA- IFA o IFA-COF se utilizaron métodos espectroscópicos como FT-IR y DRIFT.

Para realizar la elucidación estructural tridimensional, la técnica por elección es la DRXM, pero muchas veces no es posible obtener un cocrystal del tamaño y las características adecuadas para el análisis de monocristales, en particular cuando se utiliza el método de molienda para la preparación. En estos casos, la evaluación de si se produce o no una nueva fase y del grado de transferencia de protones en la nueva fase se puede llevar a cabo mediante un análisis que incluye la conjunción de varios métodos (Stoler et al., 2015). Estos métodos no suelen predecir la estructura tridimensional del cocrystal o eutéctico, pero pueden, por la aparición de nuevos picos o desaparición de picos en los espectros, indicar la presencia de nuevas interacciones en DNC que no se observan en los compuestos puros. En este trabajo se utilizó la DRXP como una técnica de caracterización alternativa a la DRXM, la desventaja es que por sí sola no puede diferenciar entre hidratos, solvatos y cocrystal. El análisis de DRXP tiene la capacidad de determinar la cristalinidad de la molécula del IFA. La estabilización de la red cristalina de un cocrystal en comparación con una mezcla física también conduce a la ordenación de las moléculas y a la reducción de la entropía (Perlovich et al., 2015).

7.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.7.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS DIFERENTES POLIMORFOS

Debido a que los IFA elegidos para trabajar en esta Tesis Doctoral presentan un elevado polimorfismo, el primer paso realizado fue la caracterización de los polimorfos presentes en la materia prima. En el análisis de los diferentes polimorfos de los cuatro IFA en estudio se procedió a identificarlos de la siguiente manera: IFA obtenida del recipiente original (IFA_{MPC}) e IFA procesada por LAG (IFA_{LAG-ACN}). El tiempo de molienda de estas últimas fue variable y se indica la cantidad de minutos (30 o 60). Durante la tesis se prepararon diferentes aductos en distintos momentos, con una diferencia significativa de tiempo entre cada uno. Es por ello que se analizó la

MPC previo al procesamiento de los aductos. Se identificaron los IFA con el año en el cual se realizaron los aductos de la siguiente manera: IFA_{MPC-AÑO}.

7.7.1.1. Análisis del polimorfismo de NOR

Se realizó la caracterización e identificación de NOR_{MPC-2015} utilizada para la molienda IFA-IFA con ACN y NOR_{MPC-2018}, con la cual se prepararon los aductos IFA-GRAS. Ambas NOR proceden del mismo lote, pero se procesaron en años diferentes.

En la **Tabla 7.1** se pueden ver los valores del comienzo del efecto térmico extrapolado (T_{ie}), el valor de pico de la endotema (T_p) y el calor de fusión, obtenidos con DSC. Las diferencias entre las T_{ie} y el calor de fusión sugieren que las tres muestras representan diferentes polimorfos de NOR. En la **Tabla 7.1** figuran, a modo comparativo, los datos bibliográficos de los diferentes polimorfos de NOR publicados hasta el momento.

Tabla 7.1. Temperatura de pico, Temperatura de inicio extrapolada y calor de fusión de NOR en la fusión y transición; y datos bibliográficos.

	FUSIÓN		TRANSICIÓN		Bibliografía
	T_p (°C)	T_{ie} (°C)	Calor de Fusión (J/g)	T_{ie} (°C)	
Polimorfo A	220,5		114,8		Barbas et al. 2006; Sustar et al. (1993)
Polimorfo B	211,7		115,2	195,6	Barbas et al. 2006; Sustar et al. (1993)
Polimorfo C	207		130,1		Barbas et al. 2007
Sesquihidrato	221			97	Puigjaner et al. (2010)
NOR_{MPC-2015}	219,5	218,28	106,6		
NOR_{MPC-2018}	222,6	220,85		201,87	
NOR_{LAG-ACN}	219,3	215,17	81,29		

T_p : Temperatura de pico, T_{ie} : Temperatura de inicio extrapolada

Se analizaron los termogramas de NOR_{MPC-2015}, NOR_{MPC-2018} y por último NOR procesada por LAG con ACN: NOR_{LAG-ACN} (**Fig. 7.9**). NOR_{MPC-2015}, tiene un pico endotérmico a 218,28°C, que corresponde a su PF. Se observa una endoterma leve y ancha entre 80-100°C, por pérdida de agua. El termograma DSC de NOR_{MPC-2018}, **Figura 7.9**, muestra un pico endotérmico agudo a 220,85°C, correspondiente al PF. Se observa una endoterma a temperaturas inferiores al PF (T_{ie} =201,87°C), probablemente correspondiente a una transición sólido-sólido. Esta característica se le atribuye al polimorfo B, descrito por Barbas 2006, en donde se detalla que el polimorfo B muestra dos endotermas con temperaturas de inicio en 212 °C (transición sólido-sólido) y 220 °C (fusión). El ATG muestra una pérdida de peso al comienzo de la

fusión, correspondiente a la descomposición del IFA, en este caso $NOR_{MPC-2018}$ se encuentra de forma anhidra.

La forma obtenida por LAG con ACN presenta un termograma diferente en comparación con el de los compuestos puros (**Figura 7.9**), en donde se ve un pico endotérmico amplio entre 100°C y 130°C seguido de otro pico endotérmico agudo con un mínimo alrededor de $215,17^{\circ}\text{C}$ que corresponde a la fusión de la muestra. El ATG muestra una pérdida de peso del 1,274% indicando que $NOR_{LAG-ACN}$ está hidratado con 1,5 moléculas de agua.

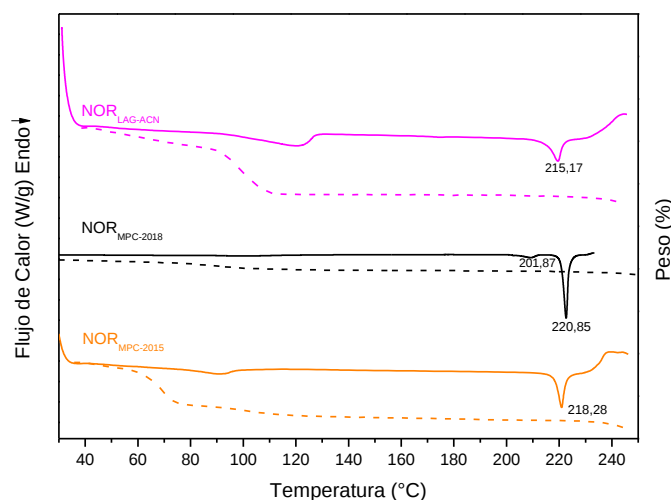


Figura 7.9. Curvas DSC (línea recta) y TG (línea punteada) ($\beta = 10^{\circ}\text{C/min}$, flujo de $N_2 = 50\text{ mL/min}$) de: $NOR_{MPC-2015}$, $NOR_{MPC-2018}$, $NOR_{LAG-ACN}$.

En la **Figura 7.10** se presenta la comparación entre los espectros FT-IR de $NOR_{MPC-2018}$ y de $NOR_{LAG-ACN}$ a diferentes tiempos (30 y 60 min). Estos espectros se dividen en tres regiones espectrales (rangos espectrales de 1800 a 1600 cm^{-1} , 1600 a 1000 cm^{-1} y 800 a 600 cm^{-1}) donde es posible distinguir entre diferentes formas sólidas de NOR (Bratu et al., 2011). Se puede observar que los espectros vibracionales de los compuestos comparados ($NOR_{MPC-2018}$ y $NOR_{LAG-ACN}$) son completamente diferentes. A fin de interpretar los espectros se recuerda que NOR posee un grupo ácido $-\text{COOH}$ con un pKa de 6,34 y un grupo básico $-\text{NH}$ con un pKa de 8,75.

El espectro DRIFT de $NOR_{MPC-2018}$, presenta una banda en 3400 cm^{-1} correspondiente al estiramiento N-H, una banda a 2852 cm^{-1} referente al estiramiento del O-H del grupo ácido y otra a 957 cm^{-1} debida a la deformación angular fuera del plano del mismo grupo O-H. Por otra parte, a 1730 cm^{-1} se encuentra la banda característica del estiramiento del grupo C=O del ácido carboxílico, a 1610 cm^{-1} el

estiramiento C=O cetona, y la banda a 1249 cm^{-1} del estiramiento del C-O ácido. Estas señales indican que $\text{NOR}_{\text{MPC-2018}}$ se encuentra en forma no ionizada. Por otra parte, se observa que tanto $\text{NOR}_{\text{LAG-ACN60'}}$ como $\text{NOR}_{\text{LAG-ACN30'}}$ pueden inducir la transferencia de protones al encontrarse hidratados. Este efecto se puede observar por la desaparición de banda a 1730 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de C=O, y la aparición de banda a 1380 cm^{-1} , debida a la formación del ion carboxilato, y la banda a 2550 cm^{-1} característica del grupo NH_2^+ (Basavoju et al., 2006; Chongcharoen et al., 2008; Hu et al., 2002). El comportamiento observado fue descrito por Hu y col. (2002) argumentando que la absorción de moléculas de agua puede inducir la interacción entre las moléculas de NOR transformando los enlaces intermoleculares puente de hidrógeno en enlaces iónicos y provocando la formación de la especie zwitteriónica.

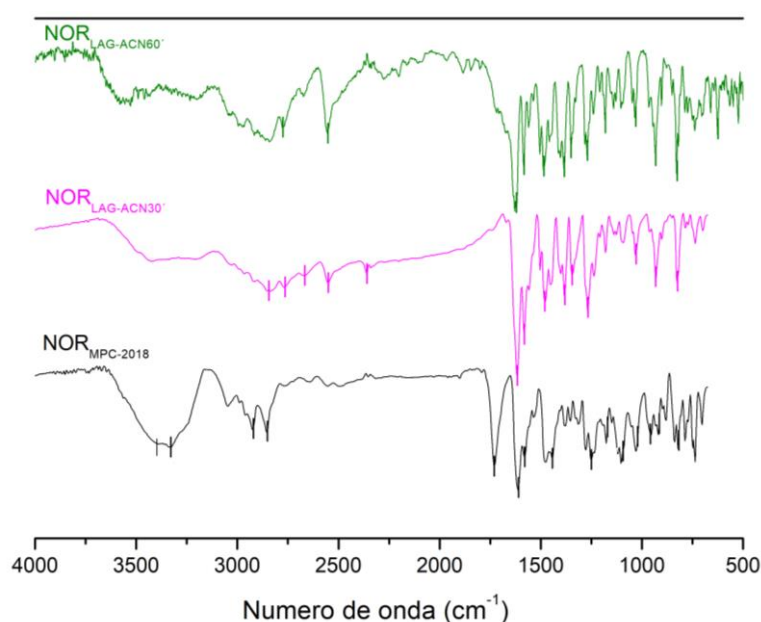


Figura 7.10 Espectros DRIFT de: $\text{NOR}_{\text{MPC-2018}}$, $\text{NOR}_{\text{LAG-ACN30'}}$ y $\text{NOR}_{\text{LAG-ACN60'}}$.

En la **Figura 7.11** se pueden ver los difractogramas de $\text{NOR}_{\text{MPC-2018}}$, $\text{NOR}_{\text{LAG-ACN}}$ sometidos a diferentes tiempos de molienda (30 y 60 minutos) pero analizados en diferentes años, el que se obtuvo junto a los aductos IFA+IFA ($\text{NOR}_{\text{LAG-ACN-2015}}$) y el obtenido de la molienda cuando se prepararon los aductos IFA-GRAS ($\text{NOR}_{\text{LAG-ACN-2018}}$). Se observa que $\text{NOR}_{\text{MPC-2018}}$ presenta un difractograma distinto al de todos los $\text{NOR}_{\text{LAG-ACN}}$, indistinto del año de obtención. Las principales diferencias se observan en las señales $10,49^\circ$; $11,27^\circ$; $13,19^\circ$; $17,59^\circ$ y $26,89^\circ$ 2θ . Estos resultados indican que durante el proceso de LAG con ACN, NOR cambia de polimorfo. En el análisis de DSC y TG (**Fig. 7.11**) se vio que se parte de diferentes polimorfos de NOR_{MPC} , pero en la DRXP se concluye que cuando NOR se somete al proceso de LAG con ACN,

independientemente del polimorfo de partida y del tiempo de molienda, se obtiene el mismo producto final.

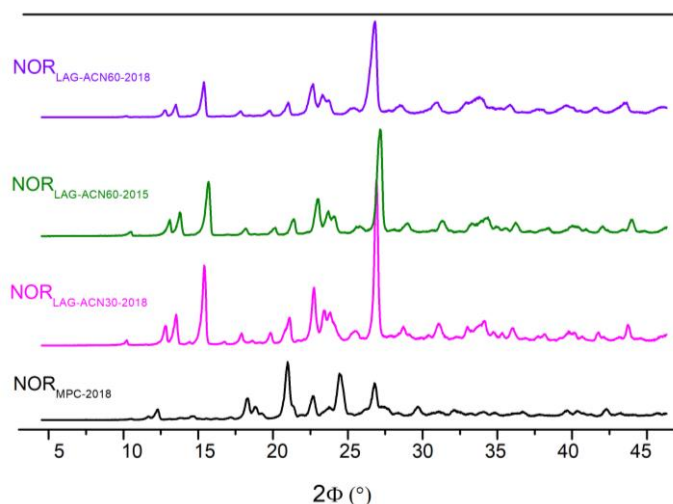


Figura 7.11. Patrones de DRXP experimentales de: $NOR_{MPC-2018}$, $NOR_{LAG-ACN30-2018}$, $NOR_{LAG-ACN60-2015}$, $NOR_{LAG-ACN60-2018}$.

A fines comparativos, en la **Figura 7.12** se incluyen los patrones de DRXP de los diferentes polimorfos e hidratos publicados de NOR, extraídos de Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC) y los datos experimentales obtenidos en este trabajo. Se puede observar que el difractograma de $NOR_{LAG-ACN}$ es similar al informado para NOR sesquihidrato 1,25 H_2O .

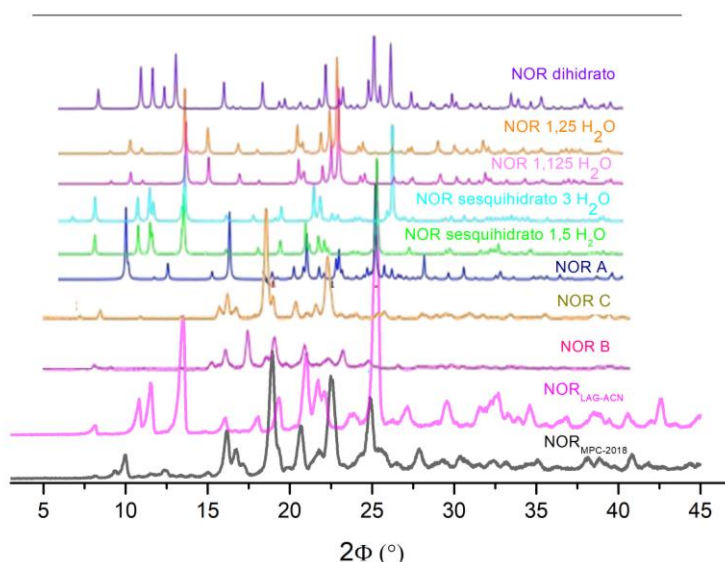


Figura 7.12. Patrones de DRX de NOR: $NORMPC-2018$, $NOR_{LAG-ACN}$ y los difractogramas simulados de NOR forma A, de las formas sesquihidrato 1,5 H_2O y 3 H_2O , de las formas hidratadas 1,125 y 1,25 y de la forma dihidrato, registros de Archivos CIF de estructuras depositadas en el CCDC con los números 617104, 720746, 720747, 719474, 719473 y 153910 respectivamente (Figura adaptada de Caria Santos, 2021).

Se concluye que **NOR_{MPC-2015} es un hidrato de NOR** y **NOR_{MPC-2018} es anhidra**. No hay pruebas suficientes para identificar NOR_{MPC-2015}, ya que solo se realizó DSC y TG, pero sí para suponer que con el paso del tiempo, en el almacenamiento, NOR cambia de polimorfo o se deshidrata.

NOR anhidra puede existir de 3 formas diferentes (Polimorfo A, B y C), ordenados en orden decreciente de estabilidad. La forma C muestra una gran similitud con la forma B en cuanto a sus propiedades de espectroscopía molecular (IR, Raman y RMN), pero la forma A se diferencia significativamente de B y C (Barbas et al., 2007). Basavoju et al., (2006) informaron que NOR polimorfo A y B existen como una molécula neutra y muestra una frecuencia de absorción al IR para el grupo C=O del ácido carboxílico de 1730 cm⁻¹, no es así es el caso del polimorfo C que existe en forma zwitteriónica (Barbas et al., 2007). Según Barbas (2006), cuando el polimorfo A se mezcla con pequeñas cantidades del polimorfo B, se observa un fenómeno endotérmico a 196 °C en un experimento de DSC realizado a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, seguido de la fusión de la forma A. La velocidad de calentamiento influye en la temperatura de inicio de la primera endoterma, mientras que la temperatura de inicio de la fusión de la forma A no se ve afectada, lo que confirma que la primera endoterma observada en DSC es una transición sólido-sólido. También se confirma que el par A y B están relacionados enantiotrópicamente. (Barbas et al., 2006). Con estas evidencias podemos concluir que **NOR_{MPC-2018} corresponde a una mezcla de NOR polimorfo A**, descrito por Barbas y col. (2006), de acuerdo con las similitudes observadas con los espectros de FT-IR y los difractogramas de DRXP, **y de NOR polimorfo B** según la similitud observada con el termograma publicado por Barbas y col. (2006).

Con respecto a NOR_{LAG-ACN} se observa que, independientemente del tiempo de amasado y del lote, se obtiene el mismo polimorfo como producto final. Por otra parte, se observa que NOR_{LAG-ACN} es un hidrato ya que en el TG se observa la pérdida de moléculas de agua asociadas a la red cristalina y el DRIFT indica la presencia de estructuras zwitteriónicas. **Se concluye que NOR_{LAG-ACN} se trata del polimorfo NOR sesquihidrato 1,5 H₂O**. El patrón de DRXP de la muestra es similar al informado por Ravindra y col. (2009). Puigjaner y col. (2010) confirmaron que NOR sesquihidrato se convierte en la Forma A de NOR anhidro al perder las moléculas de agua.

Teniendo en cuenta que NOR_{MPC} y NOR_{LAG-ACN} son diferentes polimorfos, se procedió a preparar los aductos a partir de estos dos sólidos (**Figura 7.13**), a fin de evaluar por DRXP si se obtiene el mismo aducto, independiente del material de partida.

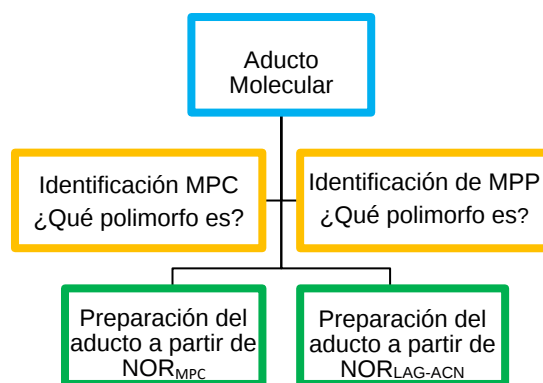


Figura 7.13. Evaluación del aducto a partir de NOR_{MPC} y $NOR_{LAG-ACN}$.

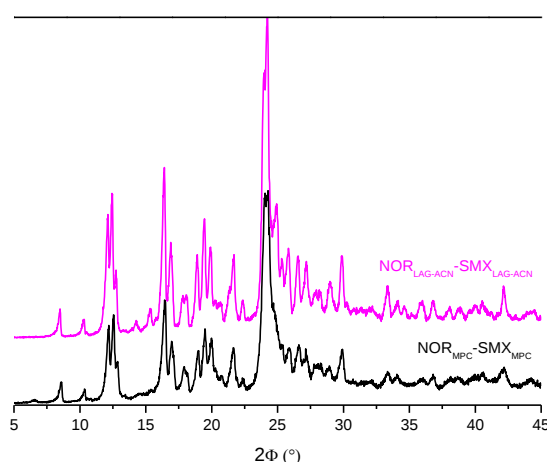


Figura 7.14. Patrones experimentales de DRXP de: $NOR_{MPC}-SMX_{MPC}$ y $NOR_{LAG-ACN}-SMX_{LAG-ACN}$

Se observa en la **Fig. 7.14** que el difractograma de los dos aductos obtenidos por diferentes caminos, es idéntico. **Se concluye que el aducto obtenido es el mismo independientemente del material de partida, por lo tanto, se deduce que la transformación polimórfica ocurre durante el proceso de amasado con ACN.** Además, se observa un aumento de la cristalinidad proporcional al tiempo de molienda, por ello el aducto NOR-SMX obtenido a partir de sus MPP tiene señales más intensas y claras que el aducto obtenido a partir de MPC. El análisis de los aductos obtenidos se realiza tomando como referencia los resultados obtenidos a partir de $NOR_{LAG-ACN}$.

7.7.1.2. Análisis del Polimorfismo de CIP

En la **Tabla 7.2** se muestran los datos del análisis térmico de CIP comercial (CIP_{MPC}) y CIP obtenido por LAG con ACN por 30 min ($CIP_{LAG-ACN}$), al igual que los datos bibliográficos de los diferentes tipos de CIP descritos hasta el momento.

Tabla 7.2. Temperatura de pico y de inicio extrapolada de: CIP_{MPC} y $CIP_{LAG-ACN}$ y datos bibliográficos.

	FUSIÓN		Bibliografía
	T_p (°C)	T_{ie} (°C)	
CIP	270,08		Li et al., 2006
CIP Hidrato	269,9		Li et al., 2006
CIP_{MPC}	268,13	266,69	
$CIP_{LAG-ACN}$	268,5	267,91	

T_p : Temperatura de pico, T_{ie} : Temperatura de inicio extrapolada

En la **Figura 7.15** se muestran los termogramas DSC y TG de CIP_{MPC} y $CIP_{LAG-ACN}$. El termograma de CIP_{MPC} muestra un pico endotérmico a 266,69°C correspondiente al PF. El TG no muestra pérdida de masa desde la temperatura ambiente hasta los 270 °C, lo que demuestra que este producto no es una forma solvatada ni hidratada de CIP. El termograma de $CIP_{LAG-ACN}$, exhibe resultados similares que CIP_{MPC} , excepto que, alrededor de 80 °C presenta una endoterma asociada a la presencia de agua de adsorción.

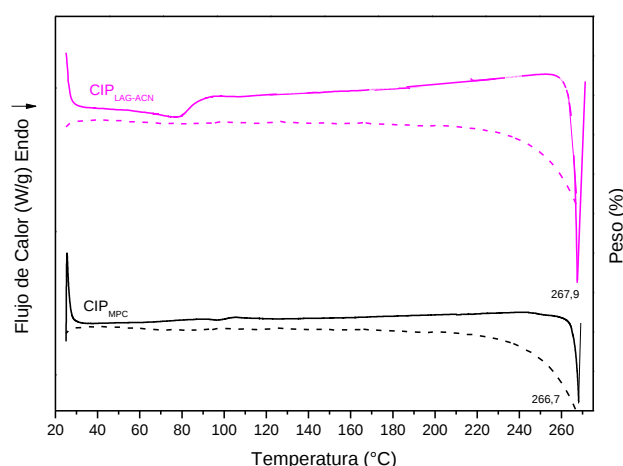


Figura 7.15. Curvas DSC y TG ($\beta = 10$ °C/min, flujo de $N_2 = 50$ mL/min) de: CIP_{MPC} y $CIP_{LAG-ACN}$.

Los espectros FT-IR de CIP_{MPC} y $CIP_{LAG-ACN}$ son muy similares (**Fig. 7.16**). Se muestra un pico distintivo entre 3600 y 3450 cm^{-1} , que se atribuye a la vibración de estiramiento de los grupos OH y al enlace intermolecular de puente de hidrógeno. Otra banda ubicada entre 3000 y 2900 cm^{-1} corresponde a los estiramientos C-H de alquenos y aromáticos. Las quinolonas tienen un pico característico a 1615 cm^{-1} que corresponde C=O de la 4-cetona carbonilo. El grupo C-F exhibe un pico de absorción fuerte en 1030 cm^{-1} aproximadamente. Las señales ubicadas a 1580 y 1372 cm^{-1} , corresponden a las vibraciones asimétricas y simétricas del ion carboxilato (COO^-),

respectivamente. Las vibraciones de estiramiento de NH_2^+ presentaron absorciones a $2400\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$. Las dos muestras contienen una pequeña cantidad de CIP neutro, ya que se puede ver un pequeño pico en el espectro correspondiente al estiramiento del grupo $\text{C}=\text{O}$ del ácido carboxílico, alrededor de 1720 cm^{-1} . La banda de 1490 cm^{-1} representa al estiramiento $\nu\text{C-O}$ y junto a la vibración de flexión del grupo O-H de 1280 cm^{-1} , indica la presencia del grupo ácido carboxílico.

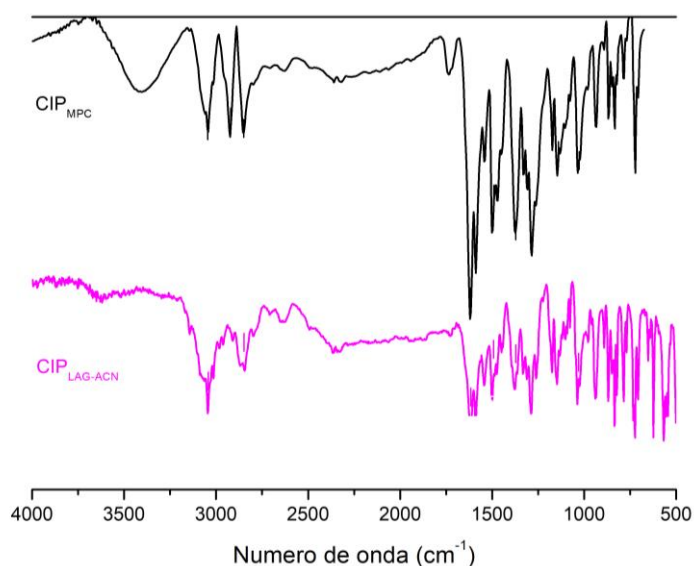


Figura 7.16. Espectros DRIFT de: CIP_{MPC} y $\text{CIP}_{\text{LAG-ACN}}$.

En las **Figura 7.17**, se ven los difractogramas de RXP de CIP_{MPC} y $\text{CIP}_{\text{LAG-ACN}}$ amasado durante 30 y 60 minutos, en los tres se visualizan las mismas señales. El pico más intenso en el patrón DRXP de CIP se encuentra en $25,3^\circ 2\theta$. Según Mesallati y col. (2016) este pico corresponde a la cara cristalina (1-2-1) y aparece en el DRXP de todas las muestras que se producen mediante molienda. Durante el estrés mecánico, como el generado por la molienda, los cristales se fracturan a lo largo de planos de deslizamiento cristalográficos específicos. La fractura de un cristal ocurrirá donde las interacciones entre planos adyacentes sean más débiles. (1-2-1) parece ser el plano de escisión más probable del zwitterión CIP y, por lo tanto, aparece como el pico más intenso en la DRXP del CIP molido (Mesallati et al., 2016).

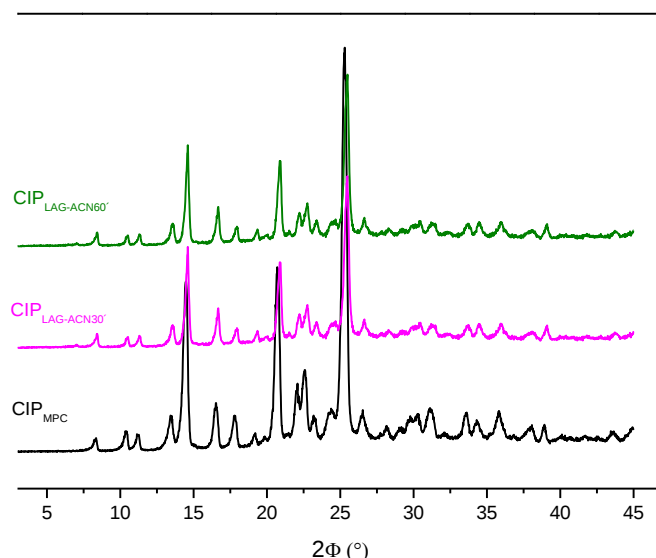


Figura 7.17. Patrones experimentales de DRXP de: CIP_{MPC} , $CIP_{LAG-ACN30'}$, $CIP_{LAG-ACN60'}$.

Se pudo observar que, al procesar por LAG con ACN (a diferentes tiempos), no hay cambios en el difractograma de RXP ni en el espectro FT-IR y sus puntos y TF son similares, por lo tanto, se concluye que corresponden al mismo material, no hay cambio de polimorfo al procesar la muestra.

Se verificó, además, que tanto CIP_{MPC} como $CIP_{LAG-ACN}$ corresponden a **CIP anhidra** ya que no se observa pérdida de masa en el TG alrededor de 100°C. Li y col. (2006), compararon CIP anhidro con sus hidratos, demostrando diferencias significativas en DRXP. Según Li y col. (2007) el hidrato tiene picos característicos a 5–7° 2θ mientras que la sustancia anhidra tiene picos característicos de gran intensidad alrededor de 14° 2θ. Por otra parte, se sabe que CIP anhidro existe en dos formas cristalinas: neutra o zwitteriónica (Mesalatti, 2016). Comparando el difractograma obtenido con el publicado por Mesalatti y col. (2016) el difractograma coincide con el de CIP zwitteriónica anhidra. Se puede concluir que **CIP_{MPC} y $CIP_{LAG-ACN}$ corresponde a CIP anhidra zwitteriónica con trazas de CIP anhidra neutra**, como se observó previamente en la Fig. 7.16.

7.7.1.3. Análisis del polimorfismo de SNA

En la **Tabla 7.3** se muestran los datos del análisis térmico de SNA comercial (SNA_{MPC}) y SNA amasado con ACN ($SNA_{LAG-ACN}$)

Tabla 7.3. Temperatura de pico, Temperatura de inicio extrapolada y calor de fusión de SNA_{MPC} y $SNA_{LAG-ACN}$ y datos bibliográficos de diferentes polimorfos.

	FUSIÓN			TRANSICIÓN	Bibliografía
	T_p (°C)	T_{ie} (°C)	Calor de Fusión (J/g)	T_{ie} (°C)	
SNA-α	162,8		126	108	Toscani, 2005
SNA-β	162,3		121	131-141	Ehiwe, 2016
SNA-γ	162,4		146		Ehiwe, 2016
SNA-δ	166			108	Lin, 1970
SNA_{MPC}	165,14	164,36	146,9		
$SNA_{LAG-ACN}$	165,19	164,07	143,8	128,6	

T_p : Temperatura de pico, T_{ie} : Temperatura de inicio extrapolada

La SNA comercial tiene un pico endotérmico significativo con un máximo a 164,36°C que corresponde al PF y un ΔH_{FUS} 146,9 J/g, similar al de SNA- γ . La $SNA_{LAG-ACN}$ tiene un pico de fusión a 164,07 °C y una endoterma de muy baja intensidad a 128,6 con un ΔH_{FUS} 143,8 J/g, este pico es atribuible a la transformación polimórfica $\gamma \rightarrow \beta$ (**Fig. 7.18**). Lin y col. (1970) revelaron que las formas α , β y δ se transforman en la forma γ antes de fundirse. La forma γ , por lo tanto, es el único polimorfo que se funde sin sufrir una transformación polimórfica. Es por ello que se espera que las cuatro formas muestren el mismo calor de fusión y T_{ie} experimental. En el TG se observa pérdida de peso luego de la fusión que corresponde a la descomposición del IFA.

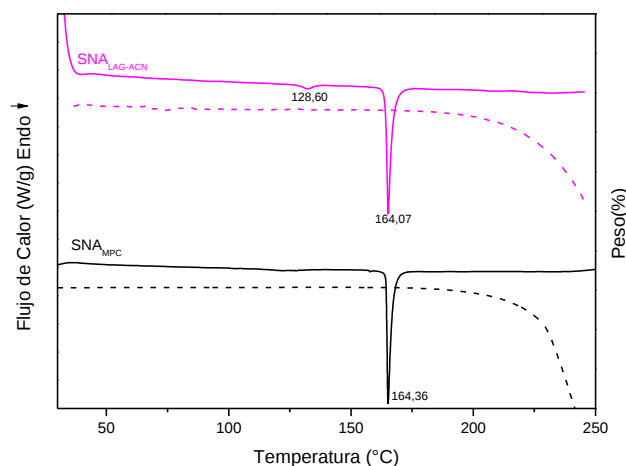


Figura 7.18. Curvas DSC y TG ($\beta = 10$ °C/min, flujo de $N_2 = 50$ mL/min) de: SNA_{MPC} y $SNA_{LAG-ACN}$.

Según Lin y col. (1970), las diferencias espectrales entre las formas polimórficas son comparativamente pocas siendo los espectros de FT-IR muy similares. Las únicas diferencias se observan en las regiones de estiramiento $-NH_2$.

En la **Fig. 7.19** se observan tres bandas nítidas de intensidad media a 3475, 3371 y 3267 cm^{-1} en el espectro, que es el resultado de las vibraciones asimétricas de NH_2 de la anilina y el NH_2 del grupo sulfonamida.

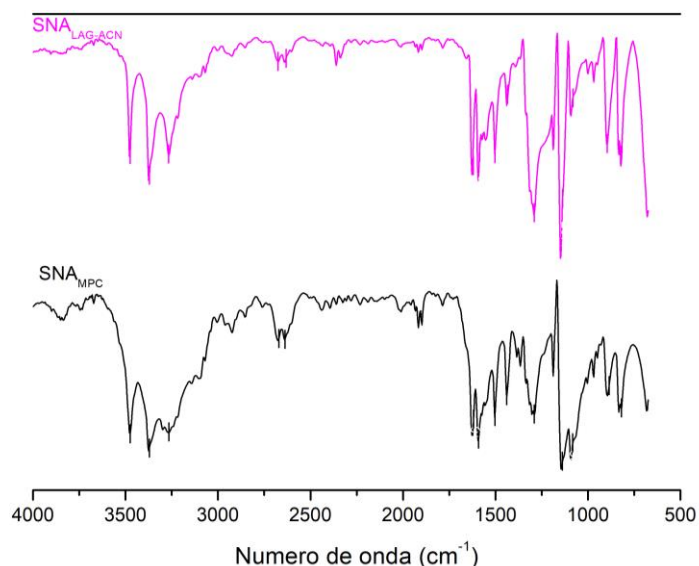


Figura 7.19. Espectros DRIFT de: SNA_{MPC} y $\text{SNA}_{\text{LAG-ACN}}$.

En el espectro se observa la banda de vibración de deformación de NH a 1620 cm^{-1} . La banda de vibración del SO_2 está a 1138 cm^{-1} . Además, hay diferentes bandas de intensidad de enlaces C=C del benceno a 1591 y 1503 cm^{-1} . Debido a la disustitución 1,4 en el anillo aromático, la vibración de deformación fuera del plano del enlace C–H se produce como una banda a 819-824 cm^{-1} .

En la **Figura 7.20** se muestran los difractogramas de RXP de SNA_{MPC} y $\text{SNA}_{\text{LAG-ACN}}$ a diferentes tiempos de molienda (30 y 60 minutos).

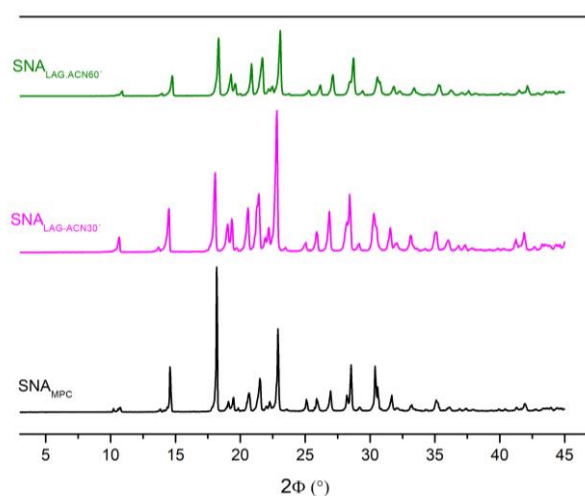


Figura 7.20. Patrones experimentales de DRXP de: SNA_{MPC} y $\text{SNA}_{\text{LAG-ACN}}$.

El estudio del polimorfismo de la SNA es complejo por la gran cantidad de posibles sitios de unión de tipo puente hidrógeno que puede establecer la molécula y por el hecho de que en algunas formas la celda unitaria está formada por ocho moléculas y en otras, por cuatro (Lin et al., 1970). **Hay evidencia suficiente para afirmar que la SNA_{MPC} trabajada es SNA- γ .** El difractograma coincide con el publicado por Toscani y col. (2005). Con base en la comparación de los espectros FT-IR obtenidos para SNA y diferentes formas polimórficas en el rango de longitud de onda de 4000–3000 cm⁻¹ y 700–400 cm⁻¹ se puede concluir que la **SNA procesada por LAG con ACN corresponde a la forma β -polimórfica.**

7.7.1.4. Análisis del polimorfismo de SMX

En la **Tabla 7.4** se muestran los datos del análisis térmico de y SMX_{LAG-ACN}, así como también datos bibliográficos de los diferentes polimorfos encontrados hasta el momento.

Tabla 7.4. Temperatura de pico, Temperatura de inicio extrapolada de SMX_{MPC} (2015 y 2019) y SMX_{LAG-ACN} y datos bibliográficos.

	FUSIÓN		TRANSICIÓN	Bibliografía
	T _p (°C)	T _{ie} (°C)	T _p (°C)	
SNA I	170			Gillory, 1985
SNA II	170		165,5	Gillory, 1985
SNA III	170		145-150	Price, 2005
SNA IV	170			Price, 2005
SNA Hemihidrato	170		90	Gillory, 1985
SMX _{MPC} -2015	169,65	168,58		
SMX _{MPC} -2019	170,02	168,12		
SMX _{LAG-ACN}	169,44	167,89		

T_p: Temperatura de pico, T_{ie}: Temperatura de inicio extrapolada

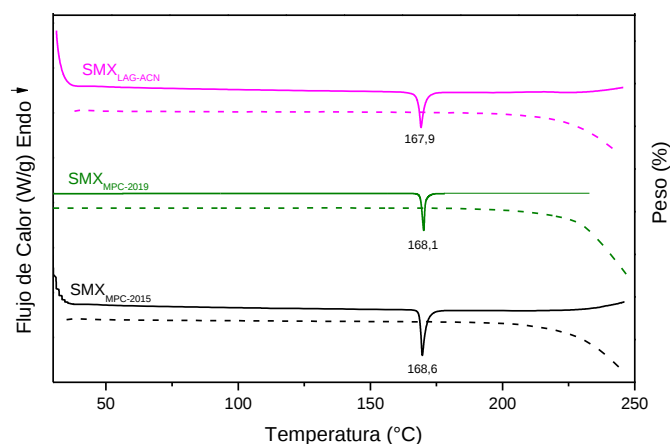


Figura 7.21. Curvas DSC y TG ($\beta = 10$ °C/min, flujo de N₂ = 50 mL/min) de: SMX_{MPC} (mismo lote diferentes años) y SMX_{LAG-ACN}.

En la **Fig. 7.21** se muestra que tanto SMX_{MPC} como $SMX_{LAG-ACN}$ son anhidras. Todas las formas SMX tienen un PF similar y sin observarse transiciones antes o después de la fusión.

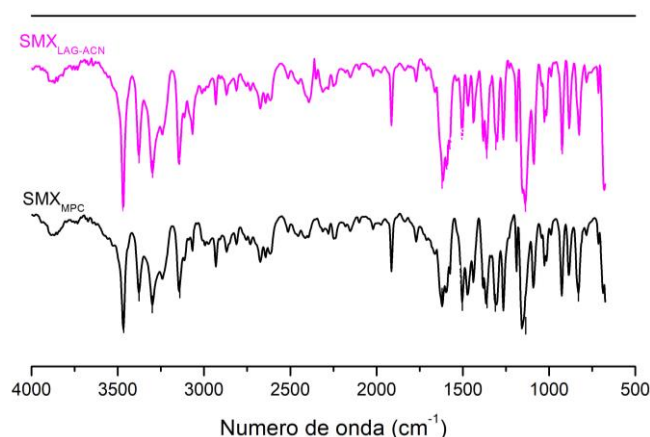


Figura 7.22. Espectros DRIFT de SMX_{MPC} y $SMX_{LAG-ACN}$.

Los espectros FT-IR de SMX (**Fig. 7.22**) tienen la característica de poseer cuatro bandas nítidas de gran intensidad a 3465 y 3371 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas pertenecientes al grupo $-NH_2$, a 3295 cm^{-1} presenta la banda característica del grupo $-NH$ y a 3140 cm^{-1} la del grupo $-CH$. Alrededor de 1600 cm^{-1} se muestra una banda que integra tres picos, 1620 , 1590 y 1570 cm^{-1} , atribuibles a la vibración de flexión $N-H$ y a la combinación del grupo $-NH_2$ y del grupo $-CN$ del anillo isoxazol. A 1499 cm^{-1} se observa la banda del $-C-C$ del anillo benceno, a 1361 cm^{-1} la del anillo isoxazol, a 1310 y 1142 cm^{-1} las vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas de $-SO_2^-$, a 929 cm^{-1} las vibraciones de estiramiento $-SN$, a 887 cm^{-1} la banda de $-CH$ del anillo isoxazol y a 820 cm^{-1} la banda de $-CH$ del anillo benceno.

En la **Figura 7.23**, se pueden ver los difractogramas de SMX_{MPC} y $SMX_{LAG-ACN}$.

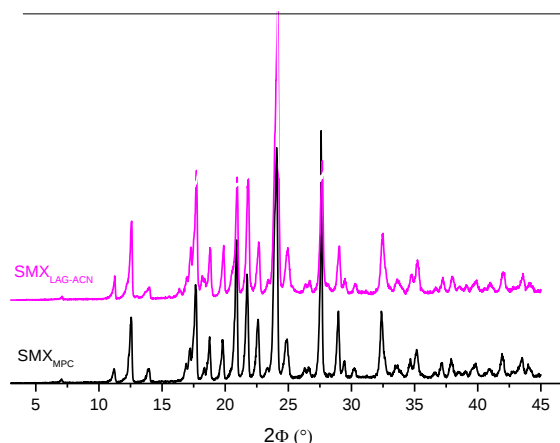


Figura 7.23. Patrones experimentales de DRXP de: SMX_{MPC} , $SMX_{LAG-ACN}$.

Se deduce que **SMX_{MPC}** no cambia de polimorfo al ser procesado con ACN. Según el PF descrito por Byrn (1995), y al observarse que en el termograma no hay transiciones previas a la fusión, se podría presumir que SMX sea la forma I o IV. Comparando el espectro FT-IR publicado por Yang (1972) y los difractogramas de RXP de Price (2005) con el obtenido en este trabajo, se deduce que **SMX_{MPC}** es el polimorfo forma I, por lo tanto, **SMX_{LAG-ACN}** también es polimorfo forma I.

7.7.2. ANÁLISIS DE LOS SÓLIDOS MULTICOMPONENTES OBTENIDOS

Se utilizaron diferentes técnicas, anteriormente mencionadas, para la obtención de aductos. Para combinaciones binarias equimoleculares de FQ-SA se emplearon diversas técnicas:

- * Evaporación lenta de solvente (solución de NaOH y solución de DMSO).
- * Difusión de solvente (AcOH).
- * Molienda en seco.
- * LAG (ACN y EtOH).
- * Para combinaciones binarias equimoleculares de FQ-GRAS o SA-GRAS se emplearon diversas técnicas:
 - * LAG (ACN)
 - * Preparación de una solución saturada y disminución lenta de la temperatura con agregado de cosolvente.
 - * Difusión de solvente (AcOH).

Se probaron combinaciones ternarias de FQ-SA-GRAS. Se emplearon las siguientes técnicas, dado que existen referencias que indican que este tipo de combinaciones puede ser beneficioso (Boycov et al., 2024; Qi et al., 2024):

- * Difusión de solvente.
- * Evaporación lenta de solvente (MeOH y MeOH:agua 1:1).

En la **Fig. 7.24** se enumeran las combinaciones que demostraron resultados que indicarían la posible formación de un aducto. Las muestras obtenidas se identificaron con las siglas IFA y COF, separadas por un guión, y se utilizará una abreviatura del procedimiento de obtención seguido del solvente utilizado, que se indicará como IFA-IFA_{PROCEDIMIENTO*SOLVENTE} o IFA-COF_{PROCEDIMIENTO*SOLVENTE}.

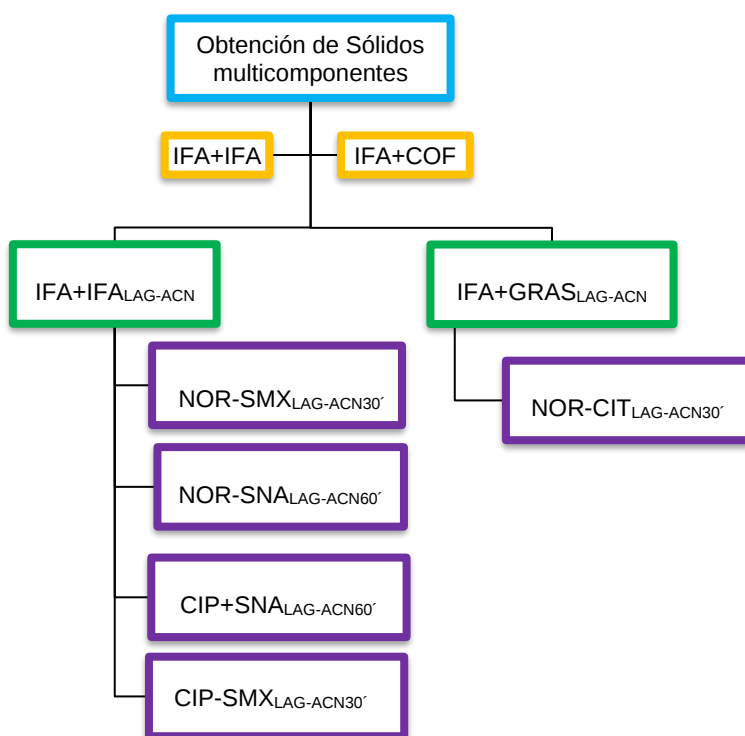


Figura 7.24. Sólidos multicomponentes obtenidos con resultados promisorios.

7.7.2.1. Molienda asistida por solvente

Se procedió a comparar los resultados obtenidos por AT (TG-DSC), DRIFT y DRXP de los IFA o COF, con las MF de IFA+IFA o IFA+COF y con los sólidos multicomponentes IFA-IFA o IFA-COF. Todas estas muestras fueron obtenidas por el método de LAG, empleando ACN.

NOR-SMX_{LAG-ACN}

En la **Tabla 7.5** y en la **Fig. 7.25** se presentan los resultados del análisis térmico de NOR_{LAG-ACN}, SMX_{LAG-ACN}, NOR+SMX_{MF} y del aducto NOR-SMX_{LAG-ACN}.

Tabla 7.5. Temperatura Fusión, Temperatura de inicio extrapolada y calor de fusión de: NOR_{LAG-ACN}, SMX_{LAG-ACN}, NOR+SMX_{MF} y NOR-SMX_{LAG-ACN}.

	TF (°C)	T _{ie} (°C)	Calor de Fusión (J/g)
NOR _{LAG-ACN}	202,7-216,5	215,21	78,62
SMX _{LAG-ACN}	164,4-168,7	167,89	125,9
NOR+SMX _{MF}		84,1/ 112,8/158,5/ 186,7	
NOR-SMX _{LAG-ACN}	176,0-182,1	179,57	116,3

TF: Temperatura de Fusión, T_{ie}: Temperatura de inicio extrapolada

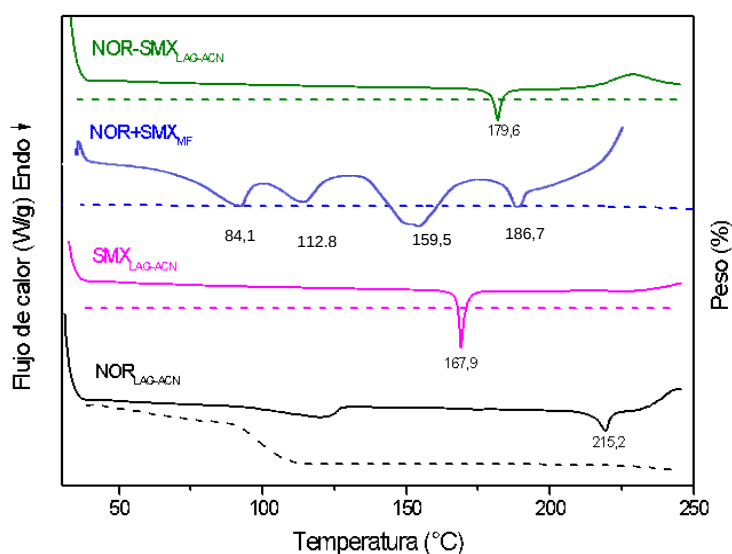


Figura 7.25. Curvas DSC y TG ($\beta = 10$ °C/min, flujo de N₂= 50 mL/min) de: NOR_{LAG-ACN}, SMX_{LAG-ACN}, NOR+SMX_{MF} y NOR-SMX_{LAG-ACN}.

NOR-SMX_{LAG-ACN} presentó una endoterma aguda a 179,6 °C, que no presentó pérdida de masa según se observa en la curva TG correspondiente. El PF es intermedio al de los IFA, NOR_{LAG-ACN} (221,1 °C) y SMX_{LAG-ACN} (167,9°C). Este fenómeno es muy común en los cocrystal estequiométricos 1:1 (Vemuri et al., 2021). Según el estudio de Perlovich y col. (2015), el 55,3 % de los cocrystal exhiben un PF intermedio, el 28,9 % de los cocrystal presenta un PF más bajo y el 14,5 % exhiben un PF más alto que los materiales de partida. El pico endotérmico de fusión intenso y agudo indicaría que se ha creado un nuevo sólido multicomponente o derivado no covalente (Prashar et al., 2023). Por otro lado, la curva DSC de NOR+SMX_{MF} mostró

cuatro endotermas amplias a 84,06°; 112,8°; 159,5°; 186,7 °C, que no experimentaron pérdidas de masa relacionadas con la curva TG correspondiente. Este comportamiento térmico, definido por la existencia de varias endotermas de fusión, también ha sido observado en algunas MF con la capacidad de generar cocristales (Yamashita et al., 2013; Yamashita et al., 2014). Los datos DSC señalan que NOR y SMX interactúan en el estado sólido formando un nuevo sistema multicomponente.

Se registraron los patrones de DRXP de $\text{NOR}_{\text{LAG-ACN}}$, $\text{SMX}_{\text{LAG-ACN}}$, $\text{NOR}+\text{SMX}_{\text{MF}}$ y $\text{NOR-SMX}_{\text{LAG-ACN}}$ con fines comparativos (**Fig. 7.26**). El patrón de DRXP del aducto $\text{NOR-SMX}_{\text{LAG-ACN}}$ no es una suma de las señales de los materiales de partida y difiere también del difractograma de $\text{NOR}+\text{SMX}_{\text{MF}}$. En $\text{NOR-SMX}_{\text{LAG-ACN}}$, están ausentes las señales a 8°; 13,19°; 23,20° y 32,29° 2 θ de NOR; 22,47°; 32,35° y 41,83° 2 θ de SMX y aparecen nuevas señales a 14,27°; 35,81° y 39,97° 2 θ . Estas diferencias son indicativas de interacciones entre las moléculas de NOR y SMX. Por otra parte, se observa que $\text{NOR-SMX}_{\text{LAG-ACN}60'}$ es más cristalino que $\text{NOR-SMX}_{\text{LAG-ACN}30'}$. Esto confirma que, a mayor tiempo de molienda con solvente, mayor cristalinidad presenta el nuevo sólido multicomponente.

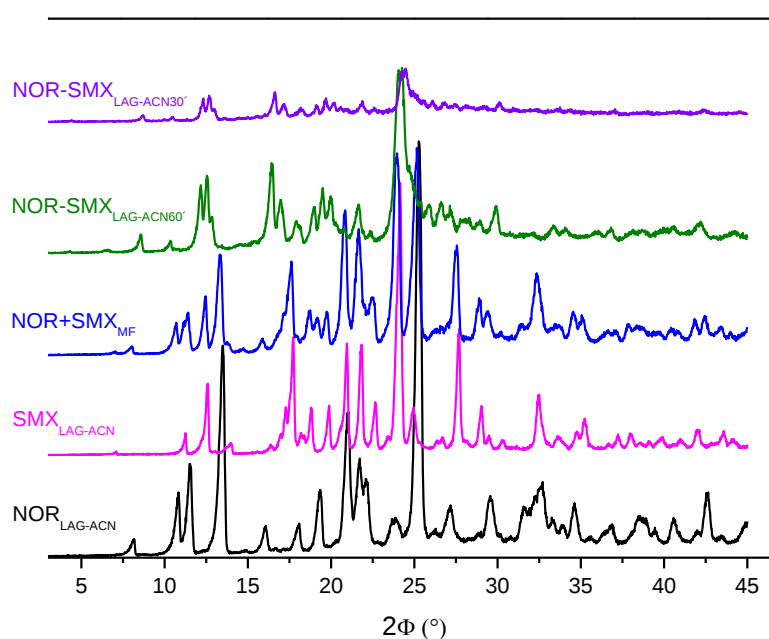


Figura 7.26. Patrones experimentales de DRXP de: $\text{NOR}_{\text{LAG-ACN}}$, $\text{SMX}_{\text{LAG-ACN}}$, $\text{NOR}+\text{SMX}_{\text{MF}}$, y $\text{NOR-SMX}_{\text{LAG-ACN}}$ 60 y 30 min.

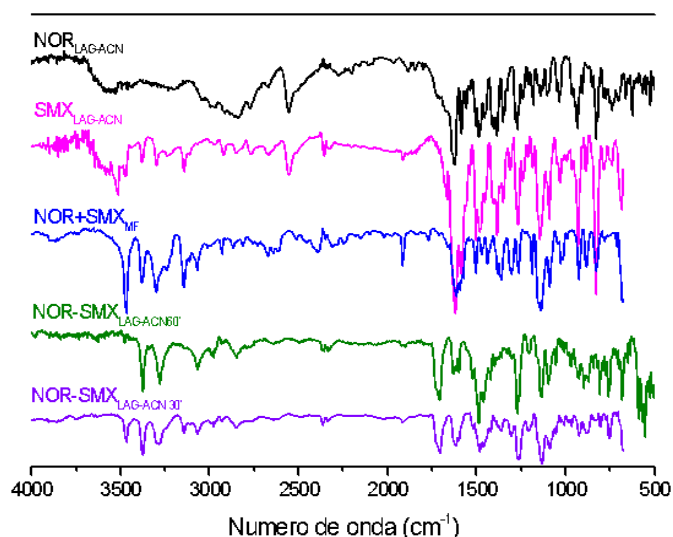


Figura 7.27. Espectros DRIFT de $\text{NOR}_{\text{LAG-ACN}}$, $\text{SMX}_{\text{LAG-ACN}}$, $\text{NOR+SMX}_{\text{MF}}$, y $\text{NOR-SMX}_{\text{LAG-ACN}}$ 60 y 30 min.

La presencia de un pico endotérmico único en el DSC y reflexiones singulares en DRXP son indicios de la creación de un nuevo sólido multicomponente. Se empleó el análisis espectral DRIFT (**Fig. 7.27**) y ^1H -RMN, para confirmar los supuestos.

Las diferencias más significativas observadas en los espectros de DRIFT de $\text{SMX-NOR}_{\text{LAG-ACN30'}}$ y $\text{SMX-NOR}_{\text{LAG-ACN60'}}$ respecto a $\text{NOR}_{\text{LAG-ACN}}$ y a $\text{SMX}_{\text{LAG-ACN}}$ son las siguientes: en los sólidos $\text{NOR-SMX}_{\text{LAG-ACN}}$ aparece una señal intensa a 1705 cm^{-1} atribuible a la formación del grupo ácido carboxílico de $\text{NOR}_{\text{LAG-ACN}}$ (que es zwitteriónica en ausencia de $\text{SXM}_{\text{LAG-ACN}}$), desaparece la señal a 1590 cm^{-1} (de COO^-) y también la ubicada a 2550 cm^{-1} (correspondiente al NH_2^+), respecto al espectro de $\text{NOR}_{\text{LAG-ACN}}$. Desaparece la señal ubicada en 3461 cm^{-1} en $\text{SXM}_{\text{LAG-ACN}}$, correspondiente a la elongación NH_2 . No se observan diferencias significativas entre los espectros de $\text{SXM}_{\text{LAG-ACN}}$ y $\text{NOR-SMX}_{\text{LAG-ACN}}$ en las señales correspondientes al grupo SO_2 (1313 - 1303 y 1155 - 1143 cm^{-1}). La información brindada por FT-IR suma evidencias respecto a la existencia de un nuevo sólido multicomponente formado por interacciones no covalentes entre NOR y SMX. Además, en virtud de que desaparecen las señales características de las formas ionizadas de NOR y SMX, se presume que interaccionan por uniones de tipo puente de hidrógeno y Van der Wals formando un cocrystal.

El espectro de ^1H -RMN presentado en la **Fig. 7.28** muestran que todos los picos de resonancia se pueden asignar a los protones específicos de las moléculas NOR y SMX. Por otra parte, se confirma que la estequiometría del sólido multicomponente es 1:1.

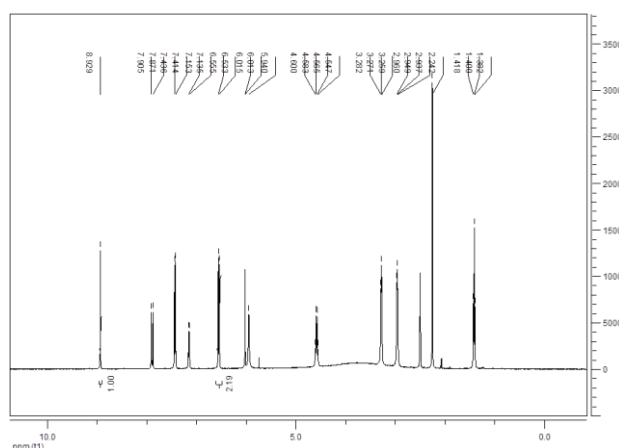


Figura 7.28. ^1H -RMN de $\text{NOR-SMX}_{\text{LAG-ACN}}$ (en DMSO-d_6).

El grupo funcional ácido carboxílico (COOH) de NOR tiene un valor de pK_a de 6,34 y el pK_a del básico (NH) es 8,75. SMX presenta un valor de pK_a de 6,16 para el grupo SO_2H . La regla ΔpK_a que se describe en la **Sección 1.3.4.5** establece a $\Delta\text{pK}_a > 4$ se forman sales, si el $\Delta\text{pK}_a < -1$ predomina la formación de cocristales y si ΔpK_a se encuentra entre -1 y 4 es el régimen intermedio. Según esta regla NOR forma sales/cocristales de sal con COF ácidos y básicos y cocristales con COF neutros no ionizables (Gunnam et al., 2023). En este caso el ΔpK_a entre el grupo SO_2H de SMX y el grupo NH de NOR es de 2,59, es decir que este valor está comprendido en la zona gris de estados mixtos del continuo sal-cocrystal. Sin embargo, según los espectros DRIFT de $\text{NOR-SMX}_{\text{LAG-ACN}}$ se observa que predominan las especies no ionizadas en el sólido multicomponente, presumiendo la formación de un cocrystal.

En el estudio de DSC, la naturaleza del nuevo aducto está representada por la posición y la forma de los picos de fusión endotérmicos. Los picos endotérmicos agudos y estrechos presentados por el sólido multicomponente indican un alto grado de pureza y cristalinidad de los derivados no covalentes formados.

En el análisis DRXP, la aparición de los nuevos picos característicos en los cocristales indica la generación de una nueva fase. Los resultados de DRXP confirman la conversión de la naturaleza semicristalina del fármaco en una nueva forma cristalina débil, que aumenta su cristalinidad a medida que aumenta el tiempo de LAG.

$\text{NOR}_{\text{LAG-ACN}}$ predominaría en su forma zwitteriónica, al tratarse de NOR sesquihidrato, y en el sólido multicomponente estaría presente principalmente en forma neutra, probablemente formando puentes de hidrógeno entre los grupos C=O y OH con el átomo de H del grupo SO_2NH de SMX (**Fig. 7.29**).

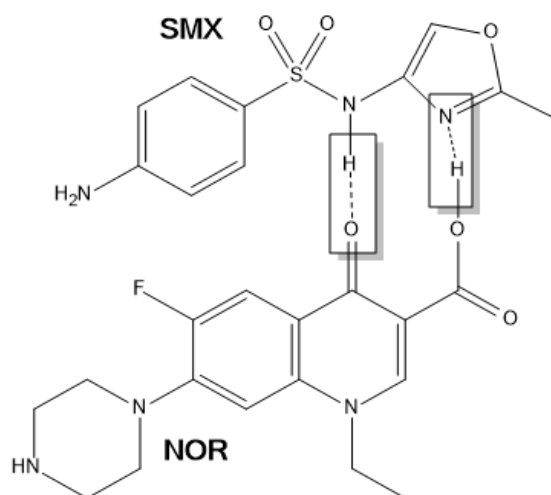


Figura 7.29. Posibles interacciones en el estado sólido entre $NOR-SMX_{LAG-ACN}$.

$NOR-SNA_{LAG-ACN}$

En la **Tabla 7.6** y en la **Fig. 7.30** se presentan los resultados del AT de los sólidos multicomponentes $NOR-SNA_{LAG-ACN30'}$ + $NOR-SNA_{LAG-ACN60'}$ y se comparan con los componentes individuales $NOR_{LAG-ACN}$ y $SNA_{LAG-ACN}$ y con la MF $NOR-SNA_{MF}$.

Tabla 7.6. Temperatura de Fusión, Temperatura de inicio extrapolada y calor de fusión de: $NOR_{LAG-ACN}$, $SNA_{LAG-ACN}$, $NOR-SNA_{MF}$ y $NOR-SNA_{LAG-ACN}$.

	TF (°C)	T _{ie} (°C)	Calor de Fusión (J/g)
$NOR_{LAG-ACN}$	202,7-216,5	215,21	78,62
$SNA_{LAG-ACN}$	164,4-165,7	164,07	146,0
$NOR-SNA_{MF}$		86,2/110,2/128,6/161,0/204,5	16,8/49,4/60,4
$NOR-SNA_{LAG-ACN60'}$	182,1-210,1	207,32	155,2
$NOR-SNA_{LAG-ACN30'}$		156,22/161,27/206,93/209,54	14,1/81,3

TF: Temperatura de Fusión, T_{ie}: Temperatura de inicio extrapolada

Como se muestra en la **Fig. 7.30**, los puntos de fusión de $NOR_{LAG-ACN}$ y $SNA_{LAG-ACN}$ son 215,2°C y 164,1°C, respectivamente. En el caso de la mezcla física, el DSC exhibió cinco endotermas y un pico exotérmico a continuación de la tercera endoterma. Las primeras tres endotermas presentaron valores de T_{ie} más bajos que las endotermas de fusión de $SNA_{LAG-ACN}$ y $NOR_{LAG-ACN}$ y no estuvieron acompañadas de pérdidas de masa en la curva TG respectiva, como es típico en procesos de fusión congruentes. En cambio, la Tp de la cuarta endoterma (161,0 °C) fue similar a T_{ie} de

SNA_{LAG-ACN}. Yamashita y col. (2013) notaron que algunas combinaciones binarias capaces de generar cocrystal, exhiben múltiples endotermas a temperaturas inferiores a las de fusión de los componentes puros, tal como se observa en la **Figura 7.30**.

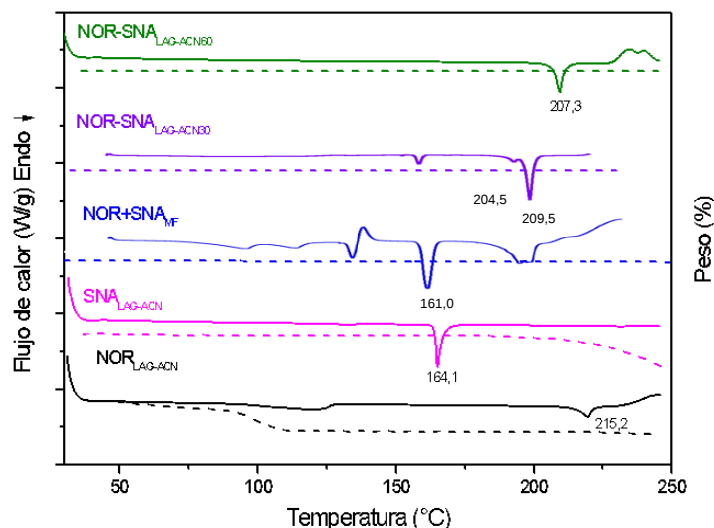


Figura 7.30. Curvas DSC y TG ($\beta = 10$ °C/min, flujo de N₂= 50 mL/min) de: NOR_{LAG-ACN}, SNA_{LAG-ACN}, NOR-SNA_{MF}, NOR-SNA_{LAG-ACN30} y NOR-SNA_{LAG-ACN60}.

Las endotermas que aparecen a temperaturas inferiores a las de fusión de NOR_{LAG-ACN} y SNA_{LAG-ACN}, se relacionan con las fusiones de un eutéctico metaestable, seguida de la fusión de un eutéctico estable. El tercer pico se relaciona con la fusión de un eutéctico y un cocrystal metaestable. El pico final endotérmico (205,5 °C) se relacionó con la fusión del cocrystal de mayor estabilidad, que se forma en la mezcla física como consecuencia del aumento de la temperatura. La curva DSC de NOR-SNA_{LAG-ACN30}, exhibió, entre 156 y 210 °C, dos endotermas que poseen un hombro endotérmico en su lado izquierdo. La endoterma a 161,3 °C coincide con la endoterma en NOR-SNA_{MF}, para fusión del eutéctico estable y el cocrystal. Esto cobra relevancia si se considera que en NOR-SNA_{LAG-ACN30}, se convierte de forma gradual en un aducto. Sin embargo, cuando se lleva a cabo la molienda durante un periodo de tiempo más prolongado (60 min), toda la materia prima se transforma en el DNC. Por esta razón, se genera un único pico endotérmico a 207,32°C bien definido para NOR-SNA_{LAG-ACN60}, correspondiente a la fusión. Posteriormente presenta dos picos exotérmicos.

El ATG demostró, para todas las muestras, que no hubo pérdida de masa antes de la descomposición, con excepción de NOR_{LAG-ACN}, que es NOR sesquihidrato, tal lo analizado en la **Sección 7.7.1.1**.

En la **Fig. 7.31**, se pueden apreciar los patrones de difracción de NOR-SNA_{LAG-ACN} a diferentes tiempos, comparados con sus materiales de partida y con la MF equimolecular. Cuando el tiempo de LAG con ACN es de 60 minutos, NOR-SNA se convierte en un aducto exhibiendo un difractograma diferente al de NOR+SNA_{MF} y al de NOR-SNA_{LAG-ACN30'}. Por otra parte, cuando el tiempo de molienda es de 30 minutos, NOR-SNA presenta un difractograma similar al de la mezcla física NOR+SNA_{MF}, con menor grado cristalinidad atribuible al proceso de amasado.

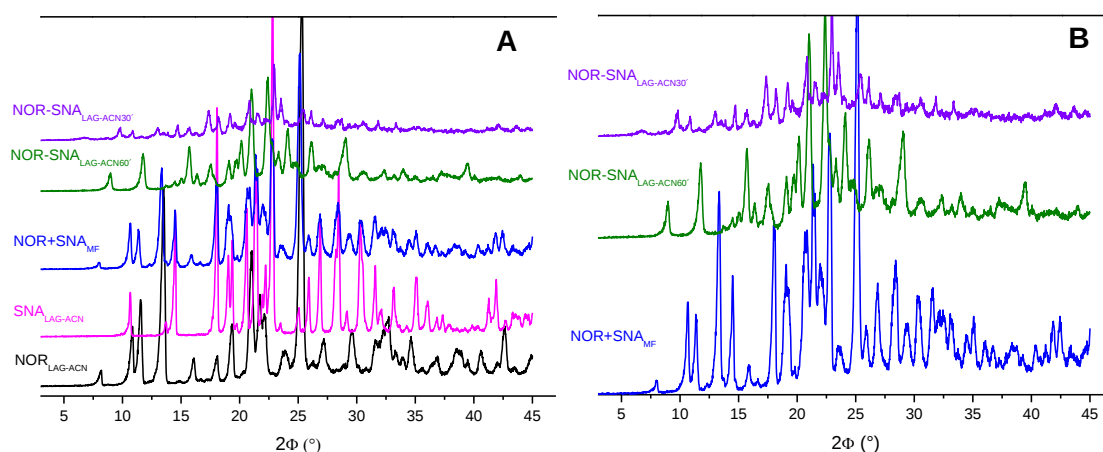


Figura 7.31. Patrones experimentales de DRXP de: **A.** NOR_{LAG-ACN}, SNA_{LAG-ACN}, NOR+SNA_{MF}, y NOR-SNA_{LAG-ACN} 60 y 30 min. **B.** Imagen ampliada de NOR+SNA_{MF}, y NOR-SNA_{LAG-ACN} 60 y 30 min.

Los espectros DRIFT de NOR-SNA_{LAG-ACN} 60 y 30 min, se exhiben en la Figura 7.32 junto con NOR_{LAG-ACN}, SNA_{LAG-ACN}, NOR+SNA_{MF}. Tal como se describió en la **sección 7.7.1.1** NOR_{LAG-ACN} se encuentra hidratada y predomina la especie zwitteriónica. SNA_{LAG-ACN} descrita en la **sección 7.7.1.3** se encuentra en forma no iónica. Del espectro DRIFT de NOR-SNA_{LAG-ACN} se deduce que NOR se convierte de la forma zwitteriónica a la forma aniónica dado que la señal de 2550 cm⁻¹ (NH₂⁺) desaparece y se mantiene la señal situada a 1620 cm⁻¹ (C=O). Por otra parte, respecto a SNA, se observa que la señal representativa NH₂ del sulfonilo (3265 cm⁻¹) desaparece y se atenúa significativamente la señal indicativa de la flexión fuera del plano en 687 cm⁻¹.

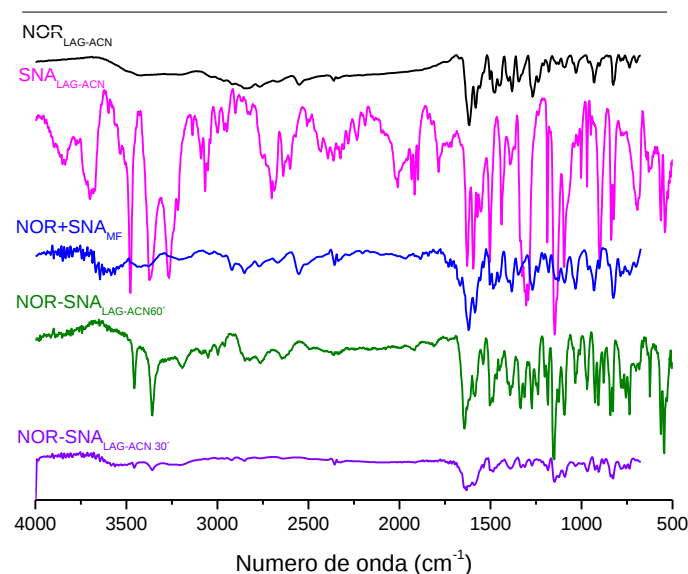


Figura 7.32. Espectros DRIFT de: $NOR_{LAG-ACN}$, $SNA_{LAG-ACN}$, $NOR+SNA_{MF}$, y $NOR-SNA_{LAG-ACN}$ 60 y 30 min.

En la **Figura 7.33**, los espectros de 1H -RMN demostraron que todas las señales de resonancia se pueden asignar a los protones de las moléculas de NOR y SNA. Esto corrobora que la estequiometría del sólido multicomponente es de 1:1.

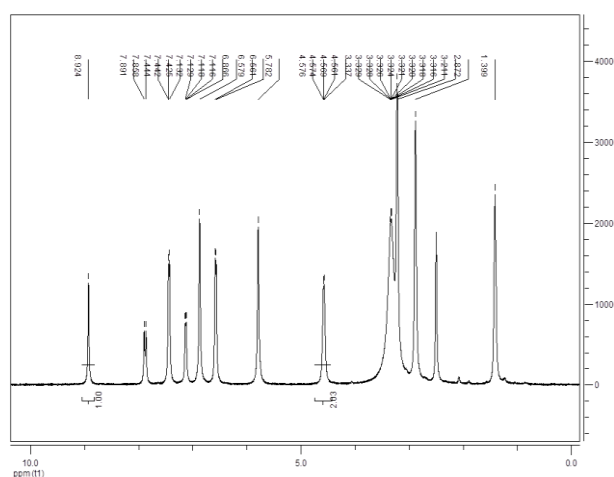


Figura 7.33. 1H -RMN de $NOR-SNA_{LAG-ACN}$ (en $DMSO-d_6$).

Según la regla ΔpK_a que se describe en la **Sección 1.3.4.5**, el ΔpK_a entre el grupo SO_2H de SNA y el grupo $COOH$ de NOR es de 4,26, esto está comprendido en la región de la formación de sales, sin embargo, los resultados obtenidos indican la formación de cocristales iónicos.

Se concluye que NOR-SNA obtenido por LAG con ACN durante 60 minutos es un nuevo aducto molecular que podría clasificarse en la categoría de cocrystal iónicos debido a que la interacción se produciría mediante el COO^- de NOR y el grupo NH_2 del sulfonilo de SNA (**Fig. 7.34**). Se observó que se necesita de un tiempo prolongado de molienda (60 minutos) para su formación, ya que con 30 minutos de molienda sólo se obtuvo la mezcla física.

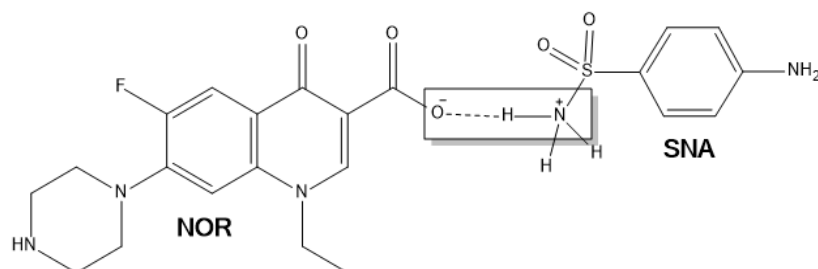


Figura 7.34. Posibles interacciones en el estado sólido entre NOR-SNA_{LAG-ACN}.

CIP-SMX_{LAG-ACN}

En la **Tabla 7.7** y en la **Fig. 7.35** se presentan los resultados del análisis térmico del aducto CIP-SMX_{LAG-ACN} y se comparan con los obtenidos para CIP_{LAG-ACN}, SMX_{LAG-ACN} y CIP+SMX_{MF}.

Tabla 7.7. Temperatura Fusión, Temperatura de inicio extrapolada de: CIP_{LAG-ACN}, SMX_{LAG-ACN}, CIP-SMX_{MF} y CIP-SMX_{LAG-ACN}.

	TF (°C)	T _{ie} (°C)
CIP _{LAG-ACN}	263,0-269,6	267,91
SMX _{LAG-ACN}	167,7-169,8	167,89
CIP+SMX _{MF}		154,1
CIP-SMX _{LAG-ACN}	141,9-147,5	147,03

TF: Temperatura de Fusión, T_{ie}: Temperatura de inicio extrapolada

En la **Figura 7.35** se muestra el comportamiento térmico de CIP_{LAG-ACN}, SMX_{LAG-ACN}. En el caso de la curva DSC para CIP+SMX_{MF} se observó un único pico endotérmico agudo a 154,1 °C que parecería estar asociado con la fusión eutéctica (Yamashita et al., 2013). CIP-SMX_{LAG-ACN} presentó un pequeño evento endotérmico en T_{ie}= 147,7 °C, que funde a una temperatura inferior al PF de los IFA. Según Gopi y col.

(2016) el PF más bajo puede deberse a interacciones electrostáticas, de enlaces de hidrógeno y de otros tipos más débiles. La disminución de la entalpía y el PF en comparación con los compuestos puros indica la formación de una estructura cristalina débil, menos estable (Gomes et al., 2023). La T_{ie} del pico endotérmico a 147,7°C, es seguida por un pico exotérmico. En un sistema binario capaz de formar cocristales por aumento de temperatura, se observará un pico endotérmico inmediatamente seguido de un pico exotérmico, esto sucede debido a que ambos componentes individuales se funden y se forman cocristales en el punto eutéctico metaestable (Yamashita et al., 2013). Dado que también el IFA de partida, $CIP_{LAG-ACN}$, posee un pico exotérmico pronunciado luego de su fusión, la interpretación definitiva de esta señal se hace dificultosa. En conjunto, estas observaciones indican que cuando se somete a un aumento de temperatura a una mezcla física, la formación de cocristales *in situ* se detecta como un pico exotérmico, como se predijo teóricamente a partir de los diagramas de fase binarios. El pico endotérmico a 147,7°C indica que CIP y SMX pueden formar un eutéctico. Según Nangia y col. (2022) la depresión en el PF es el único indicador de formación de una mezcla eutéctica, es por ello que la caracterización de los eutécticos es un verdadero desafío.

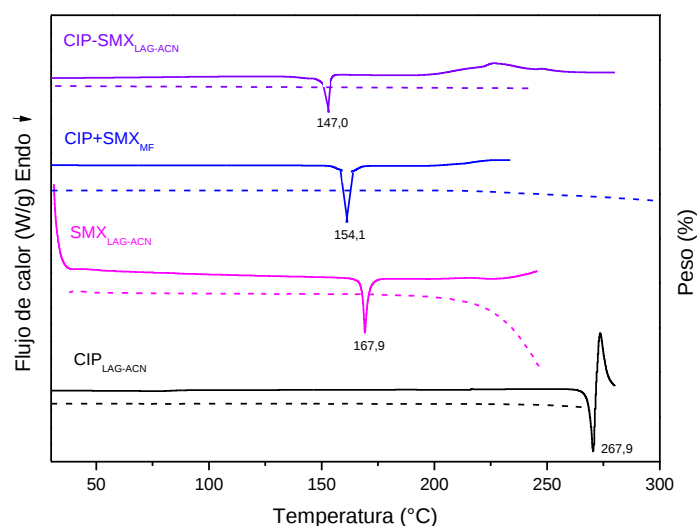


Figura 7.35. Curvas DSC y TG ($\beta = 10$ °C/min, flujo de $N_2 = 50$ mL/min) de: $CIP_{LAG-ACN}$, $SMX_{LAG-ACN}$, $CIP+SMX_{MF}$ y $CIP-SMX_{LAG-ACN}$.

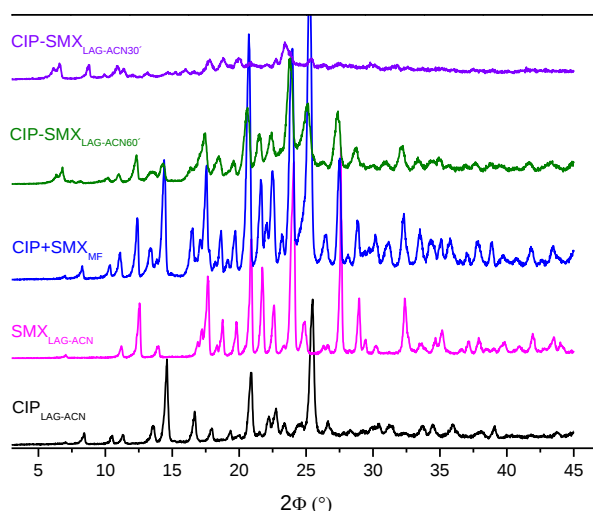


Figura 7.36. Patrones experimentales de DRXP de: $CIP_{LAG-ACN}$, $SMX_{LAG-ACN}$, $CIP+SMX_{MF}$ y $CIP-SMX_{LAG-ACN}$. 60' y 30'.

En comparación con CIP y SMX, los patrones de DRXP de $CIP-SMX_{LAG-ACN}$ mostraron picos cristalinos distintos, lo que indica la creación de una nueva forma sólida (**Fig. 7.36**). Se observa la desaparición de señales importantes de CIP y SMX tales como: 8,20°; 10,50°; 12,55°; 13,47°; 20,93°; 21,80°; 24,13°; 24,90°; 28,99°; 32,45°; 34,67°; 35,23°; 37,15° 2θ y la aparición de las siguientes señales: 6,01°; 6,51°; 8,67°; 10,77° y 15,77° 2θ . Se deduce que las moléculas de CIP y SMX interactuaron en el estado sólido y como consecuencia se observan cambios en la presencia, ubicaciones e intensidades de picos. El aducto $CIP-SMX_{LAG-ACN30'}$ es menos cristalino que el $CIP-SMX_{LAG-ACN60'}$. Esto demuestra que la cristalinidad del aducto aumenta con el tiempo de LAG.

Los espectros FT-IR se observan en la **Fig. 7.37**. $CIP_{LAG-ACN}$ se presenta en forma zwitteriónica (NH_2^+ 2800- 2850 cm^{-1} , COO^- 1585 cm^{-1} , $C=O$ 1620 cm^{-1} y señal de 1720 cm^{-1} ausente). En el sólido multicomponente disminuye la intensidad de la señal a 2800- 2850 cm^{-1} y se desdibuja y, por otra parte, se mantienen las señales correspondientes a COO^- 1585 cm^{-1} y $C=O$ 1620 cm^{-1} . Según estos resultados, CIP interactuaría con SMX mediante el grupo NH_2^+ . Se observa la aparición de una nueva señal simétrica a 1530-1560 cm^{-1} en el espectro del aducto. Se observa, además, que se atenúan en $CIP-SMX_{LAG-ACN}$ las señales correspondientes al grupo SO_2 del SMX (estiramiento asimétrico de SO_2 de SMX a 1313-1303 cm^{-1} y estiramiento simétrico de SO_2 del SMX a 1143 cm^{-1}).

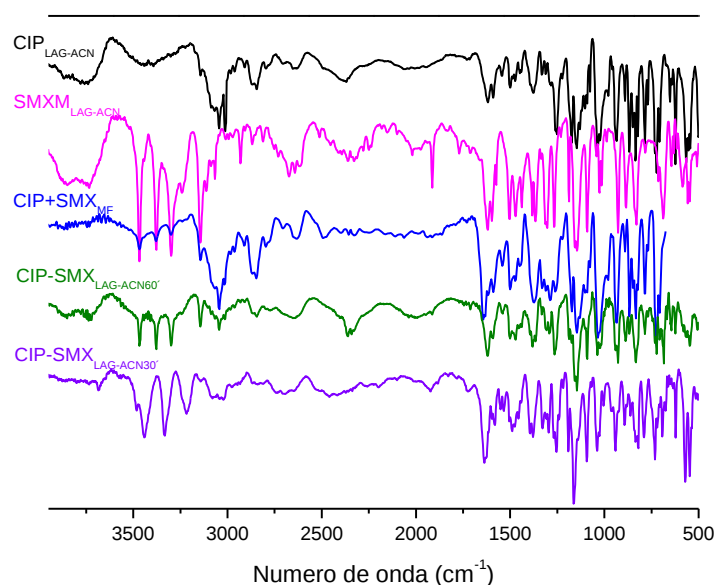


Figura 7.37. Espectros DRIFT de: $CIP_{LAG-ACN}$, $SMX_{LAG-ACN}$, $CIP+SMX_{MF}$ y $CIP-SMX_{LAG-ACN}$. 60' y 30'.

Es importante señalar que, a pesar de que el pico de fusión se produjo a una temperatura inferior a la de sus materiales de partida, este pico no simboliza la fusión de una mezcla eutéctica (la cual también tendría un pico de fusión a una temperatura inferior). Esto se debe a que los datos DRXP y DRIFT señalaron que $CIP-SMX_{LAG-ACN}$ representaba una nueva fase cristalina. Es importante destacar que más del 50% de los sólidos multicomponentes exhiben un PF inferior al de la materia prima (Saganowska et al., 2018), lo que podría ser el caso de $CIP-SMX_{LAG-ACN}$, con una relación estequiométrica 1:1. Según los datos obtenidos de DRIFT la interacción ocurriría entre el grupo SO_2 de SMX y el NH_2^+ de CIP (**Fig. 7.38**). De acuerdo con la regla del ΔpK_a que se describe en la **sección 1.3.4.5**, el ΔpK_a entre el grupo SO_2H de SMX y el grupo NH_2^+ de CIP es de 2,6, encontrándose en la zona gris, pudiendo tratarse de un cocrystal o sal molecular.

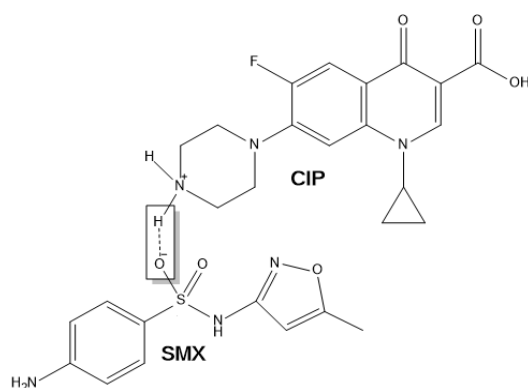


Figura 7.38. Posibles interacciones en el estado sólido entre $CIP-SMX_{LAG-ACN}$.

CIP-SNA_{LAG-ACN}

En la **Tabla 7.8** y en la **Fig. 7.39** se presentan los resultados del análisis térmico del aducto CIP-SNA_{LAG-ACN30'} y se comparan con los obtenidos para CIP_{LAG-ACN}, SNA_{LAG-ACN} y CIP+SNA_{MF}.

Tabla 7.8. Temperatura de Fusión, Temperatura de inicio extrapolada de: CIP_{LAG-ACN}, SNA_{LAG-ACN}, CIP-SNA_{MF} y CIP-SNA_{LAG-ACN30'}

	TF (°C)	T _{ie} (°C)
CIP_{LAG-ACN}		267,91
SNA_{LAG-ACN}	263,0-269,6	164,7
CIP+SNA_{MF}	160,7-166,9	159,65
CIP-SNA_{LAG-ACN30'}		157,57

TF: Temperatura de Fusión, T_{ie}: Temperatura de inicio extrapolada

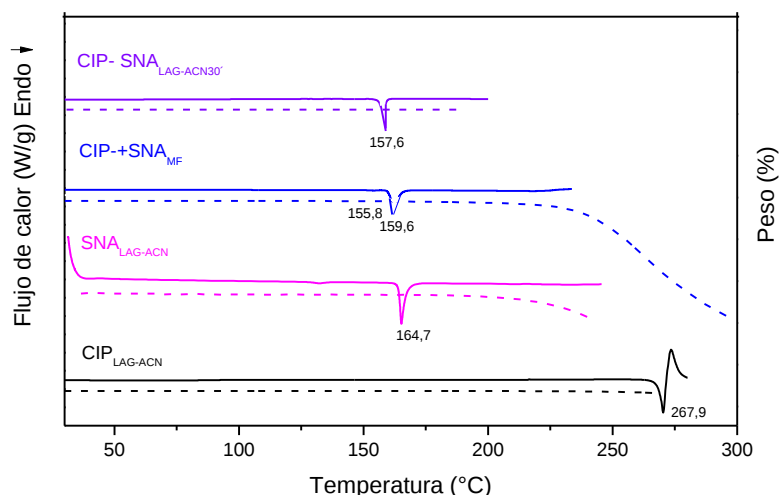


Figura 7.39. Curvas DSC y TG ($\beta = 10$ °C/min, flujo de N₂= 50 mL/min) de: CIP_{LAG-ACN}, SNA_{LAG-ACN}, CIP+SNA_{MF} y CIP-SNA_{LAG-ACN30'}.

En la **Fig. 7.39** el PF de CIP-SNA_{LAG-ACN30'} (157,6 °C) es inferior a los puntos de fusión de CIP_{LAG-ACN} y SNA_{LAG-ACN}. Se observa una curva DSC similar para CIP-SNA_{MF} con la diferencia que el pico endotérmico (T_{ie}= 159,6 °C) y posee un hombro endotérmico en su lado izquierdo (T_{ie}=155,6° C). Este resultado podría indicar la formación de un sistema multicomponente con PF inferior al de la materia prima. Sin embargo, el difractograma correspondiente a CIP-SNA_{LAG-ACN30'} (**Figura 7.40**) es igual a la suma de las señales de CIP_{LAG-ACN} y SNA_{LAG-ACN}. En virtud de que los puntos de fusión del aducto y de la mezcla física son diferentes al material de partida, el producto final obtenido podría ser una mezcla física o un eutéctico, pero no se trataría de un cocrystal o una sal molecular.

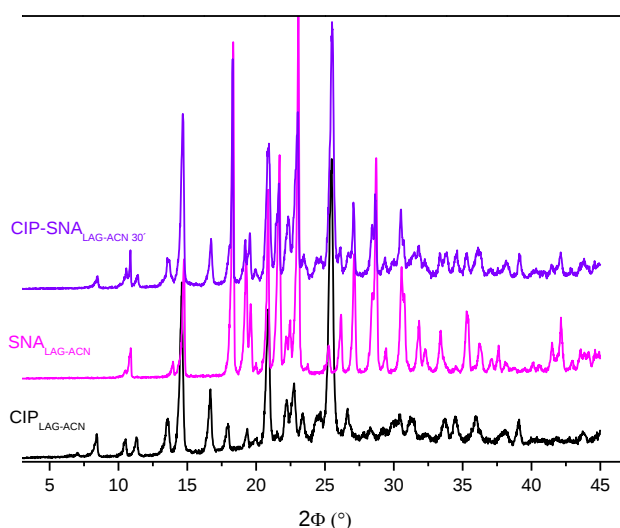


Figura 7.40. Patrones experimentales de DRXP de: $CIP_{LAG-ACN}$, $SNA_{LAG-ACN}$, $CIP-SMX_{LAG-ACN}$ 60' y 30'.

En la **Fig 7.41** se observan los espectros DRIFT de $CIP-SMX_{LAG-ACN30'}$, $CIP_{LAG-ACN}$ y $SNA_{LAG-ACN}$ en los que se corrobora la ausencia de interacción molecular, dado que el espectro de $CIP-SMX_{LAG-ACN30'}$ contiene todas las señales presentes en el de $CIP_{LAG-ACN}$ y $SNA_{LAG-ACN}$.

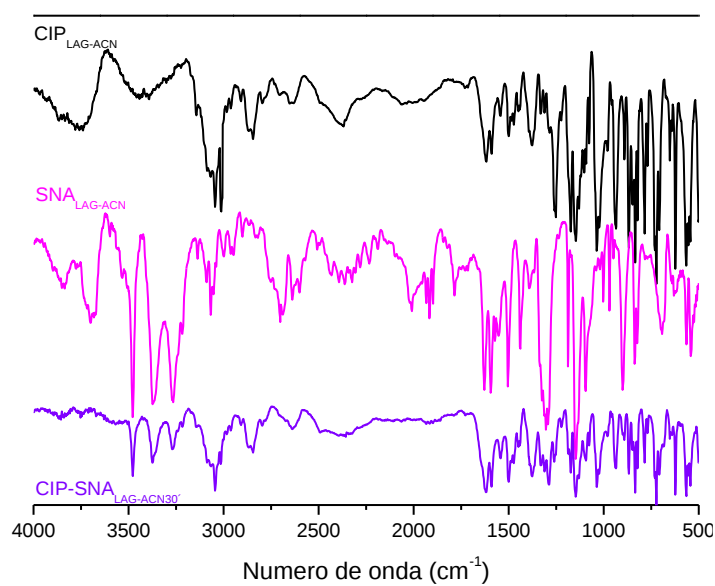


Figura 7.41. Espectros DRIFT de: $CIP_{LAG-ACN}$, $SNA_{LAG-ACN}$, y $CIP-SNA_{LAG-ACN30'}$.

A fin de completar la evaluación de la capacidad de formación de un sistema sólido multicomponente de estas IFA es necesario completar los estudios aumentando a 60 minutos el tiempo de molienda.

NOR-CIT_{LAG-ACN}

En la **Fig. 7.42** se observan las imágenes tomadas en el MO y en el MLP, al producto obtenido de la molienda de NOR y CIT con ACN durante 30 minutos. El producto es parcialmente amorfo con pequeñas regiones de cristalización.

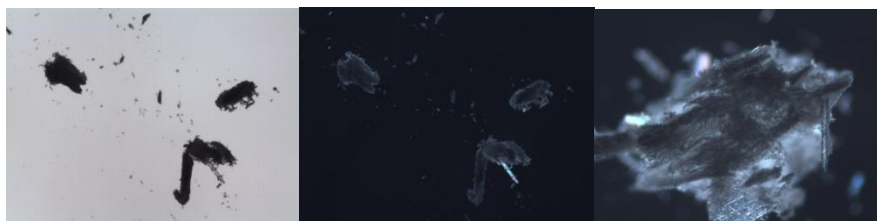


Figura 7.42. Imágenes de NOR-CIT: a) NOR-CIT_{LAG-ACN} (5X); b) NOR-CIT_{LAG-ACN} con luz polarizada (5X) c) NOR-CIT con luz polarizada (10X).

En la **Tabla 7.9** se presentan los datos obtenidos de estudios térmicos realizados sobre: NOR_{LAG-ACN}, CIT_{LAG-ACN}, NOR+CIT_{MF}, NOR-CIT_{LAG-ACN} y en la **Figura 7.43** se observan las curvas DSC correspondientes.

Tabla 7.9. Temperatura de Fusión y Temperatura de inicio extrapolada de: NOR_{LAG-ACN}, CIT_{LAG-ACN}, NOR+ CIT_{MF}, NOR-CIT_{LAG-ACN}.

	TF (°C)	T _{ie} (°C)
NOR_{LAG-ACN}	217,2-221,1	215,2
CIT_{LAG-ACN}	128,7-131-0	154,66
NOR+CIT_{MF}		142,08/162,95/203,23
NOR-CIT_{LAG-ACN}	234,7-266,6	202,78

TF: Temperatura de Fusión, T_{ie}: Temperatura de inicio extrapolada

NOR-CIT_{LAG-ACN} presenta dos endotermas; la primera asociada a una pérdida de masa, por ello se la atribuye a la desolvatación y la segunda tiene una t_{ie} de 202,8 °C, intermedia a las t_{ie} de sus componentes originales. Por otra parte, NOR+CIT_{MF} exhibe 4 endotermas, la primera corresponde a la desolvatación del material y en las siguientes no hay evidencia de pérdida de masa, por lo tanto, se estima que son de fusión. La última endoterma tiene un hombro endotérmico del lado derecho.

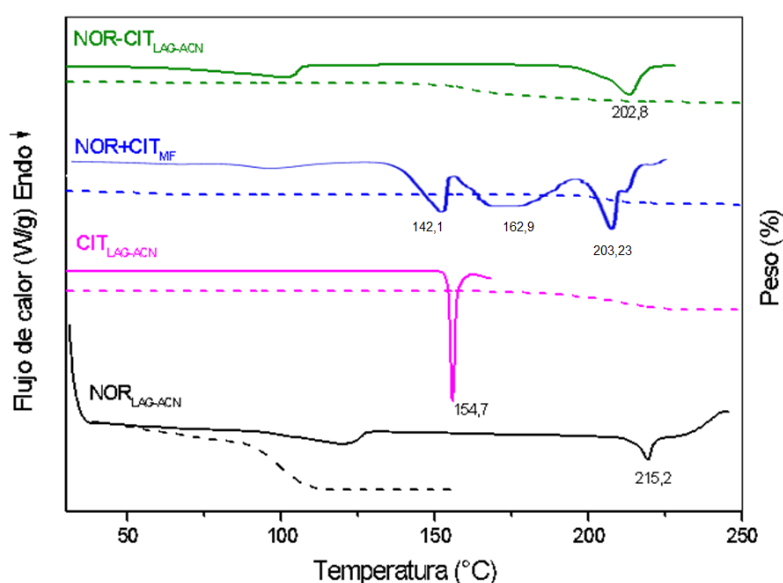


Figura 7.43. Curvas DSC y TG ($\beta = 10$ °C/min, flujo de $N_2 = 50$ mL/min) de: $NOR_{LAG-ACN}$, $CIT_{LAG-ACN}$, $NOR+CIT_{MF}$, $NOR-CIT_{LAG-ACN}$.

En el difractograma de $NOR-CIT_{LAG-ACN}$ (**Fig. 7.44**) se evidenció una marcada disminución en las intensidades de varias reflexiones y la aparición de nuevos picos respecto a los difractogramas de $NOR_{LAG-ACN}$ y $CIT_{LAG-ACN}$. Estas diferencias se observan a $9,57^\circ$; $22,63^\circ$; $41,19^\circ$; $41,29^\circ$; $43,47^\circ$ y $43,57^\circ$ 2θ . Ciertamente, estos patrones no implicaron la superposición de las reflexiones de NOR y CIT, como sucede con el $NOR+CIT_{MF}$.

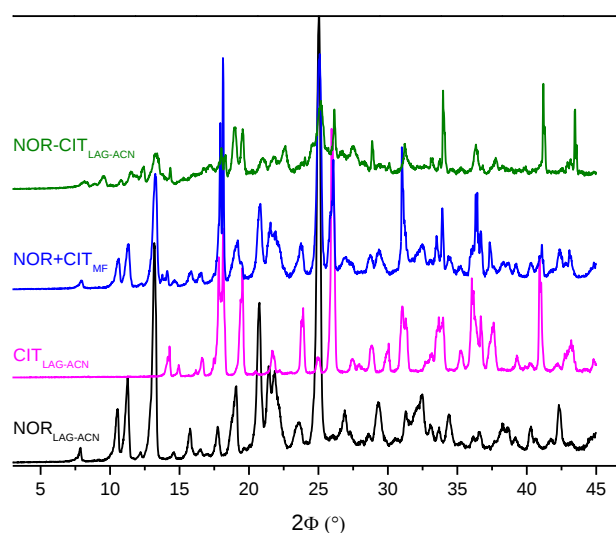


Figura 7.44. Patrones experimentales de DRXP de: $NOR_{LAG-ACN}$, $CIT_{LAG-ACN}$, $NOR+CIT_{MF}$, $NOR-CIT_{LAG-ACN}$.

En la **Fig. 7.45** se observa el DRIFT de $\text{NOR-CIT}_{\text{LAG-ACN}}$. Se distingue ausencia de las señales a 1505 y 1588 cm^{-1} y, además, a 1090 cm^{-1} (C-F) de $\text{NOR}_{\text{LAG-ACN}}$. Y respecto a $\text{CIT}_{\text{LAG-ACN}}$ se observa la desaparición de la señal característica a 3281 cm^{-1} (-OH), y de las señales 1696 cm^{-1} (C=O), 1214 cm^{-1} y la atenuación de las señales situadas a 1425 cm^{-1} (O-CO) y 1051 cm^{-1} (C-OH). Por otra parte, aparecen nuevas señales a 1722 y 806 cm^{-1} , indicando la protonación de los grupos COO^- en NOR y CIT.

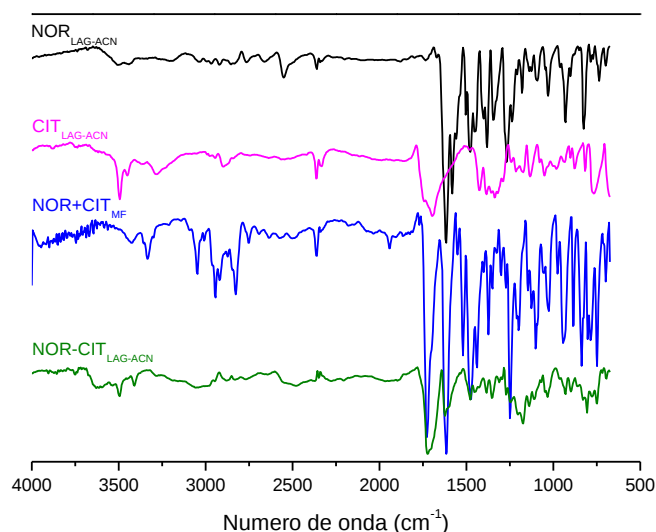


Figura 7.45. Espectros DRIFT de: $\text{NOR}_{\text{LAG-ACN}}$, $\text{CIT}_{\text{LAG-ACN}}$, $\text{NOR} + \text{CIT}_{\text{MF}}$, $\text{NOR-CIT}_{\text{LAG-ACN}}$.

Los datos de DRXP y DRIFT evidencian que CIT interacciona con NOR por LAG durante 30 minutos. La interacción entre NOR y CIT ocurriría entre los grupos funcionales COOH y F de NOR y los grupos COOH y OH de CIT (**Fig. 7.46**).

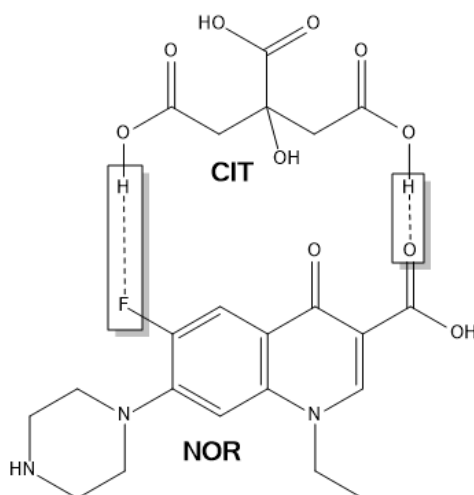


Figura 7.46. Posibles interacciones en el estado sólido entre $\text{NOR-CIT}_{\text{LAG-ACN}}$.

Se sintetizaron, además, NOR-MAL_{LAG-ACN}, NOR-TART_{LAG-ACN} y CIP-NICDif-AcOH, CIP-TART_{Dif-AcOH} por el método de difusión de vapor de ácido acético. La caracterización parcial de cada uno de estos sistemas multicomponentes se encuentra descrita en el **Anexo**.

7.8. CONCLUSIÓN

El diseño y desarrollo de nuevas formas sólidas constituidas por FQ y/o SA y COF comenzó con la selección de los IFA y COF siguiendo los criterios descritos en el **Capítulo 2**. Se trabajó con NOR, CIP, SNA y SMX y con los COF: CIT, MAL, y TART. Una vez seleccionados, se caracterizó la materia prima a fin de identificar los polimorfos presentes, estos resultaron ser:

- ✱ NOR_{MPC-2018} corresponde a una mezcla del polimorfo A y del polimorfo B,
- ✱ CIP_{MPC} es una mezcla de CIP anhidra zwitteriónica y trazas de CIP anhidra neutra,
- ✱ SNA_{MPC} es la forma polimórfica γ ,
- ✱ SMX_{MPC} es el polimorfo I.

Posteriormente se realizó la exploración de los métodos de obtención de nuevas formas sólidas aplicando molienda en seco, LAG seguida de evaporación, difusión de vapor, la evaporación lenta del solvente y la disminución lenta de la temperatura de soluciones saturadas. De todas ellas, las que dieron mejores resultados fueron LAG, particularmente ACN, y difusión de vapor.

Los IFA procesados por LAG con ACN resultaron ser los siguientes:

- ✱ NOR_{LAG-ACN} es el polimorfo sesquihidrato 1,5 H₂O, presente en su forma zwitteriónica,
- ✱ CIP_{LAG-ACN} es una mezcla de CIP anhidra zwitteriónica y trazas de CIP anhidra neutra,
- ✱ SNA_{LAG-ACN} está presente en la forma β -polimórfica,
- ✱ SMX_{LAG-ACN} es el polimorfo I.

Aplicando el método de LAG-ACN se obtuvieron los siguientes sólidos multicomponentes:

- ✱ NOR-SMX_{LAG-ACN} forma un cocrystal en el que predominan las especies en su forma no ionizada. La interacción molecular ocurriría entre los grupos C=O y OH de NOR con el átomo de H del grupo SO₂NH de SMX.
- ✱ NOR-SNA_{LAG-ACN} es un nuevo aducto molecular que podría clasificarse en la categoría de cocrystal iónicos, dado que la interacción entre sus componentes se produciría mediante el grupo COO⁻ de NOR y el grupo NH₂ del grupo sulfonamido de SNA. Se observó además que se requiere de 60 minutos de molienda para su formación.
- ✱ CIP-SMX_{LAG-ACN} forma una nueva fase cristalina en la que SMX interactuaría a través del grupo SO₂ con el grupo NH₂⁺ de CIP. En este caso el aducto obtenido podría ser un cocrystal iónico.
- ✱ CIP-SNA_{LAG-ACN} podría ser una mezcla física o eutéctico. Se concluyó que utilizando la técnica de LAG ACN por 30 minutos, tanto CIP como SNA no cocrystalizan.
- ✱ NOR-CIT_{LAG-ACN} forma una nueva fase cristalina en la que la interacción ocurriría entre los grupos funcionales COOH y F de NOR y COOH y OH de CIT.

Se concluye que las metodologías experimentales empleadas permitieron caracterizar los sistemas sólidos multicomponentes. Se Evidenciaron resultados diferentes para cada par IFA-IFA o IFA-COF y el método LAG ACN resultó ser una técnica adecuada para estos sistemas.

7.7. BIBLIOGRAFÍA

Almeida, A. C.; Torquetti, C.; Ferreira, P. O.; Fernandes, R. P.; dos Santos, E. C.; Kogawa, A. C.; Caires, F. J. Cocrystals of Ciprofloxacin with Nicotinic and Isonicotinic Acids: Mechanochemical Synthesis, Characterization, Thermal and Solubility Study. *Thermochim. Acta* **2020**, 685 (178346), 178346. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2019.178346>.

Al-Omar, M. A. Ciprofloxacin: Analytical Profile. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*; Elsevier, 2005; pp 179–207.

Alsubaie, M.; Aljohani, M.; Erxleben, A.; McArdle, P. Cocrystal Forms of the BCS Class IV Drug Sulfamethoxazole. *Cryst. Growth Des.* **2018**, 18 (7), 3902–3912. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00216>.

Bag, P. P.; Ghosh, S.; Khan, H.; Devarapalli, R.; Malla Reddy, C. Drug–Drug Salt Forms of Ciprofloxacin with Diflunisal and Indoprofen. *CrystEngComm* **2014**, *16* (32), 7393–7396. <https://doi.org/10.1039/c4ce00631c>.

Barbas, R.; Martí, F.; Prohens, R.; Puigjaner, C. Polymorphism of Norfloxacin: Evidence of the Enantiotropic Relationship between Polymorphs A and B. *Cryst. Growth Des.* **2006**, *6* (6), 1463–1467. <https://doi.org/10.1021/cg060101u>.

Barbas, R.; Prohens, R.; Puigjaner, C. A New Polymorph of Norfloxacin: Complete Characterization and Relative Stability of Its Trimorphic System. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2007**, *89* (3), 687–692. <https://doi.org/10.1007/s10973-006-7956-9>.

Basavoju, S.; Boström, D.; Velaga, S. P. Pharmaceutical Cocrystal and Salts of Norfloxacin. *Cryst. Growth Des.* **2006**, *6* (12), 2699–2708. <https://doi.org/10.1021/cg060327x>.

Bashimam, M.; El-Zein, H. Pharmaceutical Cocrystal of Antibiotic Drugs: A Comprehensive Review. *Heliyon* **2022**, *8* (12), e11872. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11872>.

Bhattacharya, B.; Mondal, A.; Soni, S. R.; Das, S.; Bhunia, S.; Bal Raju, K.; Ghosh, A.; Malla Reddy, C. Multidrug Salt Forms of Norfloxacin with Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Solubility and Membrane Permeability Studies. *CrystEngComm* **2018**, *20* (41), 6420–6429. <https://doi.org/10.1039/c8ce00900g>.

Boycov, D. E.; Drozd, K. V.; Manin, A. N.; Churakov, A. V.; Perlovich, G. L. Rational Design of the Carbamazepine Ternary Cocrystals. *Cryst. Growth Des.* **2024**, *24* (11), 4862–4873. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.4c00529>

Bratu, I.; Borodi, G.; KacsÓ, I.; Moldovan, Z.; Filip, C.; Dragan, F.; Vasilescu, M.; Simon, S. New Solid Form of Norfloxacin: Structural Studies. *Spectrosc. Int. J.* **2011**, *25* (1), 53–62. <https://doi.org/10.1155/2011/462913>.

Byrn, S. R. *Solid-State Chemistry of Drugs*, 2nd ed.; Ssci, 1999

Caira, M. R. Sulfa Drugs as Model Cocrystal Formers. *Mol. Pharm.* **2007**, *4* (3), 310–316. <https://doi.org/10.1021/mp070003j>.

Caria Santos, I. Investigação de formas sólidas multicomponente do antibacteriano Norfloxacin. Universidad de COIMBRE. **2021**

Chadha, R.; Singh, P.; Khullar, S.; Mandal, S. K. Ciprofloxacin Hippurate Salt: Crystallization Tactics, Structural Aspects, and Biopharmaceutical Performance. *Cryst. Growth Des.* **2016**, *16* (9), 4960–4967. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b00533>.

Chakraborty, S.; Dhibar, M.; Pani, A. Crystal Engineering and Its Chemistry: An Architectural Approach for Cocrystallization. *Current Materials Science* **2022**, *15* (3), 251–264. <https://doi.org/10.2174/2666145415666220317124358>.

Chebout, O.; Trifa, C.; Bouacida, S.; Boudraa, M.; Imane, H.; Merzougui, M.; Mazouz, W.; Ouari, K.; Boudaren, C.; Merazig, H. Two New Copper (II) Complexes with Sulfanilamide as Ligand: Synthesis, Structural, Thermal Analysis, Electrochemical Studies and Antibacterial Activity. *J. Mol. Struct.* **2022**, *1248* (131446), 131446. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131446>.

Chen, Z.-F.; Xiong, R.-G.; Zhang, J.; Chen, X.-T.; Xue, Z.-L.; You, X.-Z. 2D Molecular Square Grid with Strong Blue Fluorescent Emission: A Complex of Norfloxacin with Zinc(II). *Inorg. Chem.* **2001**, *40* (16), 4075–4077. <https://doi.org/10.1021/ic001470x>.

Chen, Z.-F.; Xiong, R.-G.; Zuo, J.-L.; Guo, Z.; You, X.-Z.; Fun, H.-K. X-Ray Crystal Structures of Mg²⁺ and Ca²⁺ Dimers of the Antibacterial Drug Norfloxacin. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**, No. 22, 4013–4014. <https://doi.org/10.1039/b006806n>.

Cherukuvada, S.; Guru Row, T. N. Comprehending the Formation of Eutectics and Cocrystals in Terms of Design and Their Structural Interrelationships. *Cryst. Growth Des.* **2014**, *14* (8), 4187–4198. <https://doi.org/10.1021/cg500790q>.

Cherukuvada, S.; Nangia, A. Eutectics as Improved Pharmaceutical Materials: Design, Properties and Characterization. *Chem. Commun. (Camb.)* **2014**, *50* (8), 906–923. <https://doi.org/10.1039/c3cc47521b>.

Chongcharoen, W.; Byrn, S. R.; Sutanthavibul, N. Solid State Interconversion between Anhydrous Norfloxacin and Its Hydrates. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97* (1), 473–489. <https://doi.org/10.1002/jps.21165>.

Costa, F. M. S.; Granja, A.; Pérez, R. L.; Warner, I. M.; Reis, S.; Passos, M. L. C.; Saraiva, M. L. M. F. S. Fluoroquinolone-Based Organic Salts (GUMBOS) with Antibacterial Potential. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (21), 15714. <https://doi.org/10.3390/ijms242115714>.

Cunha, S. Métodos Simples de Formação de Monocristal de Substância Orgânica Para Estudo Estrutural Por Difração de Raios X. *Quim. Nova* **2008**, *31* (4), 906–909. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422008000400031>.

Domingos, S.; André, V.; Quaresma, S.; Martins, I. C. B.; Minas da Piedade, M. F.; Duarte, M. T. New Forms of Old Drugs: Improving without Changing: New Forms of

Old Drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* **2015**, *67* (6), 830–846. <https://doi.org/10.1111/jphp.12384>.

Downey, J. D. 2020. The crystal landscape and cocrystallization of primary aromatic sulfonamides. MRes Thesis, University College Cork. TESIS

Ehiwe, T. O.; Alexander, B. D.; Mitchell, J. C.; Snowden, M. J.; Waters, L. J. Monitoring Real Time Polymorphic Transformation of Sulfanilamide by Diffuse Reflectance Visible Spectroscopy. *J. Pharm. Anal.* **2016**, *6* (3), 179–183. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.12.002>.

ElShaer A.; Ouyang D.; Hanson P.; Mohammed A Prasanna. Preparation and Evaluation of Amino Acid Based Salt Forms of Model Zwitterionic Drug Ciprofloxacin. *J. Pharm. Drug Deliv. Res.* **2013**, *02* (01). <https://doi.org/10.4172/2325-9604.1000111>

Fabbiani, F. P. A.; Arlin, J.-B.; Buth, G.; Dittrich, B.; Florence, A. J.; Herbst-Irmer, R.; Sowa, H. Intermolecular Interactions, Disorder and Twinning in Ciprofloxacin–2,2-Difluoroethanol (2/3) and Ciprofloxacin–Water (3/14.5). *Acta Crystallogr. C* **2011**, *67* (3), o120–o124. <https://doi.org/10.1107/s0108270111005488>.

Fael, H.; Barbas, R.; Prohens, R.; Ràfols, C.; Fuguet, E. Synthesis and Characterization of a New Norfloxacin/Resorcinol Cocrystal with Enhanced Solubility and Dissolution Profile. *Pharmaceutics* **2021**, *14* (1), 49. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010049>.

Fallati, C. S.; Ahumada, A. A.; Manzo, R. H. El Perfil de Solubilidad de La Ciprofloxacina En Función Del pH. *Acta Farm. Bon* **1994**, *13*, 73–77.

Ferreira, L. T.; Alarcon, R. T.; Perpétuo, G. L.; Bannach, G. Investigation and Characterization by TG/DTG–DTA and DSC of the Fusion of Riboflavin, and Its Interaction with the Antibiotic Norfloxacin in the Screening of Cocrystal. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2019**, *136* (2), 581–588. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7696-7>.

Ferreira, P. O.; de Almeida, A. C.; Costa, G. de P.; Torquetti, C.; Baptista, J. A.; Eusébio, M. E. S.; Caires, F. J.; Castro, R. A. E. Norfloxacin Cocrystals: Mechanochemical Synthesis and Scale-up Viability through Solubility Studies. *J. Pharm. Sci.* **2023**, *112* (8), 2230–2239. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.03.003>

Ferreira, P. O.; de Moura, A.; de Almeida, A. C.; dos Santos, É. C.; Kogawa, A. C.; Caires, F. J. Mechanochemical Synthesis, Thermoanalytical Study and Characterization of New Multicomponent Solid Forms of Norfloxacin with Saccharin. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2022**, *147* (3), 1985–1997. <https://doi.org/10.1007/s10973-021-10658-w>.

Florence, A. J.; Kennedy, A. R.; Shankland, N.; Wright, E.; Al-Rubayi, A. Norfloxacin Dihydrate. *Acta Crystallogr. C* **2000**, 56 (11), 1372–1373. <https://doi.org/10.1107/s0108270100010933>.

Friščić, T.; Jones, W. Recent Advances in Understanding the Mechanism of Cocrystal Formation via Grinding. *Cryst. Growth Des.* **2009**, 9 (3), 1621–1637. <https://doi.org/10.1021/cg800764n>.

Gao, F.; Yang, P.; Xie, J.; Wang, H. Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Novel Fe (III), Co (II), and Zn (II) Complexes with Norfloxacin. *J. Inorg. Biochem.* **1995**, 60 (1), 61–67. [https://doi.org/10.1016/0162-0134\(95\)00002-6](https://doi.org/10.1016/0162-0134(95)00002-6).

Garnero, C.; Aiassa, V.; Longhi, M. Sulfamethoxazole: Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Complex: Preparation and Characterization. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, 63, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.011>.

Gelbrich, T.; Bingham, A. L.; Threlfall, T. L.; Hursthouse, M. B. Delta-Sulfanilamide. *Acta Crystallogr. C* **2008**, 64 (Pt 4), o205-7. <https://doi.org/10.1107/S0108270108005696>.

Giron, D. Thermal Analysis and Calorimetric Methods in the Characterisation of Polymorphs and Solvates. *Thermochim. Acta* **1995**, 248, 1–59. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(94\)01953-e](https://doi.org/10.1016/0040-6031(94)01953-e).

Golovnev, N. N.; Molokeev, M. S.; Lesnikov, M. K.; Atuchin, V. V. Two Salts and the Salt Cocrystal of Ciprofloxacin with Thiobarbituric and Barbituric Acids: The Structure and Properties. *J. Phys. Org. Chem.* **2018**, 31 (3). <https://doi.org/10.1002/poc.3773>.

Gomes, S. N.; Biscaia, I. F. B.; Lopes, D. S.; Mengarda, M.; Murakami, F. S.; Oliveira, P. R.; Bernardi, L. S. Cocrystals Enhance Biopharmaceutical and Antimicrobial Properties of Norfloxacin. *Pharmaceutics* **2023**, 15 (9), 2211. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092211>.

Gopi, S. P.; Ganguly, S.; Desiraju, G. R. A Drug–Drug Salt Hydrate of Norfloxacin and Sulfathiazole: Enhancement of *in Vitro* Biological Properties via Improved Physicochemical Properties. *Mol. Pharm.* **2016**, 13 (10), 3590–3594. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00320>.

Guillory, J.; Erb, D. Using Solution Calorimetry to Quantitate Mixtures of Three Crystalline Forms of Sufamethoxazole. *Pharm. Manuf.* **1985**, 2, 1985.

Hu, T.-C.; Wang, S.-L.; Chen, T.-F.; Lin, S.-Y. Hydration-Induced Proton Transfer in the Solid State of Norfloxacin. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91* (5), 1351–1357. <https://doi.org/10.1002/jps.10136>.

Huang, X. F.; Zhang, Z. H.; Zhang, Q. Q.; Wang, L. Z.; He, M. Y.; Chen, Q.; Song, G.-Q.; Wei, L.; Wang, F.; Du, M. Norfloxacin Salts with Benzenedicarboxylic Acids: Charge-Assisted Hydrogen-Bonding Recognition and Solubility Regulation. *CrystEngComm* **2013**, *15* (30), 6090. <https://doi.org/10.1039/c3ce40567b>.

Imchalee, R.; Charoenchaitrakool, M. Gas Anti-Solvent Processing of a New Sulfamethoxazole–l-Malic Acid Cocrystal. *J. Ind. Eng. Chem.* **2015**, *25*, 12–15. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.11.009>

Katdare, A. V.; Ryan, J. A.; Bavitz, J. F.; Erb, D. M.; Guillory, J. K. Characterization of Hydrates of Norfloxacin. *Mikrochim. Acta* **1986**, *90* (1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1007/bf01196816>.

Katsarou, M. E.; Efthimiadou, E. K.; Psomas, G.; Karaliota, A.; Vourloumis, D. Novel Copper(II) Complex of *N*-Propyl-Norfloxacin and 1,10-Phenanthroline with Enhanced Antileukemic and DNA Nuclease Activities. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (3), 470–478. <https://doi.org/10.1021/jm7013259>.

Klein, H. R.; Mader, W. J. TLC Identification of Sulfonamides. *J. Pharm. Sci.* **1971**, *60* (3), 448–450. <https://doi.org/10.1002/jps.2600600322>

Li, X.; Hu, Y.; Gao, Y.; Zhang, G. G. Z.; Henry, R. F. A Methanol Hemisolvate of Ciprofloxacin. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online* **2006**, *62* (12), o5803–o5805. <https://doi.org/10.1107/s1600536806049087>

Li, X.; Zhi, F.; Hu, Y. Investigation of Excipient and Processing on Solid Phase Transformation and Dissolution of Ciprofloxacin. *Int. J. Pharm.* **2007**, *328* (2), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.08.012>.

Lin, H. O.; Baenziger, N. C.; Guillory, J. K. Physical Properties of Four Polymorphic Forms of Sulfanilamide I: Densities, Refractive Indexes, and X-Ray Diffraction Measurements. *J. Pharm. Sci.* **1974**, *63* (1), 145–146. <https://doi.org/10.1002/jps.2600630140>

Lin, H. O.; Keith Guillory, J. Polymorphism in Sulfanilamide-D4. *J. Pharm. Sci.* **1970**, *59* (7), 972–975. <https://doi.org/10.1002/jps.2600590711>.

Liu, F.; Gao, Y.; Zhao, Y. Detection of Quinolone Antibiotics with Electrochemiluminescence of Bimetallic Ruthenium Complex

$[(\text{Bpy})_2\text{Ru}(\text{Bpy})(\text{CH}_2)_8(\text{Bpy})\text{Ru}(\text{Bpy})_2]^{4+}$. *Anal. Methods* **2014**, 6 (13), 4661–4666. <https://doi.org/10.1039/c4ay00632a>.

Lu, J.; Li, Y.-P.; Wang, J.; Li, Z.; Rohani, S.; Ching, C.-B. Pharmaceutical Cocrystals: A Comparison of Sulfamerazine with Sulfamethazine. *J. Cryst. Growth* **2011**, 335 (1), 110–114. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2011.09.032>.

Madeira, D.; Alves, C.; Silva, J.; Florindo, C.; Costa, A.; Petrovski, Ž.; Marrucho, I. M.; Pedrosa, R.; Santos, M. M.; Branco, L. C. Fluoroquinolone-Based Organic Salts and Ionic Liquids as Highly Bioavailable Broad-Spectrum Antimicrobials. In *The 1st International Electronic Conference on Pharmaceutics*; MDPI: Basel Switzerland, 2020.

Mafra, L.; Santos, S. M.; Siegel, R.; Alves, I.; Almeida Paz, F. A.; Dudenko, D.; Spiess, H. W. Packing Interactions in Hydrated and Anhydrous Forms of the Antibiotic Ciprofloxacin: A Solid-State NMR, X-Ray Diffraction, and Computer Simulation Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (1), 71–74. <https://doi.org/10.1021/ja208647n>.

Mahapatra, S.; Venugopala, K. N.; Guru Row, T. N. A Device to Crystallize Organic Solids: Structure of Ciprofloxacin, Midazolam, and Ofloxacin as Targets. *Cryst. Growth Des.* **2010**, 10 (4), 1866–1870. <https://doi.org/10.1021/cg901565q>.

Marsh, G.; Kean, C. Applications of Chromatographic Methods to Organic Acids in Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1951**, 2 (1), 157–159. <https://doi.org/10.5344/ajev.1951.2.1.157>.

Mazuel C. *Norfloxacin*. Analytical Profiles of Drug Substances, 1991, **20**, 557-600 *Analytical Profiles of Drug Substances, Volume 20*; En: Florey, K., Brittain, H. G., Mazzo, D. J., Wozniak, T. J., Brenner, G. S., Forcier, G. A., Al-Badr, A. A., Eds.; Elsevier Science & Technology, 1991.

Mesallati, H.; Mugheirbi, N. A.; Tajber, L. Two Faces of Ciprofloxacin: Investigation of Proton Transfer in Solid State Transformations. *Cryst. Growth Des.* **2016**, 16 (11), 6574–6585. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b01283>.

Mjos, K. D.; Cawthray, J. F.; Polishchuk, E.; Abrams, M. J.; Orvig, C. Gallium(III) and Iron(III) Complexes of Quinolone Antimicrobials. *Dalton Trans.* **2016**, 45 (33), 13146–13160. <https://doi.org/10.1039/c6dt01315e>.

Nangia, A. K.; Desiraju, G. R. Heterosynthons, Solid Form Design and Enhanced Drug Bioavailability. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2022**, 61 (39), e202207484. <https://doi.org/10.1002/anie.202207484>

Nath, J.; Baruah, J. B. Polymorphic Solvates, Ionic Cocrystals and C–N Bond Formation to Form Ionic Cocrystals in Sulfamethoxazole and Sulfathiazole-Derived Urea. *CrystEngComm* **2022**, 24 (18), 3394–3408. <https://doi.org/10.1039/d1ce01731d>.

O'Connell, A. M.; Maslen, E. N. X-Ray and Neutron Diffraction Studies of β -Sulphanilamide. *Acta Crystallogr.* **1967**, 22 (1), 134–145. <https://doi.org/10.1107/s0365110x67000210>.

O'Malley, C.; McArdle, P.; Erxleben, A. Formation of Salts and Molecular Ionic Cocrystals of Fluoroquinolones and α,ω -Dicarboxylic Acids. *Cryst. Growth Des.* **2022**, 22 (5), 3060–3071. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.1c01509>.

Ogruc Ildiz, G.; Akyuz, S. Conformational Analysis and Vibrational Study of Sulfanilamide. *Vib. Spectrosc.* **2012**, 58, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2011.10.005>.

Paluch, K. J.; McCabe, T.; Müller-Bunz, H.; Corrigan, O. I.; Healy, A. M.; Tajber, L. Formation and Physicochemical Properties of Crystalline and Amorphous Salts with Different Stoichiometries Formed between Ciprofloxacin and Succinic Acid. *Mol. Pharm.* **2013**, 10 (10), 3640–3654. <https://doi.org/10.1021/mp400127r>.

Perlovich, G. L. Thermodynamic Characteristics of Cocrystal Formation and Melting Points for Rational Design of Pharmaceutical Two-Component Systems. *CrystEngComm* **2015**, 17 (37), 7019–7028. <https://doi.org/10.1039/C5CE00992H>.

Pinto Vitorino, G.; Mazzieri, M.R. Chapter 1: “The Challenge of Improving the Bioavailability of Ciprofloxacin by Supramolecular Engineering”, in: “Ciprofloxacin: Biosynthesis, Applications, and Adverse Effects”. M. S. Attia editor. Nova Science Publishers, Inc.: USA. 2019. ISBN: 978-1-53614-534-2.

Pinto Vitorino, G.; Sperandeo, N. R.; Caira, M. R.; Mazzieri, M. R. A Supramolecular Assembly Formed by Heteroassociation of Ciprofloxacin and Norfloxacin in the Solid State: Co-Crystal Synthesis and Characterization. *Cryst. Growth Des.* **2013**, 13 (3), 1050–1058. <https://doi.org/10.1021/cg301299e>.

Portieri, A.; Harris, R.K.; Fletton, R.A.; Lancaster, R.W.; Threlfall, T.L. Effects of polymorphic differences for sulfanilamide, as seen through ^{13}C and ^{15}N solid-state NMR, together with shielding calculations. Concepts in Magnetic Resonance Part B. **2004**, 42 (3), 313–320. <https://doi.org/10.1002/mrc.1351>

Prasad, K. D.; Cherukuvada, S.; Devaraj Stephen, L.; Guru Row, T. N. Effect of Inductive Effect on the Formation of Cocrystals and Eutectics. *CrystEngComm* **2014**, 16 (42), 9930–9938. <https://doi.org/10.1039/c4ce01489h>.

Prasanna, M. D.; Guru Row, T. N. Hydrogen Bonded Networks in Hydrophilic Channels: Crystal Structure of Hydrated Ciprofloxacin Lactate and Comparison with Structurally Similar Compounds. *J. Mol. Struct.* **2001**, 559 (1–3), 255–261. [https://doi.org/10.1016/s0022-2860\(00\)00701-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2860(00)00701-8).

Price, C. P.; Grzesiak, A. L.; Matzger, A. J. Crystalline Polymorph Selection and Discovery with Polymer Heteronuclei. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (15), 5512–5517. <https://doi.org/10.1021/ja042561m>.

Psomas, G.; Kessissoglou, D. P. Quinolones and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Interacting with Copper(II), Nickel(II), Cobalt(II) and Zinc(II): Structural Features, Biological Evaluation and Perspectives. *Dalton Trans.* **2013**, 42 (18), 6252. <https://doi.org/10.1039/c3dt50268f>.

Puigjaner, C.; Barbas, R.; Portell, A.; Font-Bardia, M.; Alcobé, X.; Prohens, R. Revisiting the Solid State of Norfloxacin. *Cryst. Growth Des.* **2010**, 10 (7), 2948–2953. <https://doi.org/10.1021/cg9014898>.

Qi, L.; Xuanyuan, S.; Li, C.; Zhou, X.; Ye, Y.; Sun, Y.; Hao, H.; Xie, C. Effect of the Functional Group Position in Coformers on Ternary Cocrystals: A Case of Sulfamoylbenzoic Acids. *Cryst. Growth Des.* **2024**. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.4c00550>.

Ravindra, N. V.; Panpalia, G. M.; Jagarlapudi, A. R. P. S. Norfloxacin Sesquihydrate. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online* **2009**, 65 (2), o303–o303. <https://doi.org/10.1107/s160053680900066x>.

Refat, M. S.; Mohamed, G. G. Ti(IV), Cr(III), Mn(II), and Ni(II) Complexes of the Norfloxacin Antibiotic Drug: Spectroscopic and Thermal Characterizations. *J. Chem. Eng. Data* **2010**, 55 (9), 3239–3246. <https://doi.org/10.1021/je100064h>.

Rostamizadeh, S.; Daneshfar, Z.; Moghimi, H. Synthesis of Sulfamethoxazole and Sulfabenzamide Metal Complexes; Evaluation of Their Antibacterial Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 171, 364–371. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.002>.

Roy, P.; Chakraborty, S.; Pandey, N.; Kumari, N.; Chougule, S.; Chatterjee, A.; Chatterjee, K.; Mandal, P.; Gorain, B.; Dhotre, A. V.; Bansal, A. K.; Ghosh, A. Study on Sulfamethoxazole-Piperazine Salt: A Mechanistic Insight into Simultaneous Improvement of Physicochemical Properties. *Mol. Pharm.* **2023**, 20 (10), 5226–5239. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00646>.

Roy, P.; Pandey, N.; Kumari, N.; Baidya, R.; Mary, Y. S.; Mary, Y. S.; Ghosh, A. Development of Sulfamethoxazole-Succinimide Cocrystal by Mechanochemical

Cocrystallization – An Insight into Spectroscopic, Electronic, Chemical Conformation and Physicochemical Properties. *Chem. Eng. Res. Des.* **2022**, *185*, 446–457. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2022.07.012>

Roy, S.; Goud, N. R.; Babu, N. J.; Iqbal, J.; Kruthiventi, A. K.; Nangia, A. Crystal Structures of Norfloxacin Hydrates. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8* (12), 4343–4346. <https://doi.org/10.1021/cg800519d>.

Saganowska, P.; Wesolowski, M. DSC as a Screening Tool for Rapid Co-Crystal Detection in Binary Mixtures of Benzodiazepines with Co-Formers. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2018**, *133* (1), 785–795. <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6858-3>.

Salceanu, D.-C.; Pincu, E.; Bruni, G.; Marini, A.; Meltzer, V. Physico-Chemical Study of Norfloxacin and Metronidazole Binary Mixtures. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2018**, *132* (2), 1095–1103. <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6919-7>

Santos, M. M.; Alves, C.; Silva, J.; Florindo, C.; Costa, A.; Petrovski, Ž.; Marrucho, I. M.; Pedrosa, R.; Branco, L. C. Antimicrobial Activities of Highly Bioavailable Organic Salts and Ionic Liquids from Fluoroquinolones. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (8), 694. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080694>.

Shaikh, R.; Singh, R.; Walker, G. M.; Croker, D. M. Pharmaceutical Cocrystal Drug Products: An Outlook on Product Development. *Trends Pharmacol. Sci.* **2018**, *39* (12), 1033–1048. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.10.006>.

Shemchuk, O., d'Agostino, S., Fiore, C., Sambri, V., Zannoli, S., Grepioni, F., Braga, D. Natural Antimicrobials Meet a Synthetic Antibiotic: Carvacrol/Thymol and Ciprofloxacin Cocrystals as a Promising Solid-State Route to Activity Enhancement. *Cryst. Growth Des.* **2020**, *20*, 6796 – 6803. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.0c00900>

Srivastav, G.; Yadav, B.; Yadav, R. K.; Yadav, R. A. Vibrational Spectra and Molecular Structure of Sulfanilamide: IR and Low Temperature Raman Studies and DFT Investigation of Monomeric and Dimeric Forms. *Vib. Spectrosc.* **2021**, *112* (103199), 103199. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103199>.

Stoler, E.; Warner, J. C. Non-Covalent Derivatives: Cocrystals and Eutectics. *Molecules* **2015**, *20* (8), 14833–14848. <https://doi.org/10.3390/molecules200814833>.

Surov, A. O.; Voronin, A. P.; Drozd, K. V.; Churakov, A. V.; Roussel, P.; Perlovich, G. L. Diversity of Crystal Structures and Physicochemical Properties of Ciprofloxacin

and Norfloxacin Salts with Fumaric Acid. *CrystEngComm* **2018**, 20 (6), 755–767. <https://doi.org/10.1039/c7ce02033c>

Sustar B, Bukovec N, Bukovec P. Polymorphism and Stability of Norfloxacin, (1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolinocarboxylic acid. *J. Therm. Anal.*, **1993**, 40, 475-81.

Šuštar, B.; Bukovec, N.; Bukovec, P. Polymorphism and Stability of Norfloxacin, (1-Ethyl-6-Fluoro-1,4-Dihydro-4-Oxo-7-(1-Piperazinil)-3-Quinolinocarboxylic Acid. *J. Therm. Anal. Calorim.* **1993**, 40 (2), 475–481. <https://doi.org/10.1007/bf02546616>.

Tong, C.; Hu, Z.; Liu, W. Sensitive Determination of DNA Based on the Interaction between Norfloxacin–Tb³⁺ Complex and DNA. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53 (16), 6207–6212. <https://doi.org/10.1021/jf050783d>.

Toscani, S.; Thorén, S.; Agafonov, V.; Céolin, R.; Dugué. Thermodynamic Study of Sulfanilamide Polymorphism: (I) Monotropy of the α -Variety. *J. Pharm. Res.* **1995**, 12 (10), 1453–1456. <https://doi.org/10.1023/a:1016271017802>.

Tupe, S. A.; Khandagale, S. P.; Jadhav, A. B. Pharmaceutical Cocrystals: An Emerging Approach to Modulate Physicochemical Properties of Active Pharmaceutical Ingredients. *J. Drug Deliv. Ther.* **2023**, 13 (4), 101–112. <https://doi.org/10.22270/jddt.v13i4.6016>.

Turel, I.; Bukovec, P.; Quirós, M. Crystal Structure of Ciprofloxacin Hexahydrate and Its Characterization. *Int. J. Pharm.* **1997**, 152 (1), 59–65. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(97\)04913-2](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(97)04913-2).

Velaga, S. P.; Basavoju, S.; Boström, D. Norfloxacin Saccharinate–Saccharin Dihydrate Cocrystal – A New Pharmaceutical Cocrystal with an Organic Counter Ion. *J. Mol. Struct.* **2008**, 889 (1–3), 150–153. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2008.01.046>

Vemuri, V. D.; Lankalapalli, S. Rosuvastatin Cocrystals: An Attempt to Modulate Physicochemical Parameters. *Futur. J. Pharm. Sci.* **2021**, 7 (1). <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00213-7>.

Vippagunta, S. R.; Brittain, H. G.; Grant, D. J. W. Crystalline Solids. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 48 (1), 3–26. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00097-7](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00097-7).

Wang, P.-L.; Feng, Y.-L.; Chen, L. Simultaneous Determination of Trace Norfloxacin, Pefloxacin, and Ciprofloxacin by TLC–Fluorescence Spectrodensitometry. *Microchem. J.* **1997**, 56 (2), 229–235. <https://doi.org/10.1006/mchj.1996.1396>

Yamashita, H.; Hirakura, Y.; Yuda, M.; Terada, K. Coformer Screening Using Thermal Analysis Based on Binary Phase Diagrams. *Pharm. Res.* **2014**, *31* (8), 1946–1957. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1296-4>.

Yang, S. S.; Guillory, J. K. Polymorphism in Sulfonamides. *J. Pharm. Sci.* **1972**, *61* (1), 26–40. <https://doi.org/10.1002/jps.2600610104>.

Yeh, K. L.; Lee, T. Intensified Crystallization Processes for 1:1 Drug–Drug Cocrystals of Sulfathiazole–Theophylline, and Sulfathiazole–Sulfanilamide. *Cryst. Growth Des.* **2018**, *18* (3), 1339–1349. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b01197>.

Zaini, E.; Sumirtapura, Y. C.; Halim, A.; Fitriani, L.; Soewandhi, S.N. Formation and Characterization of Sulfamethoxazole-Trimethoprim Cocrystal by Milling Process. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2017**, *7* (12): 169–173. <https://doi.org/10.7324/japs.2017.71224>.

Zeng, X.; Zheng, C.; Qiu, S.; Jiang, X.; Wang, X.; Qian, K.; Pan, R.; Yang, J.; Ma, Y. Cocrystal of Naringenin and Norfloxacin: Crystal Transformation, Solubility, and Antibacterial and Anticancer Activities. *Cryst. Growth Des.* **2024**, *24* (11), 4416–4427. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.4c00080>.

Zhang, G.; Zhang, L.; Yang, D.; Zhang, N.; He, L.; Du, G.; Lu, Y. Salt Screening and Characterization of Ciprofloxacin. *Acta Crystallogr. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* **2016**, *72* (1), 20–28. <https://doi.org/10.1107/s2052520615018582>.

CAPÍTULO 8

OPTIMIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOFARMACÉUTICAS

8.1. INTRODUCCIÓN	238
8.2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS DE FLUORQUINOLONAS	239
8.3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS DE SULFONAMIDAS ANTIBACTERIANAS.....	240
8.4. MATERIALES Y MÉTODOS	240
8.4.1. Determinación del logaritmo del Coeficiente de Partición aparente	240
8.4.2. Solubilidad en equilibrio.....	241
8.4.3. Velocidad de disolución.....	242
8.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	243
8.5.1. Determinación del log P_{ap}	243
8.5.2. Solubilidad en equilibrio.....	245
8.5.3. Velocidad de disolución.....	248
8.6. CONCLUSIONES.....	252
8.7. BIBLIOGRAFÍA	252

8.1. INTRODUCCIÓN

La solubilidad y la permeabilidad son propiedades biofarmacéuticas de gran impacto en la absorción de los ingredientes farmacéuticos activos (IFA) administrados por vía oral y por ello son los principales factores utilizados para asegurar una adecuada Biodisponibilidad (BD), según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB).

La BD es la "cantidad relativa del medicamento que ha accedido a la circulación general después de su administración, y la velocidad a la cual se ha producido dicho acceso". Esta última definición ha sido adoptada por la autoridad sanitaria de nuestro país (ANMAT) entre otras, y constituye tanto el fundamento de la determinación práctica de la BD como de su estrecha relación con el ensayo de disolución *in vitro* (Volonté et al., 2013).

Cuando estas propiedades son desfavorables, una de las estrategias más comúnmente utilizadas para su optimización es recurrir a la ingeniería de cristales para el diseño de aductos moleculares farmacéuticos capaces de influir en el perfil biofarmacéutico de las formas farmacéuticas sólidas y mejorar su BD. La tasa de disolución y la solubilidad en equilibrio de los sólidos farmacéuticos mantienen una estrecha relación con la BD del IFA y son indicadores valiosos para el desarrollo de formulaciones (Good et al., 2008; Martínez-Alejo et al., 2014). Otra propiedad fundamental es el coeficiente de Partición octanol/agua (P), indicador fisicoquímico frecuentemente empleado para modelar la composición de membranas biológicas, predecir la permeabilidad de los IFA y para calcular el transporte, distribución y destino en el organismo; también tiene un rol crucial en la formulación de correlaciones cuantitativas entre la estructura química y la actividad biológica de sustancias (QSAR del inglés: *Quantitative Structure Activity Relationships*). Los beneficios del *n*-octanol como solvente orgánico modelo para la determinación experimental del coeficiente de distribución se atribuyen principalmente a su equilibrio hidrófilo-lipófilo, su habilidad para generar enlaces de hidrógeno y su capacidad para disolver un elevado contenido de agua, reportado hasta un 27,5%; además, aspectos termodinámicos y teóricos sugieren que el *n*-octanol saturado de agua tiene una estructura microheterogénea. Por lo tanto, se ha descubierto que las relaciones entre la actividad biológica y el coeficiente de reparto son considerablemente más apropiadas en este sistema que en otros sistemas hidrocarburo/agua (Martínez et al., 2001; Prashar et al., 2023).

Por otra parte, la velocidad a la que los IFA poco solubles en agua se disuelven en el tracto gastrointestinal a partir de la forma farmacéutica, se correlaciona con su velocidad de absorción sistémica. Es por ello que el ensayo de disolución es la prueba *in vitro* de elección para estudiar el comportamiento que tendrán los medicamentos *in vivo*, y se ha convertido en un requisito farmacopeico y regulatorio para la evaluación de formas farmacéuticas (Volonté et al., 2013).

8.2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS DE FLUORQUINOLONAS

Estudios en solución realizados por Takács-Novák y col. (1992) fueron de los primeros investigadores que determinaron el P aparente en octanol/agua de una serie de quinolonas, en función del pH. Observaron que, a pH inferiores al punto isoeléctrico de las Fluorquinolonas (FQ), la liposolubilidad experimental es mayor que los valores calculados. Atribuyeron este hecho a la formación de pares iónicos entre la especie catiónica del IFA y la especie aniónica del buffer presente en la solución. Otro informe similar es el de Manzo y col. (Ahumada et al., 1993; Fallati et al., 1994) quienes atribuyeron los comportamientos inesperados de las solubilidades de Norfloxacin (NOR) y Ciprofloxacino (CIP), a pH inferiores a su punto isoeléctrico, a la formación de agregados moleculares entre distintas especies catiónicas y neutras de FQ.

Yu y col. (1994) informaron sobre el perfil de solubilidad en función del pH de NOR y CIP y sus solubilidades intrínsecas en función de la temperatura, mostrando que ambas tienen un calor de disolución endotérmico con una solubilidad mínima a pH alrededor de 7. Los valores de solubilidad intrínseca para CIP fueron: 0,037 mg/mL (6 °C), 0,086 mg/mL (25 °C), 0,14 mg/mL (30 °C) y 0,17 mg/mL (40 °C); para NOR 0,27 mg/mL (6 °C), 0,37 mg/mL (25 °C) y 0,85 mg/mL (40 °C). El perfil de solubilidad en función del pH de NOR a 25 °C también fue reportado por Ahumada y col. (1993) con una solubilidad mínima de 0,31 mg/mL a pH 7. Fallati y col. (1994) informaron el perfil de solubilidad en función del pH de CIP a 25 °C con un mínimo de 0,088 mg/mL a pH 6,84. En concordancia, Ross y col. (1990) también encontraron que la solubilidad intrínseca de las FQ a 25 °C oscilaba entre 0,0297 y 2,75 mg/mL (Breda et al., 2009).

El cocrystal NOR-Nicotinamida ha mostrado casi 8,13 y 6,53 veces más solubilidad en HCl 0,1 N y tampón fosfato que el NOR original, seguido por los cocrystal de NOR con ácido cinámico y sórbico con 4,41, 3,81 y 3,46, 1,96 veces más solubilidad en ambos medios, respectivamente (Prashar et al., 2023).

La comparación de la solubilidad aparente de NOR (0,21 mg/mL) con el cocrystal formado con isonicotinamida (0,59 mg/mL) y las sales con ácidos malónico (3,90 mg/mL), succínico (6,60 mg/mL) y maleico (9,80 mg/mL) después de 72 h de equilibrio, reveló una mejora de aproximadamente tres veces en la solubilidad del cocrystal y una mejora de 20 a 45 veces en las sales (Basavoju et al., 2006).

CIP anhidro fue descrito por Li y col. (2006) y comparado con sus hidratos mediante TG-CDB y DRXP. Los perfiles de disolución del polvo de las dos formas cristalinas de CIP indicaron que la forma anhidra tenía una velocidad de disolución significativamente mayor que su hidrato, logrando concentración máxima en 1 minuto. Sin embargo, inmediatamente después de alcanzar una concentración máxima, la velocidad de disolución comenzó a disminuir hasta casi el 50% al final del experimento de 60 minutos. Este comportamiento fue atribuido a la cristalización de CIP hidratada, que tiene una solubilidad significativamente menor (Pinto Vitorino et al., 2019).

8.3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS DE SULFONAMIDAS ANTIBACTERIANAS

El comportamiento termodinámico de soluciones de algunas sulfonamidas antibacterianas (SA) en alcoholes puros ha sido estudiado, mediante la determinación de la solubilidad en función de la temperatura y el correspondiente tratamiento de van't Hoff para el cálculo de la entalpía de solución (Martinez et al., 2001). Por otra parte, Delgado (2011) realizó el estudio Termodinámico de la solubilidad de SA sódicas en mezclas cosolventes etanol-agua.

Gopi y col. (2016) elaboraron una sal formada por sulfatiazol y NOR con propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas y de actividad mejoradas respecto a los componentes individuales. Se caracterizó mediante DRXM, DRXP, FT-IR y DSC.

8.4. MATERIALES Y MÉTODOS

8.4.1. DETERMINACIÓN DEL LOGARITMO DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN APARENTE

Se determinó el Coeficiente de Partición Aparente ($\log P_{ap}$) de NOR, CIP, Sulfanilamida (SNA) y Sulfametoxazol (SMX) y de las Mezclas Físicas (MF) equimoleculares: NOR+SNA_{MF}, NOR+SMX_{MF}, CIP+SNA_{MF} y CIP+SMX_{MF}.

Como solventes se utilizó *n*-octanol (Merck®) y solución reguladora de pH 7,4 preparada según Farmacopea Argentina (FA 7 Ed.), previamente saturados durante 24 horas. El equipamiento utilizado fue: balanza analítica digital Sartorius®; agitador mecánico Vortex Precytec®; baño sonicador TB-04 Testlab®; baño termostatzado Vicking® modelo Dubnoff; espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 50 y micropipetas P200 y P1000 HTL.

Se aplicó el método de la ampolla (shake flask) según los lineamientos descritos en la Guía OECD (1995), para ello se prepararon soluciones de concentración conocida cercana a 5×10^{-5} M de FQ y SA en buffer saturado con *n*-octanol. En tubos de vidrio con tapa a rosca se colocaron 5 mL de las soluciones acuosas de SA o FQ o FQ+SA, se adicionaron 5 mL de *n*-octanol saturado con buffer. El sistema fue agitado vigorosamente durante 1 minuto y mantenido con agitación durante 3 horas a 25 °C. Posteriormente, se centrifugaron los sistemas durante 10 minutos a 10000 rpm y se separaron las fases acuosas. Se determinó la absorbancia de cada una de las soluciones. Para determinar las concentraciones de los IFA, se calculó el $\log P_{ap}$ aplicando la **Ecuación 8.1**:

$$\log P_{ap} = \log \frac{(A_i - A_f) \cdot V_{ac}}{A_f \cdot V_{oct}} \quad \text{Ec. 8.1}$$

siendo A_i la absorbancia de la fase acuosa antes de la partición, A_f la absorbancia de la fase acuosa después de la partición, V_{ac} volumen de la fase acuosa y V_{oct} volumen de la fase octanólica.

8.4.2. SOLUBILIDAD EN EQUILIBRIO

Se determinó la solubilidad en equilibrio de los IFA, de las MF y de los sólidos multicomponentes mediante el método de saturación de Higuchi y Connor's (Higuchi et al., 1965). Los ensayos de solubilidad se realizaron en buffer pH 7,4 (FA 7 Ed.), por triplicado. Las muestras se prepararon añadiendo 15 mg de sólido (suficiente para obtener soluciones sobresaturadas) a 10 mL de la solución tamponada, en tubos de vidrio con tapa a rosca. Las muestras ensayadas fueron: NOR_{MPC} , CIP_{MPC} , SNA_{MPC} , SMX_{MPC} , $NOR_{LAG-ACN}$, $CIP_{LAG-ACN}$, $SNA_{LAG-ACN}$, $SMX_{LAG-ACN}$, $NOR+SMX_{MF}$, $CIP+SMX_{MF}$, $NOR-SMX_{LAG-ACN30'}$, $NOR-SMX_{LAG-ACN60'}$, $CIP-SMX_{LAG-ACN}$. La suspensión resultante en cada caso se sonizó con ultrasonido por 1 minuto. Posteriormente, los tubos se colocaron en un baño de agua termostatzado a 37 °C con tapa, se mantuvieron con agitación constante y protegidos de la luz ambiente. Se tomaron alícuotas de 1 mL a las 24, 48, 72 y 96 horas, con posterior reposición del solvente. Cada alícuota se

centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y se midió la absorbancia. Se determinó la concentración de cada alícuota mediante espectrofotometría UV-Vis de derivada primera, metodología validada según lo descrito en el **Capítulo 5**.

8.4.3. VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN

El ensayo de velocidad de disolución se llevó a cabo en un equipo de prueba de disolución (**Fig. 8.1**) SR8 Plus, Hanson Research, aplicando el método de disolución de polvo utilizando el aparato de disolución 2 (paleta) descrito en la FA 7 Ed. El sistema se mantuvo a $37,0 \pm 0,5$ °C con agitación constante a 150 rpm. Se pesaron 100 mg de los IFA a ensayar ($NOR_{LAG-ACN}$, $CIP_{LAG-ACN}$, $SMX_{LAG-ACN}$, $NOR+SMX_{MF}$, $CIP+SMX_{MF}$, $NOR-SMX_{LAG-ACN30'}$, $CIP-SMX_{LAG-ACN}$). Las pruebas se realizaron en 500 mL de buffer pH 7,4 FA 7 Ed., por duplicado. Se retiraron muestras de 3 mL a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. A fin de mantener el volumen constante, se repuso el volumen extraído con una cantidad equivalente de medio de disolución fresco, precalentado a $37,0 \pm 0,5$ °C. Las muestras se filtraron con membranas de acetato de $0,45 \mu m$ Millipore®. Las concentraciones de los IFA disueltos, se determinaron por espectrofotometría UV-Vis con espectro de derivada primera. Se obtuvieron los perfiles de disolución graficando el porcentaje (%) acumulativo medio del IFA disuelto en función del tiempo, para evaluar y comparar la velocidad de disolución de los IFA solos, de las MF y de los aductos.

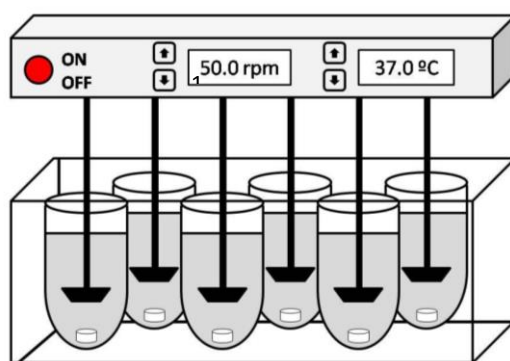


Figura 8.1. Esquema de un equipo de disolución (Volonté et al., 2013).

La cantidad acumulada de fármaco y medio extraído y eliminado del recipiente de disolución en cada intervalo de muestreo, puede ser lo suficientemente significativa como para afectar los resultados en intervalos de muestreo posteriores. Se deben aplicar correcciones matemáticas para determinar valores precisos, es decir, los valores que se habrían medido si no se hubiera extraído muestra de los recipientes (Salt, 2021). En el ensayo realizado se optó por reponer solvente fresco a 37,0 °C,

luego de cada toma de muestra. En este caso, el volumen del recipiente permanece constante durante toda la prueba de disolución y la corrección contemplada en la **Ecuación 8.2** tiene en cuenta la cantidad de fármaco extraído en cada intervalo de tiempo.

$$C_{n,corr} = C_n + \frac{V_s}{V_m} \int_{i=1}^{n-1} C_i$$

Ec. 8.2

Donde $C_{n,corr}$ es la concentración corregida en el intervalo de muestra n ; C_n es la concentración medida o no corregida en el intervalo de muestra n ; V_m es el volumen del medio original en el recipiente de disolución; V_s es el volumen de muestra extraído en cada intervalo de tiempo; y C_i es la concentración no corregida en cada intervalo previo de muestreo i .

Este método asegura que los datos de disolución reflejen con precisión la cantidad total de IFA disuelto, compensando el efecto de la dilución debido a la reposición del volumen en el sistema de disolución.

8.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.5.1. DETERMINACIÓN DEL LOG P_{AP}

Los resultados de la determinación del log P_{ap} medidos en un sistema de buffer fosfato de pH 7,4, se presentan a continuación.

En la **Tabla 8.1** se observan los valores promediados de absorbancia de las soluciones de CIP, NOR, SNA y SMX, comerciales, de concentración inicial 10,0 µg/mL (A_i) y los valores correspondientes, luego de la partición (A_f).

Tabla 8.1. Valores de longitud de onda, Absorbancia inicial y de Absorbancia luego de la partición, de las soluciones de FQ y SA.

	λ (nm)	A_i	A_f
CIP_{MPC}	271	1,1055	0,951
NOR_{MPC}	271	0,8365	0,7725
SNA_{MPC}	258	0,5165	0,361
SMX_{MPC}	257	0,562	0,449

A_i: absorbancia inicial, A_f: absorbancia final

Aplicando la **Ecuación 8.1** se calcularon los valores de P_{ap} y $\log P_{ap}$ de FQ y SA. Los mismos, junto a valores de P_{ap} y $\log P_{ap}$ medidos a pH cercanos a 7,4 hallados en bibliografía se exponen en la **Tabla 8.2**.

Tabla 8.2. Comparación entre los valores de $\log P_{ap}$ determinados experimentalmente y hallados en bibliografía de FQ y SA.

	Datos experimentales	Datos bibliográficos
	$\log P_{ap}$	$\log P_{ap}$
NOR	$-1,35 \pm 0,02$	-1,09 ^a
		-2,00 ^b
		-1,66 ^g
		-1,34 ^h
		-1,52 ⁱ
CIP	$-1,11 \pm 0,04$	-1,13 ^c
		-0,99 ^a
		-1,70 ^b
		-1,74 ^d
		-1,45 ^e
		-0,70 ^f
		-1,51 ^g
SNA	$-0,67 \pm 0,01$	-1,49 ^h
SMX	$-0,90 \pm 0,02$	-1,10 ⁱ
		-0,62 ⁱ
		-0,89 ⁱ

^apH 7,0 (Buffer fosfato 0,05 M), (Ross et al., 1992); ^bpH 7,2 (octanol y buffer fosfato 0,1 M), (Hirai et al., 1986); ^cpH 7,40 Tris hidroximetilaminometano 0,15 M (Montero et al., 1997); ^dCalculado usando el método descrito por Leo & col (1971), (Ross et al., 1990); ^eBuffer fosfato pH 7,0 (Escribano et al., 1997); ^fBuffer fosfato pH 7,2 (80 Mm de KH₂PO₄ y 77 Mm de NaCl), (Bazile S, 1992); ^gBuffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0 (Asuquo et al., 1993); ^h1-octanol y fosfato de sodio 0,1M, pH 7,2 (McCaffrey et al., 1992); ⁱ(Hansch et al., 1995); ^jpH 7 (Klosinska-Szmurlo et al., 2014).

Se observa que los cuatro IFA en estudio tienen carácter hidrofílico a pH 7,4, y la tendencia en orden decreciente es NOR_{MPC}, CIP_{MPC}, SMX_{MPC} y SNA_{MPC}. El valor de $\log P_{ap}$ hallado para NOR_{MPC} coincide con el publicado por McCaffrey et al., (1992). Se observa que el valor de $\log P_{ap}$ determinado para CIP_{MPC} es muy semejante a los valores publicados por Montero y col. (1997) y Klosinska-Szmurlo y col. (2014). Los valores de SNA_{MPC} y SMX_{MPC} son muy similares a los publicados por Hansch y col. (1995). Cabe destacar que, al tratarse de sustancias anfóteras, el valor de $\log P_{ap}$ es totalmente dependiente del pH del medio y por ello varían los valores reportados en la bibliografía.

En la **Tabla 8.3** se presentan los valores de $\log P_{ap}$ de las MF equimoleculares de NOR+SNA_{MF}, NOR+SMX_{MF}, CIP+SNA_{MF} y CIP+SMX_{MF}.

Tabla 8.3. Valores $\log P_{ap}$ determinados de mezclas FQ-SA

Mezcla	Datos experimentales	
	IFA	$\log P_{ap}$
NOR+SNA_{MF}	NOR	-0,28 ± 0,03
	SNA	-0,02 ± 0,01
NOR+SMX_{MF}	NOR	-0,13 ± 0,01
	SMX	-0,02 ± 0,01
CIP+SNA_{MF}	CIP	-0,18 ± 0,03
	SNA	-0,28 ± 0,01
CIP+SMX_{MF}	CIP	-0,20 ± 0,02
	SMX	-0,15 ± 0,03

En todos los casos se observa que el $\log P_{ap}$ de los IFA en las combinaciones es significativamente superior al de los IFA individuales a pH 7,4. Es decir que disminuye la hidrofilia de ambos IFA por la presencia del otro en la solución. Este comportamiento se explica mediante la formación de asociaciones moleculares de mayor lipofilia, justificada por la presencia simultánea de las especies zwitteriónica y neutra en el caso de las FQ y de especie neutra en el caso de las SA en solución, al pH de trabajo, que está próximo al punto isoeléctrico de ambos IFA (Klosinska-Szmurlo et al., 2014).

8.5.2. SOLUBILIDAD EN EQUILIBRIO

El estudio de solubilidad se realizó en buffer acuoso pH 7,4. Se seleccionó este valor de pH porque, independientemente de que el IFA sea ácido o básico, la mayor parte de su absorción ocurre en el intestino delgado (pH 6-8), y por lo tanto la determinación de la solubilidad a un pH medio, como es pH 7,4 es muy relevante (Gopi et al., 2016).

Se realizaron pruebas a las materias primas NOR_{MPC}, CIP_{MPC}, SNA_{MPC} y SMX_{MPC}. También se analizaron como prueba piloto las MF equimoleculares de FQ+SA y las obtenidas por LAG con ACN. Se tomó la decisión de priorizar las combinaciones NOR-SMX y CIP-SMX ya que son las que presentaron mejores resultados en el resto de las determinaciones experimentales y son de mayor relevancia clínica.

En la **Tabla 8.4** se observan los datos obtenidos de solubilidad a 48, 72 y 96 horas para los IFA: NOR_{MPC}, CIP_{MPC}, SNA_{MPC} y SMX_{MPC}.

Tabla 8.4. Concentraciones de IFA obtenidas a las 48, 72 y 96 horas.

IFA	Concentración (M)		
	48h	72h	96h
NOR_{MPC}	2,56 x10 ⁻³	3,11 x10 ⁻³	3,51 x10 ⁻³
CIP_{MPC}	5,85 x10 ⁻⁴	6,36 x10 ⁻⁴	6,56 x10 ⁻⁴
SNA_{MPC}	2,79 x10 ⁻²	5,41 x10 ⁻²	5,70 x10 ⁻²
SMX_{MPC}	2,03 x10 ⁻²	2,91 x10 ⁻²	3,02 x10 ⁻²

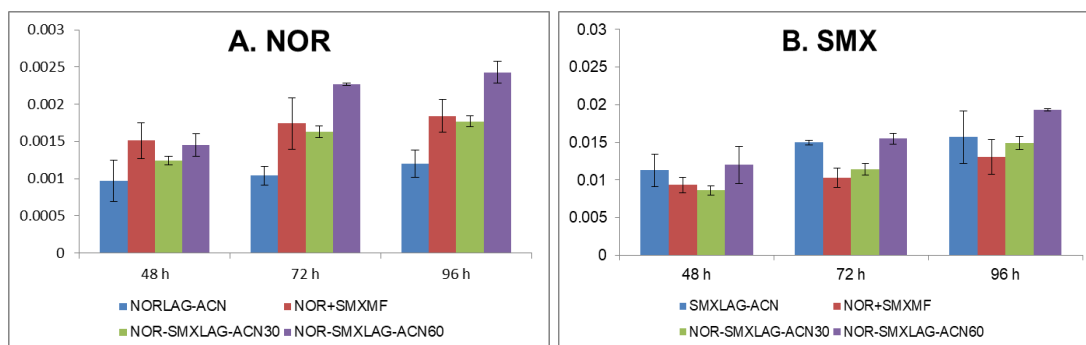
Según datos reportados en bibliografía, la solubilidad intrínseca de NOR es 1,0 x 10⁻³ M y la solubilidad de SMX a pH 7,0 es 0,08 M (Hekster et al., 1982). Nuestros resultados, obtenidos a un valor de pH levemente superior (7,4), indican que la solubilidad en equilibrio de NOR_{MPC} es 3,51 x 10⁻³ M y la de SMX_{MPC} es de 3,02 x 10⁻³ M.

En la **Tabla 8.5** se presentan los resultados del estudio de la solubilidad en solución acuosa a pH 7,4, del aducto NOR-SMX_{LAG-ACN} durante 30 y 60 minutos, en comparación con cada uno de los IFA que lo constituyen (NOR_{LAG-ACN} y SMX_{LAG-ACN}) y la MF equimolecular de ambos IFA.

Tabla 8.5. Concentraciones molares de solubilidad en equilibrio de: NOR_{LAG-ACN}, SMX_{LAG-ACN}, NOR+SMX_{MF}, NOR-SMX_{LAG-ACN30}, NOR-SMX_{LAG-ACN60} obtenidas a las 48, 72 y 96 horas.

		48 HS		72 HS		96 HS
NOR_{LAG-ACN}		9,67 X10 ⁻⁴	± 2,80 X10 ⁻⁴	1,04 X10 ⁻³	± 1,27 X10 ⁻⁴	1,20 X10 ⁻³ ±1,81 X10 ⁻⁴
SMX_{LAG-ACN}		1,13 x10 ⁻²	± 2,14 X10 ⁻³	1,55 X10 ⁻²	± 3,17 X10 ⁻⁴	1,57 X10 ⁻² ±9,73 X10 ⁻³
NOR+SMX_{MF}	NOR	1,24 X10 ⁻³	± 5,93 X10 ⁻⁵	1,63 X10 ⁻³	± 8,25 X10 ⁻⁵	1,77 X10 ⁻³ ±7,17 X10 ⁻⁵
	SMX	8,63 X10 ⁻³	± 6,15 X10 ⁻⁴	1,14 X10 ⁻²	± 7,66 X10 ⁻⁴	1,49 X10 ⁻² ±9,06 X10 ⁻⁴
NOR-SMX_{LAG-ACN30}	NOR	1,51 X10 ⁻³	± 2,39 X10 ⁻⁴	1,74 X10 ⁻³	± 3,42 X10 ⁻⁴	1,84 X10 ⁻³ ±2,20 X10 ⁻⁴
	SMX	9,33 X10 ⁻³	± 1,03 X10 ⁻³	1,03 X10 ⁻²	± 1,29 X10 ⁻³	1,31 X10 ⁻² ±2,30 X10 ⁻³
NOR-SMX_{LAG-ACN60}	NOR	1,45 X10 ⁻³	± 1,48 X10 ⁻⁴	2,27 X10 ⁻³	± 1,41 X10 ⁻⁵	2,43 X10 ⁻³ ±5,89 X10 ⁻⁴
	SMX	1,20X10 ⁻²	± 2,44 X10 ⁻³	1,50 X10 ⁻²	± 7,24 X10 ⁻⁴	1,93 X10 ⁻² ±1,42 X10 ⁻⁴

Los resultados obtenidos para NOR se visualizan en la **Figura 8.2.A** y los de SMX en la **Figura 8.2.B**. En ambos casos se compara la concentración de IFA, en forma individual, en la MF y en el producto de la molienda asistida por ACN de 30 y 60 minutos, que se logró disolver en los tres períodos de tiempo.



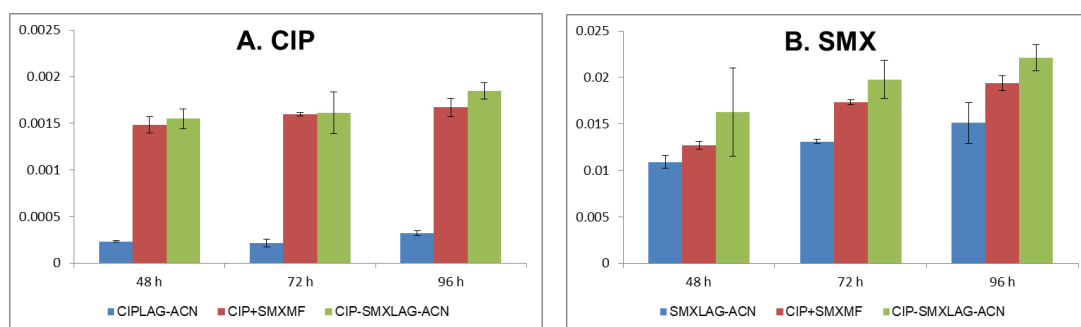
Figuras 8.2. Concentraciones molares de solubilidad en equilibrio de A. NOR y B. SMX obtenidas a las 48, 72 y 96 horas.

Se observa que la solubilidad de NOR en presencia de SMX_L , a las 96 horas, es muy similar en la MF y en el aducto molido durante 30 minutos, y en ambos casos es superior a la solubilidad del IFA individual en un 47 % y 53 % respectivamente. Por otra parte, la solubilidad de NOR en el aducto molido durante 60 minutos es considerablemente mayor, observándose un aumento del 102 % en el complejo molecular, respecto a $NOR_{LAG-ACN}$.

La solubilidad de SMX en presencia de NOR, asciende hasta $1,93 \times 10^{-2}$ M, representando un incremento de su solubilidad del 23 % en el aducto $NOR-SMX_{LAG-ACN60}$ respecto a $SMX_{LAG-ACN}$. Además, se observó una disminución en la solubilidad de SMX en la MF y en $NOR-SMX_{LAG-ACN30}$ de un 5 % y 16 % respectivamente, en comparación con su valor de solubilidad original $1,57 \times 10^{-2}$ M (Figura 8.2.B).

Tabla 8.6. Concentraciones molares de solubilidad en equilibrio de: $CIP_{LAG-ACN}$, $SMX_{LAG-ACN}$, $CIP+SMX_{MF}$ y $CIP-SMX_{LAG-ACN}$ a las 24, 48, 72 y 96 horas.

		48 h		72 h		96 h	
$CIP_{LAG-ACN}$		$2,32 \times 10^{-4}$	$\pm 9,19 \times 10^{-6}$	$2,16 \times 10^{-4}$	$\pm 4,17 \times 10^{-5}$	$3,17 \times 10^{-4}$	$\pm 2,67 \times 10^{-5}$
$SMX_{LAG-ACN}$		$1,09 \times 10^{-2}$	$\pm 6,68 \times 10^{-4}$	$1,31 \times 10^{-2}$	$\pm 2,08 \times 10^{-4}$	$1,51 \times 10^{-2}$	$\pm 2,19 \times 10^{-3}$
$CIP+SMX_{MF}$	CIP	$1,48 \times 10^{-3}$	$\pm 8,70 \times 10^{-5}$	$1,60 \times 10^{-3}$	$\pm 1,93 \times 10^{-5}$	$1,67 \times 10^{-3}$	$\pm 9,80 \times 10^{-5}$
	SMX	$1,27 \times 10^{-2}$	$\pm 4,14 \times 10^{-4}$	$1,73 \times 10^{-2}$	$\pm 2,67 \times 10^{-4}$	$1,94 \times 10^{-2}$	$\pm 8,11 \times 10^{-4}$
$CIP-SMX_{LAG-ACN}$	CIP	$1,55 \times 10^{-3}$	$\pm 1,06 \times 10^{-4}$	$1,61 \times 10^{-3}$	$\pm 2,25 \times 10^{-4}$	$1,85 \times 10^{-3}$	$\pm 8,70 \times 10^{-5}$
	SMX	$1,63 \times 10^{-2}$	$\pm 4,75 \times 10^{-3}$	$1,98 \times 10^{-2}$	$\pm 2,05 \times 10^{-3}$	$2,21 \times 10^{-2}$	$\pm 1,39 \times 10^{-3}$



Figuras 8.3. Concentraciones molares de solubilidad en equilibrio de A. CIP y B. SMX obtenidas a las 48, 72 y 96 horas.

Los resultados del ensayo de solubilidad de $\text{CIP}_{\text{LAG-ACN}}$, $\text{SMX}_{\text{LAG-ACN}}$, $\text{CIP+SMX}_{\text{MF}}$, $\text{CIP-SMX}_{\text{LAG-ACN}}$ se muestran en la **Tabla 8.6** y en la **Figura 8.3**. En ambos casos se compara la concentración de IFA, en forma individual, en la MF equimolar y en el producto de LAG con ACN durante 30, que se disolvió en los tres períodos de tiempo.

La solubilidad de CIP, registrada a las 96 horas, se incrementa en un 426 % en la MF y en un 483 % en $\text{CIP-SMX}_{\text{LAG-ACN}}$. Por otra parte, la solubilidad de SMX proveniente de la MF supera en un 28 % a la solubilidad del $\text{SMX}_{\text{LAG-ACN}}$, y SMX proveniente de $\text{CIP-SMX}_{\text{LAG-ACN}}$ en un 46 %.

Se observa un incremento significativo de la solubilidad de los dos componentes, tanto en la MF como en el sólido multicomponente, respecto a los compuestos puros. El incremento de solubilidad se hace más considerable para CIP. Estos datos son consistentes con la disminución del Punto de Fusión (PF) del sólido multicomponente, comparado con los puntos de fusión de los IFA individuales, que se muestra en el **Capítulo 7** (Gopi et al., 2016). Es posible afirmar que el aducto $\text{CIP-SMX}_{\text{LAG-ACN}30'}$, se disuelve proporcionando una solución con una concentración superior, en comparación con las correspondientes formas cristalinas obtenidas de manera individual o una MF de ellas.

Estos resultados ponen en evidencia que la formación de cocristales podría mejorar la solubilidad de uno o ambos componentes impactando positivamente sobre la BD de estos IFA.

8.5.3. VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN

En las figuras **8.4 A y B** y **8.5 A y B** se observa el perfil de disolución en buffer acuoso de pH 7,4 de $\text{NOR}_{\text{LAG-ACN}}$, $\text{SMX}_{\text{LAG-ACN}}$, $\text{CIP}_{\text{LAG-ACN}}$, $\text{NOR+SMX}_{\text{MF}}$, $\text{NOR-SMX}_{\text{LAG-ACN}}$, $\text{CIP+SMX}_{\text{MF}}$ y $\text{CIP-SMX}_{\text{LAG-ACN}}$.

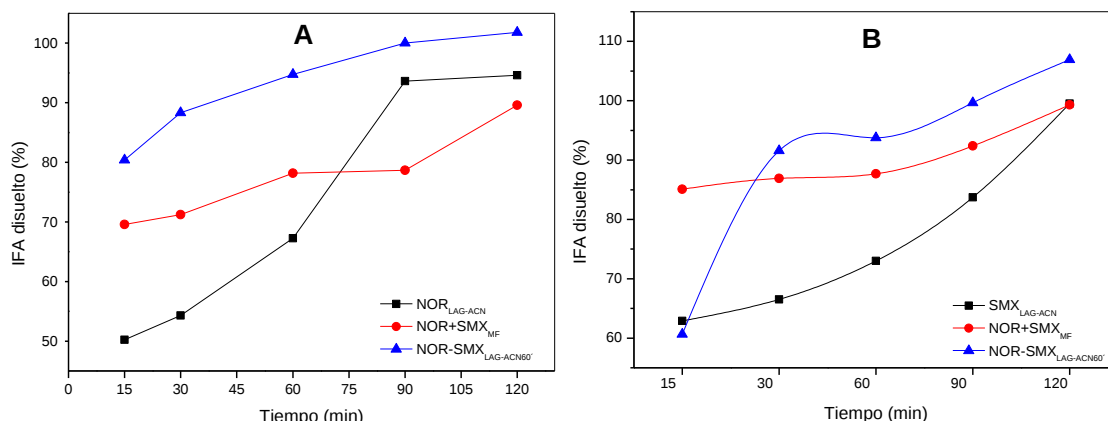


Figura 8.4. Porcentaje de IFA disuelto de A. NOR y B. SMX: en 15, 30, 60, 90 y 120 min proveniente del IFA individual, de NOR+SMX_{MF} y de NOR-SMX_{LAG-ACN}.

Se observa que, durante los primeros 60 minutos de ensayo, la solubilidad de NOR_{LAG-ACN} es menor que para NOR en la MF con SMX, luego se invierte esta relación viéndose favorecida la solubilidad de NOR_{LAG-ACN} y superando el 90 % de sólido disuelto a partir de los 90'. Por otra parte, la solubilidad de NOR proveniente del sólido multicomponente es significativamente mayor durante todo el período de tiempo del ensayo alcanzando el 80 % de disolución a los 15 minutos y superando el 90 % a partir de los 30' (**Figura 8.4.A**).

La solubilidad de SMX en el aducto prácticamente es igual a la de SMX_{LAG-ACN} al comienzo del ensayo, la solubilidad de SMX en la MF es mayor (80 %) con respecto a los otros dos. Posteriormente, SMX en NOR-SMX_{LAG-ACN} presenta la mayor solubilidad, seguida de SMX en la MF y de SMX_{LAG-ACN} superando el 90 % de IFA disuelto a partir de los 60' (**Figura 8.4.B**).

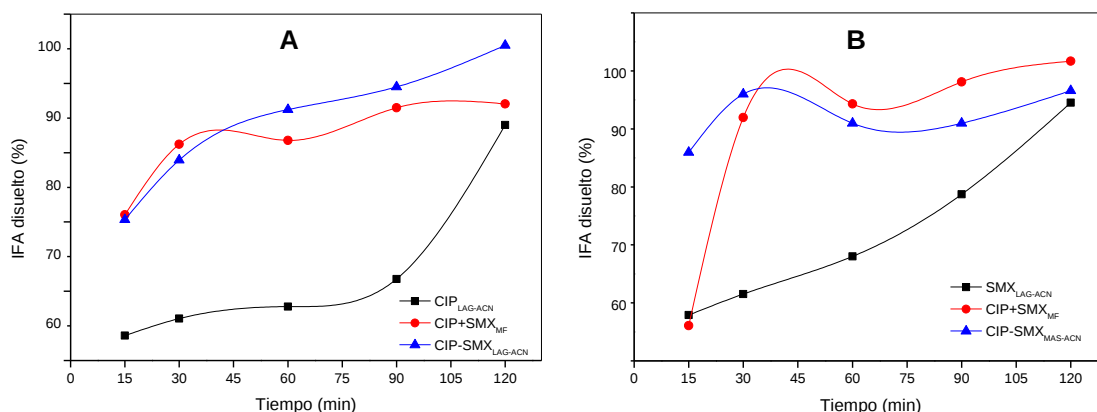


Figura 8.5. Porcentaje de IFA disuelto A. CIP y B. SMX: en 15, 30, 60, 90 y 120 min proveniente del IFA individual, de CIP+SMX_{MF} y de CIP-SMX_{LAG-ACN}.

CIP en el aducto CIP-SMX_{LAG-ACN} presenta una solubilidad semejante a CIP en la MF durante los primeros 30 minutos de ensayo. A partir de los 45 minutos el porcentaje disuelto de CIP en CIP-SMX_{LAG-ACN} se hace considerablemente mayor, alcanzando el 100 % de disolución a los 120 minutos (**Figura 8.5.A**).

Este comportamiento es coincidente con el descrito en el ensayo de solubilidad en equilibrio (**Sección 8.5.2**), donde también se observa un gran incremento en la solubilidad de los IFA en las MF equimoleculares y, principalmente, en los sólidos multicomponentes. El aducto más favorecido es CIP-SMX_{LAG-ACN}. Cabe destacar que este sistema presenta un PF inferior al de los IFA que le dan origen (**Sección 7.7.2, Tabla 7.7**), esto significa que las uniones intermoleculares son de menor energía en el estado sólido y por lo tanto el compuesto es más fácilmente solubilizable.

Durante el primer período de tiempo, SMX en CIP-SMX_{LAG-ACN} presentó la mayor velocidad de disolución, superando el 85 % de IFA disuelto. A partir de los 60 minutos, el porcentaje de SMX disuelto fue mayor para SMX proveniente de la MF (**Figura 8.5.B**).

Cabe destacar que, en todos los casos, tanto los componentes de las MF como los de los sólidos multicomponentes, presentan una ventaja significativa en la velocidad de disolución respecto a los IFA individuales.

En general, se observa que los factores estructurales que aumentan la solubilidad de un IFA tienden a disminuir su permeabilidad y viceversa. Esto ocurre porque las propiedades mencionadas están directamente relacionadas con el carácter iónico/no polar de la molécula del IFA. Es así que, cuanto más polar sea la molécula, mayor solubilidad en agua tendrá y menor permeabilidad a través de una membrana lipofílica. Esto, en esencia, constituye la dicotomía solubilidad versus permeabilidad. El aumento en uno de estos atributos tiende a disminuir el otro y, no obstante, lo ideal es mejorar armónicamente ambos para mejorar la BD (Gunnarn et al., 2023).

Sin embargo, existen numerosos ejemplos en la literatura que dan cuenta de que las características de solubilidad y permeabilidad de muchos cocrisales farmacéuticos son más favorables que de las del IFA original (Ferreira et al., 2023; Pinto Vitorino et al., 2019; Tupe et al., 2023). Partiendo del supuesto de que un cocrystal o una sal farmacéutica no se encuentran completamente disociados en solución (Chakraborty, 2022), cabe esperar que tengan un mayor carácter lipofílico que el IFA correspondiente dado que los grupos polares estarán comprometidos en las uniones iónicas o de puente hidrógeno intermoleculares y, en consecuencia, estarán menos expuestos al agua tras la asociación con el COF.

Análogamente, la formación de una sal con posibilidad de formación de uniones puente hidrógeno intermoleculares con el agua, incrementará el carácter hidrofílico y la solubilidad en agua (Nangia et al., 2022).

Los zwitteriones, al igual que las especies neutras, forman agregados moleculares. En el caso de los zwitteriones, las moléculas se asocian de forma antiparalela, es decir que el grupo funcional aniónico de una de ellas interactúa, mediante uniones iónicas y puente hidrógeno, con el grupo funcional catiónico de otra molécula y viceversa. Con las moléculas interactuando de esta forma se compensa el campo eléctrico de la otra molécula. De este modo, se reduce el potencial neto, y aumenta la liposolubilidad, favoreciendo la difusión de los IFA a través de la bicapa al interior de la célula. La formación de agregados moleculares también fue informada para las especies neutras. Este hecho da lugar a una elevada permeación de las FQ a través de las membranas celulares, tanto para las formas zwitteriónicas como para las formas neutras mediante transporte pasivo (Czyrski, 2022). Los resultados obtenidos, en este ensayo y los descritos en la **Sección 6.5.3.1** dan cuenta de que este comportamiento es altamente favorecido, a pH 7,4, por la presencia de SA, en virtud de que se evidencia mayor lipofilia, hidrosolubilidad y velocidad de disolución.

Por otra parte, Bavishi y col. (2016) explican el aumento de solubilidad de los sólidos multicomponentes (cocristales, sales, etc.) argumentando que, tras la disociación gradual, el componente más soluble en agua (COF) abandona la red cristalina y se disuelve en el medio acuoso. De este modo, las moléculas hidrófobas del IFA se sobresaturan transitoriamente en el medio acuoso generando un estado de alta energía denominado “resorte”. Dado que el estado sobresaturado es una condición termodinámicamente inestable, el IFA precipita rápidamente (en minutos a una hora) para dar agrupaciones moleculares, y finalmente alcanza la solubilidad en equilibrio de la forma cristalina. Para obtener los beneficios del estado sobresaturado *in vivo*, debe mantenerse durante un período de tiempo suficiente para que se produzca la absorción, lo cual puede requerir una inhibición de la precipitación mediante el uso de excipientes farmacéuticos u otros componentes que intervienen en la nucleación y el crecimiento de cristales; a los inhibidores de la precipitación del IFA se los denomina “paracaídas”. La solución rica en fase amorfa de alta energía se transformará en un polimorfo metaestable del IFA, que tendrá una mayor solubilidad y finalmente en una forma estable siguiendo la Ley de Etapas de Ostwald. Este proceso se conoce con el nombre en inglés de “*spring-parachute effect*” (Bavishi et al., 2016; Karagianni et al., 2018).

8.6. CONCLUSIONES

Los cocristales pueden ser una solución para la industria farmacéutica que trabaja con fármacos poco solubles. Su principal ventaja es que mejoran la solubilidad y la disolución de fármacos poco solubles sin alterar su estructura molecular.

La solubilidad, la liposolubilidad y la velocidad de disolución son propiedades biofarmacéuticas que impactan directamente en la BD y la eficacia terapéutica de los IFA. NOR, CIP y SMX están clasificados dentro del grupo IV del SCB, es decir que presentan baja solubilidad y baja permeabilidad, aunque dado que la solubilidad varía con el pH del medio, por tratarse de sustancias anfotéricas, algunos autores clasifican a CIP dentro del grupo III. De cualquier modo, sus propiedades demarcan limitaciones en la BD.

Se observó que las MF equimoleculares de las FQ y SA trabajadas generan un aumento en la hidrosolubilidad, lipofilicidad y velocidad de disolución, en comparación con los IFA individuales. Además, todos los sólidos multicomponentes formados muestran mejoras significativamente más importantes en las mencionadas propiedades biofarmacéuticas, destacado el potencial de estas estrategias aplicadas, enmarcadas en el ámbito de la química supramolecular, como aptas para optimizar las propiedades biofarmacéuticas de estos agentes antibacterianos. Este efecto probablemente se deba a la formación de agregados moleculares hidrosolubles reportados en el **Capítulo 6, Sección 6.5.3.1**.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, permitirían proponer que NOR, CIP y SMX formando MF o sólidos multicomponentes entre sí, podrían clasificarse en el grupo I del SCB.

8.7. BIBLIOGRAFÍA

Ahumada, A.; Seeck, J.; Allemandi, D.; Manzo, R. The pH/solubility profile of norfloxacin. *S. T. P. Pharm. Sci.* **1993**, 3, 250–253.

Asuquo, A. E.; Piddock, L. J. Accumulation and Killing Kinetics of Fifteen Quinolones for Escherichia Coli, Staphylococcus Aureus and Pseudomonas Aeruginosa. *J. Antimicrob. Chemother.* **1993**, 31 (6), 865–880. <https://doi.org/10.1093/jac/31.6.865>.

Basavoju, S.; Boström, D.; Velaga, S. P. Pharmaceutical Cocrystal and Salts of Norfloxacin. *Cryst. Growth Des.* **2006**, 6 (12), 2699–2708. <https://doi.org/10.1021/cg060327x>.

Bavishi, D. D.; Borkhataria, C. H. Spring and parachute: How cocrystals enhance solubility. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, **2016**, 62, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2016.07.001>

Bazile, S.; Moreau, N.; Bouzard, D.; Essiz, M. Relationships Among Antibacterial Activity, Inhibition of DNA Gyrase, and Intracellular Accumulation of 11 Fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1992**, 36, 2622–2627.

Breda, S. A.; Jimenez-Kairuz, A. F.; Manzo, R. H.; Olivera, M. E. Solubility Behavior and Biopharmaceutical Classification of Novel High-Solubility Ciprofloxacin and Norfloxacin Pharmaceutical Derivatives. *Int. J. Pharm.* **2009**, 371 (1–2), 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.12.026>.

Chakraborty, S.; Dhibar, M.; Pani, A. Crystal Engineering and Its Chemistry: An Architectural Approach for Cocrystallization. *Current Materials Science* **2022**, 15 (3), 251–264. <https://doi.org/10.2174/2666145415666220317124358>.

Czyrski, A. The spectrophotometric determination of lipophilicity and dissociation constants of ciprofloxacin and levofloxacin. *Spectrochim. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2022**, 120343. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120343>

Delgado, D. R. Estudio Termodinámico de La Solubilidad de Algunas Sulfonamidas Sódicas En Mezclas Cosolventes Etanol + Agua. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. 2011. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3929.2002>.

Escribano, E.; Calpena, A. C.; Garrigues, T. M.; Freixas, J.; Domenech, J.; Moreno, J. Structure Absorption Relationships of a Series of 6-Fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1997**, 41, 1996-2000

Fallati, C.; Ahumada, A.; Manzo, R. El perfil de solubilidad de la Ciprofloxacina en función del pH. *Acta Farm. Bonaer.* **1994**, 13, 73–77

Ferreira, P. O.; de Almeida, A. C.; Costa, G. de P.; Torquetti, C.; Baptista, J. A.; Eusébio, M. E. S.; Caires, F. J.; Castro, R. A. E. Norfloxacin Cocrystals: Mechanochemical Synthesis and Scale-up Viability through Solubility Studies. *J. Pharm. Sci.* **2023**, 112 (8), 2230–2239. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.03.003>

Good, D. J.; Rodríguez-Hornedo, N. Solubility Advantage of Pharmaceutical Cocrystals. *Cryst. Growth Des.* **2009**, 9 (5), 2252–2264. <https://doi.org/10.1021/cg801039j>.

Gopi, S. P.; Ganguly, S.; Desiraju, G. R. A Drug-Drug Salt Hydrate of Norfloxacin and Sulfathiazole: Enhancement of in Vitro Biological Properties via Improved Physicochemical Properties. *Mol. Pharm.* **2016**, 13 (10), 3590–3594. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00320>.

Gunnam, A., Nangia, A.K. Novel Hydrate and Anhydrate Cocrystals/Salts of Norfloxacin and 2 Their Physicochemical Properties. *Cryst. Growth Des.* **2023**, 23, 6, 4198–4213. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.3c00023>.

Hansch, C., Leo, A., D. Hoekman. Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. Washington, DC: American Chemical Society., 1995., p. 71.

Hekster C.A.; Vree T.V. Antibiot. *Chemother.* **1982**, 31, 21-118.

Higuchi, T.; Connors, K.A. Phase Solubility Techniques: Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation. *Adv. Anal. Chem. Instr.* **1965**, 4, 117-212.

Hirai, K.; Aoyama, H.; Irikura, T.; Iyobe, S.; Mitsuhashi, S. Differences in Susceptibility to Quinolones of Outer Membrane Mutants of Salmonella Typhimurium and Escherichia Coli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1986**, 30 (2), 342–342. <https://doi.org/10.1128/aac.30.2.342>.

Karagianni, A., Malamataris, M., Kachrimanis, K. Pharmaceutical Cocrystals: New Solid Phase Modification Approaches for the Formulation of APIs. *Pharm.*, **2018**, 10, 18; doi:10.3390/pharmaceutics10010018.

Kłosinska-Szumło, E., Plucinski, F.A., Grudzien, M. Betlejewska-Kielak, K, Biernacka, J., Mazurek, A.P. Experimental and theoretical studies on the molecular properties of ciprofloxacin, norfloxacin, pefloxacin, sparfloxacin, and gatifloxacin in determining bioavailability. *J. Biol. Phys.* **2014**, 40, 335– 345. 10.1007/s10867-014-9354-z.

Li, X.; Zhi, F.; Hu, Y. Investigation of Excipient and Processing on Solid Phase Transformation and Dissolution of Ciprofloxacin. *Int. J. Pharm.* **2007**, 328 (2), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.08.012>.

Martínez, F.; Rojas, J.; Perilla, J.; Gómez, A. Efecto de la miscibilidad parcial entre octanol y agua sobre la solubilidad y el reparto de algunas sulfonamidas. *Revista Colombiana de Química.* **2001**, 30(1), 59-71.

Martínez-Alejo, J. M.; Domínguez-Chávez, J. G.; Rivera-Islas, J.; Herrera-Ruiz, D.; Höpfl, H.; Morales-Rojas, H.; Senosiain, J. P. A Twist in Cocrystals of Salts: Changes in Packing and Chloride Coordination Lead to Opposite Trends in the Biopharmaceutical Performance of Fluoroquinolone Hydrochloride Cocrystals. *Cryst. Growth Des.* **2014**, 14 (6), 3078–3095. <https://doi.org/10.1021/cg500345a>.

McCaffrey, C.; Bertasso, A.; Pace, J.; Georgopapadakou, N. H. Quinolone Accumulation in *Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, and *Staphylococcus Aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, 36 (8), 1601–1605. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.8.1601>.

Montero MT, Freixas J, Hernández-Borrel J. Expression of the Partition Coefficients of a Homologous Series of 6-Fluoroquinolones. *Int. J. Pharm.* **1997**, 149, 161-70.

Nangia, A.K., Desiraju, G.R. Heterosynthons, Solid Form Design and Enhanced Drug Bioavailability. *Angew. Chem.* **2022**, 134, e202207484. <https://doi.org/10.1002/anie.202207484>.

OECD (1995), *Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069626-en>.

Pinto Vitorino, G.; Mazzieri, M.R. Chapter 1: “The Challenge of Improving the Bioavailability of Ciprofloxacin by Supramolecular Engineering”, in: “Ciprofloxacin: Biosynthesis, Applications, and Adverse Effects”. M. S. Attia editor. Nova Science Publishers, Inc.: USA. 2019. ISBN: 978-1-53614-534-2.

Prashar, M.; Mehta, V.; Singh, P.; Mangal, S.; Arora, P.; Harjai, K.; Chadha, R.; Dhingra, N. Structural and Biopharmaceutical Evaluation of Newly Synthesized Norfloxacin Co-Crystals Using Crystal Engineering Approach. *J. Mol. Struct.* **2023**, 1292, 136-175. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.136175>.

Ross, D. L.; Riley, C. M. Physicochemical Properties of the Fluoroquinolone Antimicrobials. II. Acid Ionization Constants and Their Relationship to Structure. *Int. J. Pharm.* **1992**, 83 (1–3), 267–272. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(82\)90032-1](https://doi.org/10.1016/0378-5173(82)90032-1).

Ross, D.; Riley, C. Aqueous Solubilities of Some Various Substituted Quinolone Antimicrobials. *Int. J. Pharm.* **1990**, 63 (3), 237–250. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90130-v](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90130-v).

Salt, A. A Data Set to Verify Volume and Sample Removal Correction Calculations for Dissolution Testing. *Dissolution Technol.* **2021**, 28 (2), 16–20. <https://doi.org/10.14227/dt280221p16>.

Takács-Novák, K.; Józán, M.; Hermecz, I.; Szász, G. Lipophilicity of Antibacterial Fluoroquinolones. *Int. J. Pharm.* **1992**, 79 (1–3), 89–96. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90099-n](https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90099-n)

Tupe, S. A.; Khandagale, S. P.; Jadhav, A. B. Pharmaceutical Cocrystals: An Emerging Approach to Modulate Physicochemical Properties of Active Pharmaceutical Ingredients. *J. Drug Deliv. Ther.* **2023**, 13 (4), 101–112. <https://doi.org/10.22270/jddt.v13i4.6016>.

Volonté M. G; Quiroga P. Análisis Farmacéutico. *Facultad de Ciencias Exactas*. **2013**. *Análisis farmacéutico*; Volonté, M. G., Quiroga, P., Eds.; Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP), 2013.

Yu, X.; Zipp, G. L.; Davidson, G. W., 3rd. The Effect of Temperature and pH on the Solubility of Quinolone Compounds: Estimation of Heat of Fusion. *Pharm. Res.* **1994**, 11 (4), 522–527. <https://doi.org/10.1023/a:1018910431216>.

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

9.1. CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral se abordó el desafío de optimizar las propiedades biofarmacéuticas y farmacéuticas de Fluoroquinolonas (FQ) y Sulfonamidas Antibacterianas (SA), dos grupos de antibióticos que presentan limitaciones relacionadas con su baja solubilidad y permeabilidad. Para ello, se aplicaron estrategias de química supramolecular y de ingeniería de cristales, con especial énfasis en la síntesis de sólidos multicomponentes.

El trabajo se centró en la cocrystalización como herramienta para mejorar las características fisicoquímicas de los Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA), aprovechando la tendencia de las FQ y SA a formar complejos supramoleculares mediante interacciones no covalentes. Se seleccionaron y caracterizaron los IFA identificando la presencia de polimorfos específicos, lo que permitió establecer la viabilidad de cada material para su empleo en el diseño de nuevas formas sólidas. Y para la selección de los coformadores (COF), se consideraron los compuestos que integran el listado de sustancias GRAS (del inglés: *Generally Recognized as Safe*), la tendencia a formar enlaces de tipo puente de hidrógeno, la capacidad de generar homo o heterosintones y las diferencias entre los valores de pKa de los grupos ionizables del COF y los presentes en los IFA.

Además, se desarrolló y validó un método analítico basado en espectrofotometría UV-Vis de derivada de primer orden (zero crossing) para la cuantificación simultánea de FQ y SA, destacándose por su linealidad, precisión, selectividad y exactitud.

Se evaluó el comportamiento en solución de los IFA y de combinaciones IFA-IFA, demostrando la capacidad de formación de heterocomplejos entre FQ y SA en el rango de concentraciones estudiadas. Además, se evaluaron las posibilidades de interacción de los IFA y sus combinaciones, con el solvente y con mezclas binarias de

solventes. Estos estudios permitieron recabar información acerca de la tendencia de estos IFA a participar de interacciones intermoleculares.

Mediante la aplicación de técnicas de cocrystalización por molienda asistida con acetonitrilo o difusión de vapor de ácido acético, se logró obtener nueve sólidos multicomponentes de los cuales cinco se caracterizaron con detalle y se deduce que podrían constituir cocrisales o sales moleculares. Ellos son:

NOR-SMX_{LAG-ACN} que forma un cocrystal en el que predominan las especies en su forma no ionizada. La interacción molecular ocurriría entre los grupos C=O y OH de NOR con el átomo de H del grupo SO₂NH de SMX.

NOR-SNA_{LAG-ACN} es un nuevo aducto molecular que podría clasificarse en la categoría de cocrisales iónicos, dado que la interacción entre sus componentes se produciría mediante el grupo COO⁻ de NOR y el grupo NH₃⁺ del grupo sulfonamido de SNA. Se observó además que se requiere de 60 minutos de molienda para su formación.

CIP-SMX_{LAG-ACN} forma una nueva fase cristalina en la que SMX interactuaría a través del grupo SO₂ con el grupo NH₂⁺ de CIP. En este caso el aducto obtenido podría ser un cocrystal iónico.

CIP-SNA_{LAG-ACN} podría ser una mezcla física o eutéctico. Se concluyó que, utilizando la técnica de molienda asistida por acetonitrilo por 30 minutos, tanto CIP como SNA no cocrystalizan.

NOR-CIT_{LAG-ACN} forma una nueva fase cristalina en la que la interacción ocurriría entre los grupos funcionales COOH y F de NOR y COOH y OH de CIT.

Se evaluaron las propiedades biofarmacéuticas de los sólidos multicomponentes obtenidos. Entre ellos se destacan los aductos NOR-SMX_{LAG-ACN} y CIP-SMX_{LAG-ACN}, observándose un aumento muy significativo en la solubilidad, lipofilicidad y velocidad de disolución en comparación con los IFA individuales. Estos resultados confirman que la estrategia de cocrystalización o formación de sales moleculares permite superar las limitaciones biofarmacéuticas originales, optimizando el perfil farmacéutico de los derivados diseñados.

Todos los planteos y las determinaciones experimentales estuvieron sustentados por una constante búsqueda bibliográfica, dada la gran cantidad y variedad de bibliografía existente del tema, por tratarse de IFA muy estudiados.

En conclusión, estos resultados generan expectativas promisorias en el uso clínico, aumentando la eficacia terapéutica y disminuyendo la toxicidad y resistencia antibacteriana.

9.2. PROYECCIONES

En virtud de que los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral son muy alentadores y permitieron lograr los objetivos propuestos y confirmar la hipótesis planteada en el plan de trabajo, surgen varias aristas para profundizar diversos aspectos y se podrían plantear futuras actividades relacionadas con:

- a. Elucidación de las estructuras tridimensionales de los aductos obtenidos, aplicando ^{13}C -RMN-ES y DRXM.
- b. Caracterización de la mezcla CIP-SNA con 60 minutos de molienda en presencia de ACN
- c. Evaluación la velocidad de disolución de los aductos, a diferentes pH fisiológicos
- d. Profundización en los estudios de mecanismo cinético de la disolución de cada aducto.
- e. Finalización de la caracterización de los sistemas multicomponentes NOR-MAL_{LAG-ACN}, NOR-TART_{LAG-ACN}, CIP-NIC_{Dif-AcOH} y CIP-TART_{Dif-AcOH}.
- f. Realizar ensayos de permeabilidad a los aductos obtenidos.

ANEXO

En el siguiente anexo se exponen otras combinaciones IFA-GRAS realizadas que fueron parcialmente caracterizadas y cuyo análisis debería completarse con nuevos ensayos.

NOR-TART_{LAG-ACN}

En la **Fig. A.1** se observan las imágenes tomadas en el microscopio óptico y en el microscopio con luz polarizada, al producto obtenido de la molienda de NOR y TART con acetonitrilo durante 30 minutos. El producto es parcialmente amorfo con pequeñas regiones de cristalización.



Figura A.1. Imágenes de NOR-TART: **A.** NOR-TART_{LAG-ACN} (5X), **B.** NOR-TART_{LAG-ACN} (20X) y **C.** NOR-TART_{LAG-ACN} con luz polarizada (20X).

En la **Tabla A.1** se presentan los datos obtenidos de estudios térmicos realizados sobre: NOR_{LAG-ACN}, TART_{LAG-ACN}, NOR+TART_{MF}, NOR-TART_{LAG-ACN}.

Tabla A.1. Temperatura de Fusión y Temperatura de inicio extrapolada de: NOR_{LAG-ACN}, TART_{LAG-ACN}, NOR+TART_{MF}, NOR-TART_{LAG-ACN}.

	TF (°C)	T _{ie} (°C)
NOR _{LAG-ACN}	217,2-221,1	215,17
TART _{LAG-ACN}	167,9-171,4	171,29
NOR+TART _{MF}		154,19/184,86
NOR-TART _{LAG-ACN}		158,16/168,26

TF: Temperatura de Fusión; T_{ie}: Temperatura de inicio extrapolada

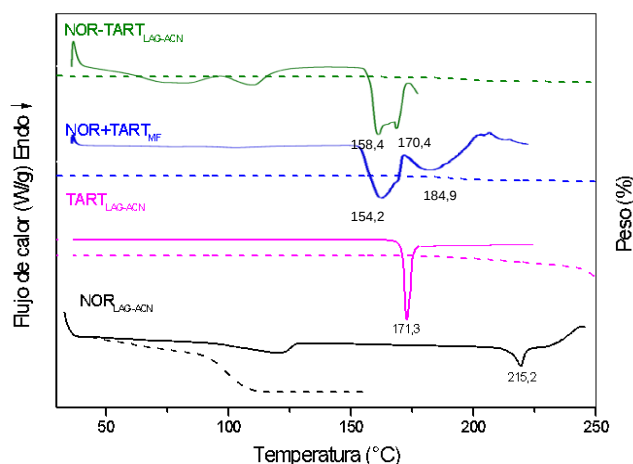


Figura A.2. Curvas DSC y TG ($\beta = 10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, flujo de $\text{N}_2 = 50\text{ mL/min}$) de: $\text{NOR}_{\text{LAG-ACN}}$, $\text{TART}_{\text{LAG-ACN}}$, $\text{NOR}+\text{TART}_{\text{MF}}$, $\text{NOR-TART}_{\text{LAG-ACN}}$.

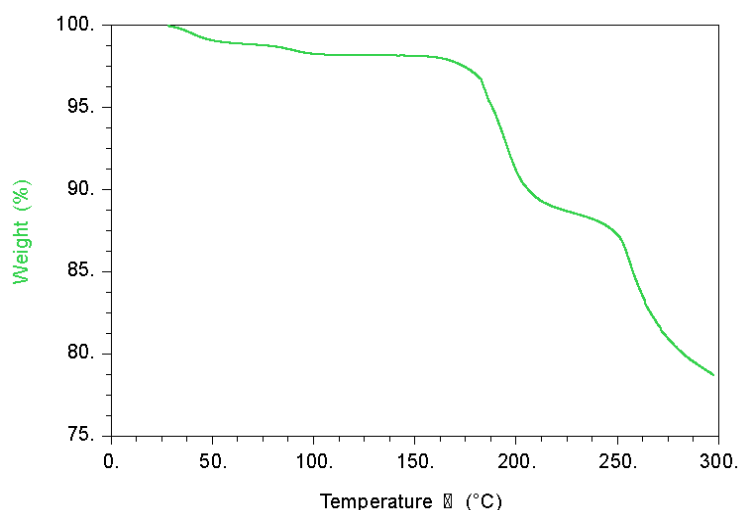


Figura A.3. Curvas TG ($\beta = 10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, flujo de $\text{N}_2 = 50\text{ mL/min}$) de: $\text{NOR-TART}_{\text{LAG-ACN}}$.

Analizando los resultados obtenidos para $\text{NOR-TART}_{\text{LAG-ACN}}$ en las curvas DSC y TG (**Figura A.2**), se observó que $\text{NOR-TART}_{\text{LAG-ACN}}$ presenta un pequeño evento endotérmico en $T_{\text{ie}} = 105,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguido de un evento endotérmico más ancho y pronunciado constituido por la superposición de dos picos de $T_{\text{ie}} = 158,16\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{p}} = 160,38\text{ }^{\circ}\text{C}$) y $T_{\text{ie}} = 168,29\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{p}} = 169,51\text{ }^{\circ}\text{C}$). Estos eventos térmicos ocurren a temperaturas diferentes a las correspondientes a la fusión de los componentes individuales $\text{NOR}_{\text{LAG-ACN}}$ ($T_{\text{ie}} = 215,17\text{ }^{\circ}\text{C}$) y $\text{TART}_{\text{LAG-ACN}}$ ($T_{\text{ie}} = 171,29\text{ }^{\circ}\text{C}$). Sin embargo, se asemejan a los valores de T_{ie} de la primera endoterma de $\text{NOR}+\text{TART}_{\text{MF}}$. Cabe destacar que el registro de TG se midió hasta $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ y presenta importante pérdida de masa alrededor de $178\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en $250,75\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Fig A.3**). Esta pérdida supera el 5 % en ambos casos, por este motivo el DSC de $\text{NOR-TART}_{\text{LAG-ACN}}$ fue, lamentablemente

interrumpido a los 180 °C debido al riesgo de derrame de la muestra y contaminación del equipo. Este hecho nos impide sacar conclusiones sobre la posible formación de un nuevo sólido multicomponente.

En la **Figura A.4**, el espectro de DRXP de NOR-TART_{LAG-ACN} muestra nuevos picos de difracción que no se observan en los difractogramas de NOR_{LAG-ACN} y TART_{LAG-ACN}, lo que indica la formación de una nueva estructura cristalina. Dichos picos de difracción se observaron a 5,57°, 24,51°, 26,19°. Además, desaparecen los picos típicos pertenecientes a TART, que si se observan en NOR+TART_{MF}: 33,41° y 37,51°.

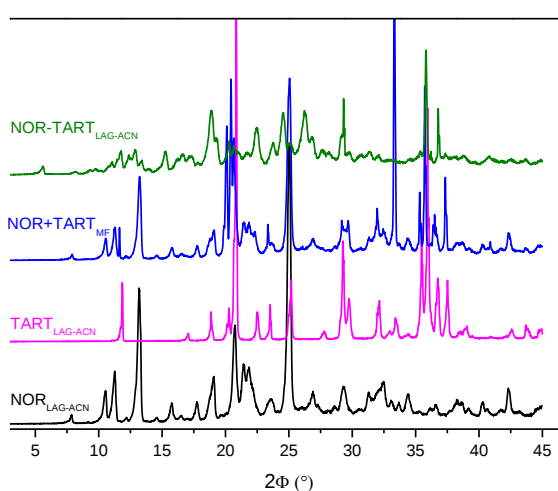


Figura A.4. Patrones experimentales de DRXP de: NOR_{LAG-ACN}, TART_{LAG-ACN}, NOR+TART_{MF}, NOR-TART_{LAG-ACN}.

Los espectros DRIFT mostrados en la **Figura A.5** en la que se comparan los registros obtenidos para las muestras NOR_{LAG-ACN}, TART_{LAG-ACN}, NOR+TART_{MF} y NOR-TART_{LAG-ACN} muestran que la mezcla física equimolecular es la sumatoria de las señales de los componentes individuales. Además, se observan nuevas señales en el espectro de NOR-TART_{LAG-ACN} ubicadas a 3160, 1205, 1106, 1070 y 805 cm⁻¹.

Los resultados obtenidos dan indicios de la formación de un derivado no covalente, pero resultan insuficientes para confirmar detalles de su constitución. Por lo tanto, será necesario realizar nuevos ensayos (por ejemplo, ¹³C RMN-ES y DRXM) para su confirmación.

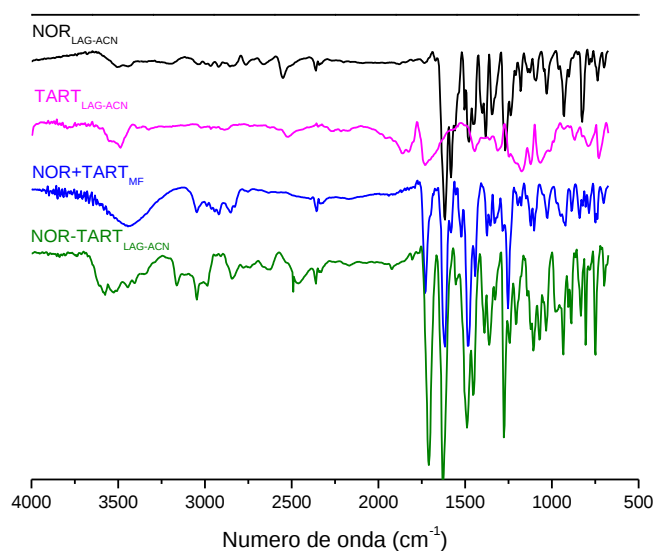


Figura A.5. Espectros DRIFT de: $NOR_{LAG-ACN}$, $TART_{LAG-ACN}$, $NOR+TART_{MF}$, $NOR-TART_{LAG-ACN}$.

$NOR-MAL_{LAG-ACN}$

En la **Fig. A.6** se observan las imágenes tomadas en el microscopio óptico y en el microscopio con luz polarizada, al producto obtenido de la molienda de NOR y MAL con acetonitrilo durante 30 minutos. El producto es parcialmente amorfo con pequeñas regiones de cristalización.

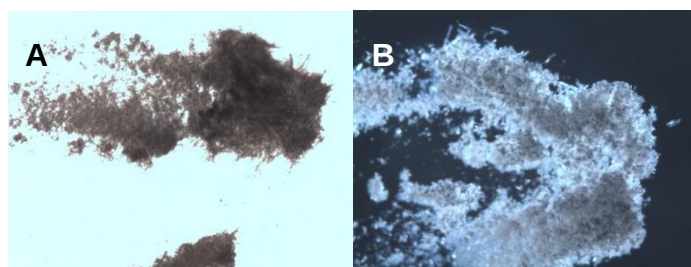


Figura A.6 Imágenes de $NOR-MAL$ **A.** $NOR-MAL_{LAG-ACN}$ (5X) y **B.** $NOR-MAL_{LAG-ACN}$ con luz polarizada (10X).

En la **Tabla A.2** se presentan los datos obtenidos de estudios térmicos realizados sobre: $NOR_{LAG-ACN}$, $MAL_{LAG-ACN}$, $NOR+MAL_{MF}$, $NOR-MAL_{LAG-ACN}$.

Tabla A.2. Temperatura de Fusión y Temperatura de inicio extrapolada de: $NOR_{LAG-ACN}$, $MAL_{LAG-ACN}$, $NOR+MAL_{MF}$, $NOR-MAL_{LAG-ACN}$.

	TF (°C)	T _{ie} (°C)
$NOR_{LAG-ACN}$	217,2-221,1	
$MAL_{LAG-ACN}$	128,7-131,0	129,43
$NOR-MAL_{MF}$		127,85/202,51
$NOR-MAL_{LAG-ACN}$		127,42

TF: Temperatura de Fusión; T_{ie}: Temperatura de inicio extrapolada

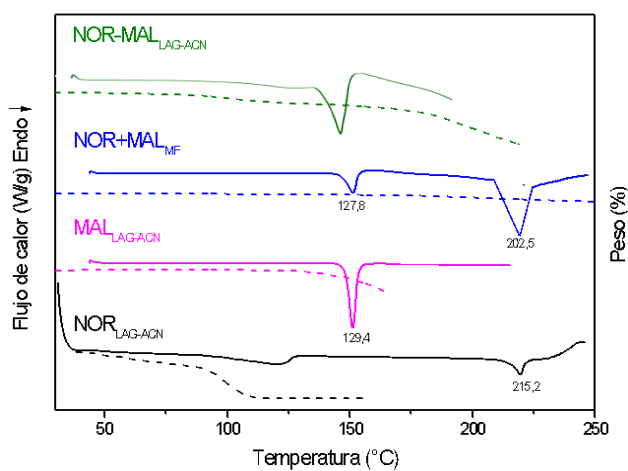


Figura A.7. Curvas DSC y TG ($\beta = 10$ °C/min, flujo de $N_2 = 50$ mL/min) de: $NOR_{LAG-ACN}$, $MAL_{LAG-ACN}$, $NOR+MAL_{MF}$, $NOR-MAL_{LAG-ACN}$.

En la **Fig A.7** se observa que la mezcla física tiene similares endotermas que los materiales de partida. Esto es indicativo de que no ocurre interacción entre los componentes. Lo mismo sucede con la curva DSC de $NOR-MAL_{LAG-ACN}$, se muestra el primer pico que coincide con T_{ie} de MAL y la segunda endoterma no se alcanza a visualizar debido a que el ensayo fue interrumpido a los 180°C para evitar derrames de la muestra.

La **Fig. A.8** muestra que $NOR-MAL_{LAG-ACN}$ fue la suma de las reflexiones de los respectivos materiales de partida, al igual que $NOR+MAL_{MF}$. Esto indicó que ambas muestras eran mezclas físicas o eutécticos, pero no serían cocristales o sales moleculares. La misma observación se refleja en la **Fig. A.9**.

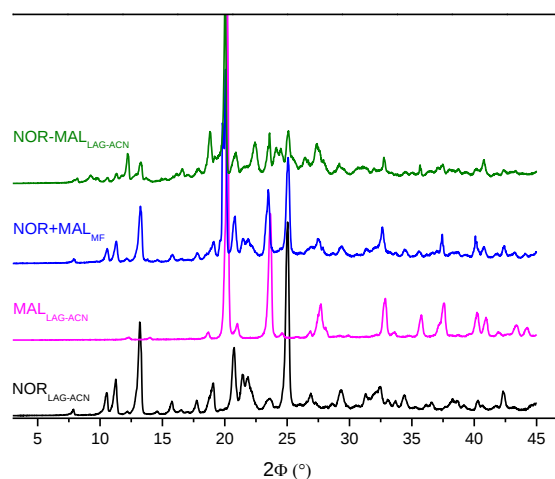


Figura A.8. Patrones experimentales de DRXP de: $NOR_{LAG-ACN}$, $MAL_{LAG-ACN}$, $NOR+MAL_{MF}$, $NOR-MAL_{LAG-ACN}$.

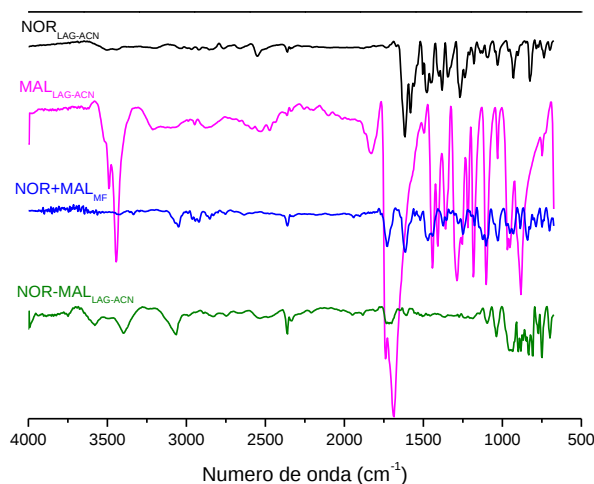


Figura A.9. Espectros DRIFT de: $NOR_{LAG-ACN}$, $MAL_{LAG-ACN}$, $NOR+MAL_{MF}$, $NOR-MAL_{LAG-ACN}$.

Se concluyó que, utilizando la técnica LAG con ACN por 30 minutos, NOR no cocrystaliza con MAL.

CIP-NIC_{Dif-AcOH}

En las **Figura A.10**, se observa CIP-NIC_{Dif-AcOH} obtenido por difusión con ácido acético. Con respecto al hábito cristalino del sólido multicomponente, presenta hábito fibroso, en forma de barra y tamaños aleatorios. Mediante análisis MEB, se verificaron visualmente las diferencias entre las partículas CIP_{Dif-AcOH}, NIC_{Dif-AcOH} y CIP-NIC_{Dif-AcOH}. Esta metodología no puede analizarse por separado para la identificación de

cocristales, sino que debe analizarse de manera complementaria a los otros análisis de caracterización del estado sólido.

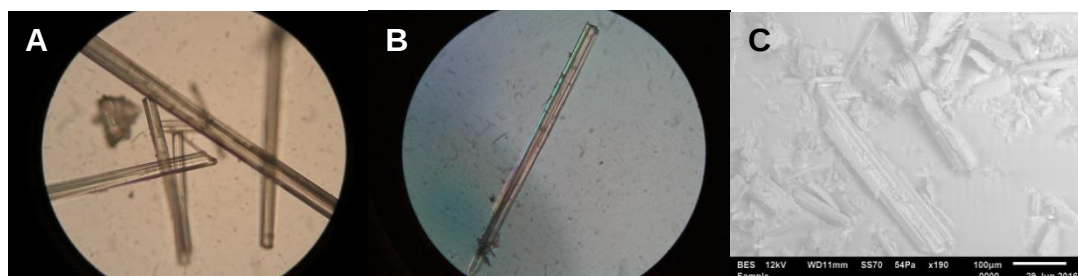


Figura A.10. Imágenes de $CIP-NIC_{Dif-AcOH}$ **A.** $CIP-NIC_{Dif-AcOH}$ (40X); **B.** $CIP-NIC_{Dif-AcOH}$ luz polarizada (40X), **C.** $CIP-NIC_{Dif-AcOH}$ (MEB).

En la **Fig A.11**, se observa el difractograma de RXP de: $CIP_{Dif-AcOH}$, $NIC_{Dif-AcOH}$ y $CIP-NIC_{Dif-AcOH}$ que muestra ser cristalino.

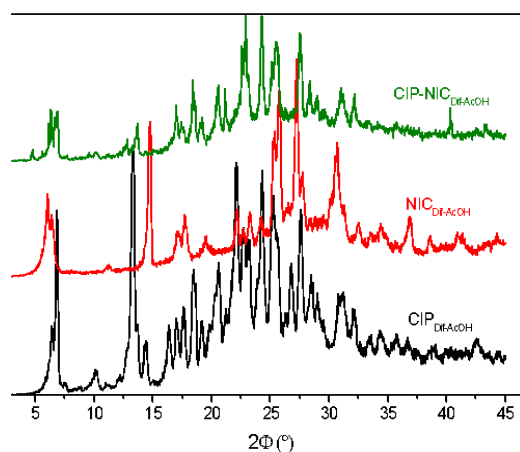


Figura A.11. Patrones experimentales de DRXP de: $CIP_{Dif-AcOH}$, $NIC_{Dif-AcOH}$, $CIP-NIC_{Dif-AcOH}$.

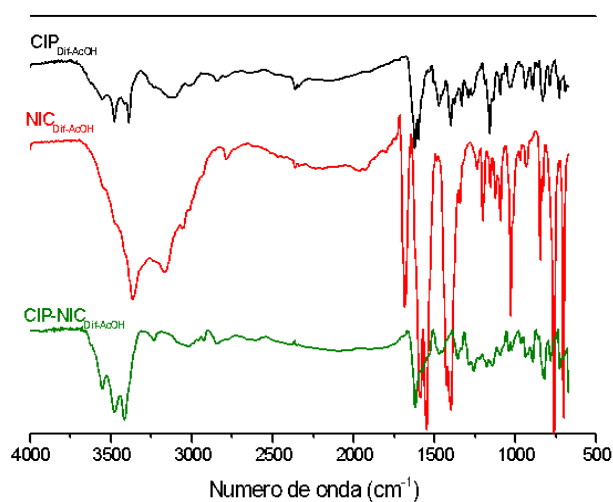


Figura A.12. Espectros DRIFT de: $CIP_{Dif-AcOH}$, $NIC_{Dif-AcOH}$, $CIP-NIC_{Dif-AcOH}$.

En la **Figura A.12** se observan los espectros DRIFT de CIP_{Dif-AcOH}, NIC_{Dif-AcOH} y CIP-NIC_{Dif-AcOH}. En el espectro de NIC desaparece la señal a 1681 cm^{-1} ($-\text{C}=\text{O}$) y la señal a 3166 cm^{-1} (NH) se encuentra desplazada y atenuada. CIP se encuentra en forma aniónica debido a la presencia de la señal situada a 1620 cm^{-1} correspondiente al grupo COO^- . Estos resultados indican que la interacción intermolecular podría ocurrir entre el grupo CONH_2 de NIC y el grupo COO^- de CIP (**Fig A.13**).

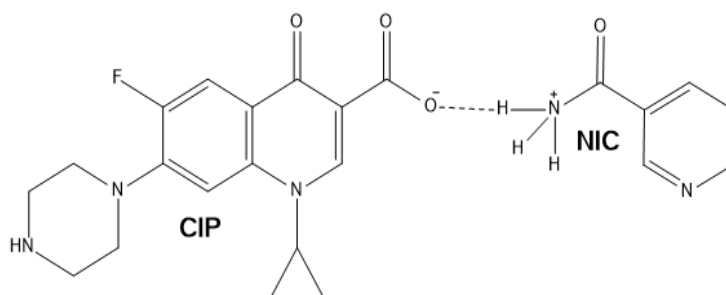


Figura A.13. Posibles interacciones en el estado sólido para CIP-NIC_{Dif-AcOH}

CIP-TART_{Dif-AcOH}

Las **Figuras A.14** muestran CIP-TART_{Dif-AcOH} obtenido mediante difusión con ácido acético. Se observa que el hábito cristalino es laminar con regiones birrefringentes.



Figura A.14. Imágenes de CIP-TART_{Dif-AcOH} **A.** CIP-TART_{Dif-AcOH} (10X); **B.** CIP-TART_{Dif-AcOH} polarizada (20X) y **C.** CIP-TART_{Dif-AcOH} (MEB).

En la **Figura A.15**, se observa el difractograma de RXP de: CIP_{Dif-AcOH}, TART_{Dif-AcOH} y CIP-TART_{Dif-AcOH} que muestra ser cristalino.

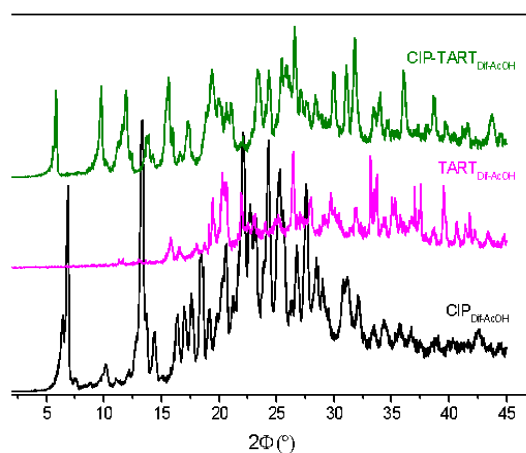


Figura A.15. Patrones experimentales de DRXP de: $CIP_{Dif-AcOH}$, $TART_{Dif-AcOH}$, $CIP-TART_{Dif-AcOH}$.

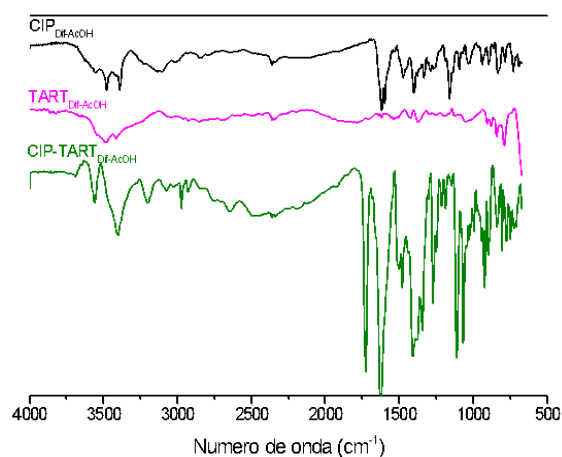


Figura A.16. Espectros DRIFT de: $CIP_{Dif-AcOH}$, $TART_{Dif-AcOH}$, $CIP-TART_{Dif-AcOH}$.

Como se aprecia en la **Figura A.16**, el espectro DRIFT de $CIP-TART_{Dif-AcOH}$ no fue la suma de los espectros de $CIP_{Dif-AcOH}$ y $TART_{Dif-AcOH}$. Se exhibe un nuevo pico en 1725 cm^{-1} ($-C=O$), 1275 cm^{-1} ($-OH$) y 920 cm^{-1} ($-OC-OH$). La ausencia de la señal 2700 cm^{-1} (NH_2^+) indica que CIP se encuentra en forma aniónica (**Fig. A.17**).

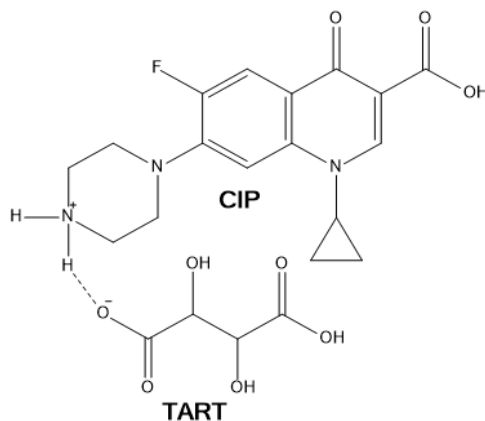


Figura A.17. Posibles interacciones en el estado sólido para $CIP-TART_{Dif-AcOH}$.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Trabajos de investigación publicados, cuyos resultados están incluidos en el presente manuscrito

Avila, C. D.; Mazzieri, M.R.; Pinto Vitorino, G. Evidencias de la formación de un nuevo aducto molecular entre norfloxacin y sulfametoxazol. *Naturalia Patagónica* 2019, 14, 26. ISSN 2591-6653.

Avila, C. D.; Fandiño, O. E.; Sperandio N. R.; Mazzieri, M.R.; Pinto Vitorino, G. Estudio de la interacción entre norfloxacin y ácido cítrico en el estado sólido. *Naturalia Patagónica*. 2019,14, 37. ISSN 2591-6653

Avila, C. D.; Mazzieri, M.R.; Pinto Vitorino, G. Preferential solvation of norfloxacin and ciprofloxacin with sulfanilamide or sulfamethoxazole in mixed binary solvent. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research Conference Proceeding*. 2015, 61. E-ISSN 0975-8232; P-ISSN 2320-5148.

Trabajos de investigación publicados, cuyos resultados no están incluidos en el presente manuscrito

Avila, C.D.; Ayala Gómez, R.; Mazzieri, M.R.; Pinto Vitorino, G. Simultaneous determination of norfloxacin and sulfadiazine by first-derivative spectrophotometry. *Journal of Chemistry Letters*. 2023; 4, 3, 130-135. DOI: 10.22034/jchemlett.2023.395910.1115.

Trabajos de investigación presentados en reuniones científicas, cuyos resultados están incluidos en el presente manuscrito

Homoc, P.A.; Avila, C.D.; Pinto Vitorino, G. CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE NORFLOXACINO Y SULFAMETOXAZOL POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE DE DERIVADAS Y POR FLUORESCENCIA. II Encuentro Iberoamericano de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y XIX Jornadas Día del Farmacéutico 2024, Comodoro Rivadavia, 30, 31 de octubre y 1 de noviembre de 2024. FCNyCS, UNPSJB

Avila, C. D.; Ayala Gómez, R.; Becerra M. C.; Mazzieri, M.R.; Pinto Vitorino, G. "SUPRAMOLECULAR COMPLEX OF NORFLOXACIN AND SULFAMETHOXAZOL: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY". 4th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, **1 al 30 de noviembre de 2018**.

Avila, C. D.; Mazzieri, M.R.; Pinto Vitorino, G. "ESTUDIO DE SOLUBILIDAD DEL COMPLEJO MOLECULAR FORMADO POR NORFLOXACINO Y SULFAMETOXAZOL". XXI Simposio Nacional de Química Orgánica Sociedad Argentina de Investigación en Química Orgánica, 11 de Noviembre de 2017. Potrero de los Funes, San Luis, Argentina.

Avila, C. D.; Mazzieri, M.R.; Pinto Vitorino, G. "FORMACIÓN DE COMPLEJOS MOLECULARES ENTRE NORFLOXACINO Y ÁCIDO CÍTRICO, MÁLICO O TARTÁRICO, EN EL ESTADO SÓLIDO". XIII Reunión de la Asociación Argentina de Cristalografía (AACr), 1-3 de noviembre de 2017. Bahía Blanca, Argentina.

Avila, C. D.; Mazzieri, M.R.; Pinto Vitorino, G. COCRISTALES FARMACÉUTICOS DE CIPROFLOXACINO CON SULFAMETOXAZOL, NICOTINAMIDA Y ACIDO TARTÁRICO. 4º Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFA), 27-28 Octubre de 2016. Rosario, Argentina.

Avila, C. D.; Komrovsky, F.; Sperandeo N.R.; Mazzieri, M.R.; Pinto Vitorino, G. PREFERENTIAL SOLVATION OF NORFLOXACIN AND CIPROFLOXACIN WITH SULFANILAMIDE OR SULFAMETOXAZOLE IN MIXED BINARY SOLVENT. 3º Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFA), 18-19 Septiembre de 2014. Cordoba, Argentina

Avila, C. D.; Komrovsky, F.; Sperandeo N.R.; Mazzieri, M.R.; Pinto Vitorino, G. "INTERACCIÓN MOLECULAR EN EL ESTADO SÓLIDO ENTRE CIPROFLOXACINO Y SULFAMETOXAZOL". I Reunión Latinoamericana de Cristalografía - IX Reunión Anual de la AACr 2013, 29/10 al 1/11 de 2014, Córdoba, Argentina. Libro de Resúmenes extendidos, 36-38

Avila, C. D.; Mazzieri, M.R.; Pinto Vitorino, G. "EFFECT OF THE CONCENTRATION AND TEMPERATURE ON THE UV-VIS SPECTRUM OF NORFLOXACIN AND CIPROFLOXACIN WITH SULFANILAMIDE OR SULFAMETOXAZOLE". 2º Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFA), 22-23 Noviembre de 2012, Rosario, Argentina.

Trabajos de investigación presentados en reuniones científicas, cuyos resultados no están incluidos en el presente manuscrito

Avila, C. D.; Chosson, S.; Pinto Vitorino, G. "SOLVATOCHROMISM OF NORFLOXACIN AND SULFADIAZINE". 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, **1 al 30 de noviembre de 2023**.

Avila, C. D.; Pinto Vitorino, G. "ESTADO SÓLIDO DE FÁRMACOS: ACTIVIDAD OPTATIVA/ELECTIVA EN LA CARRERA DE FARMACIA – UNPSJB". 1º Jornadas Nacionales de Enseñanza de Farmacia y Bioquímica, 17 y 18 de septiembre de 2018. Universidad Católica de Córdoba (UCC), Córdoba, Argentina.

Castillo, M. O.; Avila, C. D.; Pinto Vitorino, G. "TOPOLOGÍA MOLECULAR APLICADA AL ESTUDIO DE SULFONAMIDAS ANTIBACTERIANAS". VI Congreso de Matemática Aplicada, Computacional e industrial (VI MACI), 2-5 de mayo 2017, Comodoro Rivadavia, Argentina.

Ayala Gómez R.; Avila, C. D.; Mazzieri, M.R.; Pinto Vitorino, G. INTERACCIÓN MOLECULAR EN EL ESTADO SÓLIDO ENTRE SULFADIACINA Y CIPROFLOXACINO O NORFLOXACINO. VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas, XLVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental y III Congreso Sudamericano de Biofarmacia y Farmacocinética, 4 al 6 de noviembre de 2015, Córdoba, Argentina, Libro de Resúmenes ISSN 2250-4079.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Clasificación del estado sólido de IFA en base a su estructura y composición	18
Figura 1.2. Representación esquemática de la red cristalina y la celda unitaria	19
Figura 1.3. Termograma de Analisis Termico Diferencial.....	30
Figura 1.4. Curva de Análisis Térmico	30
Figura 1.5. Representación esquemática Sistema de Clasificación Biofarmacéutica	33
Figura 2.1. IFA seleccionados para el estudio.	48
Figura 2.2. Sustancias Coformadoras utilizadas.	49
Figura 2.3. Sintones moleculares entre SA o FQ	50
Figura 3.1. Etapas de desarrollo de las quinolonas.....	56
Figura 3.2. Esquema de la actividad de ADN de girasa y topoisomerasa IV	59
Figura 3.3. Mecanismo de acción de las quinolonas.....	60
Figura 3.4. Farmacóforo de Fluorquinolonas.	63
Figura 3.5. Estructura base de las FQ y funciones de los sustituyentes	64
Figura 3.6. Estructuras químicas de NOR y CIP.	65
Figura 3.7. Esquema de especiación de NOR	66
Figura 3.8. Enlace de hidrógeno intramolecular en FQ	66
Figura 4.1. Grupo funcional sulfonamido.....	76
Figura 4.2. Transformación metabólica del prontosil	77
Figura 4.3. Similitud estructural del PABA y SNA	79
Figura 4.4. Mecanismo de acción de las SA	79
Figura 4.5. Farmacóforo de las SA.....	82
Figura 4.6. Estructura química de SNA y SMX.....	83
Figura 4.7. Mecanismo de desprotonación del grupo sulfonamida	84
Figura 4.8. Constantes de disociación de SA.....	84
Figura 4.9. Metabolitos de las SA:.....	85
Figura 4.10. Otros usos de las SA.....	87

Figura 5.1. Espectros de NOR y SMX.....	94
Figura 5.2. Espectro de la primera derivada de NOR.....	102
Figura 5.3. Espectro de la primera derivada de SMX.....	102
Figura 5.4. Curva de calibración de NOR en buffer pH 7,4.	103
Figura 5.5. Curva de calibración de SMX en buffer pH 7,4.	103
Figura 5.6. Comparación entre las curvas de calibrado de NOR realizadas por dos analistas utilizando derivada de primer orden del espectro de absorción.	106
Figura 5.7. Comparación entre las curvas de calibrado de SMX realizada por dos analistas utilizando derivada de primer orden del espectro de absorción.	106
Figura 5.8. Curva de calibrado de NOR y SMX en mezclas utilizando derivada de 1° orden.	108
Figura 5.9. Curva de calibrado de NOR y SMX utilizando derivada de 1° orden.	108
Figura 6.1. Cambios en la posición de absorción y la intensidad de la banda.	116
Figura 6.2 Posibles comportamientos del soluto en mezcla binaria de solventes	120
Figura 6.3. Espectros de absorción de NOR y CIP en buffer pH 7,4.....	129
Figura 6.4. Espectros de absorción de NOR registrados a distinta T° y puntos isosbéticos observados.....	130
Figura 6.5. Espectros de absorción de CIP registrados a distinta T° y puntos isosbéticos observados.....	131
Figura 6.6. Espectros de absorción de NOR en los solventes en estudio.....	132
Figura 6.7. Espectros de absorción de CIP en los solventes en estudio.....	133
Figuras 6.8. Espectro de absorción de NOR y CIP en buffer-ACN	136
Figuras 6.9. Energía de transición de NOR y CIP vs χ_{ACN}	138
Figura 6.10. Espectro de absorción de NOR y CIP en buffer-MeOH	139
Figura 6.11. Energía de transición de NOR y CIP vs χ_{MeOH}	140
Figura 6.12. Espectro de absorción de SNA y SMX en buffer 7,4.....	142
Figura 6.13. Espectros de absorción de SNA registrados a distinta T° y puntos isosbéticos observados.....	143
Figura 6.14. Espectros de absorción de SMX registrados a distinta T° y puntos isosbéticos observados	143
Figura 6.15. Espectro de absorción de SNA en los solventes en estudio.	144
Figura 6.16. Espectros de absorción de SMX en los solventes en estudio.	145
Figura 6.17. Espectro de absorción para SNA y SMX en buffer-ACN	147

Figura 6.18. Energía de transición de SNA y SMX vs χ_{ACN}	150
Figura 6.19. Espectro de absorción de SNA y SMX en buffer-MeOH.	149
Figura 6.20. Energía de transición de SNA y SMX vs χ_{MeOH}	151
Figura 6.21. Espectros de absorción de soluciones de NOR en concentraciones crecientes en presencia de concentración fija de: SNA y SMX, a pH= 7,4.	152
Figura 6.22. Espectros de absorción de soluciones de CIP en concentraciones crecientes en presencia de concentración fija de SNA y SMX, a pH= 7,4.....	152
Figura 6.23. Espectros de absorción de soluciones de SNA en concentraciones crecientes en presencia de concentración fija de NOR y CIP, a pH= 7,4.....	153
Figura 6.24. Espectros de absorción de soluciones de SMX en concentraciones crecientes en presencia de concentración fija de NOR y CIP, a pH= 7,4.	153
Figura 6.25. Espectros de absorción de NOR-SNA registrados a distintas T° y puntos isobéuticos observados.	155
Figura 6.26. Espectros de absorción de NOR-SMX registrados a distintas T° y puntos isobéuticos observados.	155
Figura 6.27. Espectros de absorción de CIP-SNA registrados a distintas T° y puntos isobéuticos observados	156
Figura 6.28. Espectros de absorción de CIP-SMX registrados a distintas T° y puntos isobéuticos observados	156
Figura 6.29. Espectro de absorción de NOR-SNA y NOR-SMX, en buffer-ACN.....	157
Figura 6.30. Espectro de absorción de CIP-SNA y CIP-SMX, en buffer-ACN	157
Figura 6.31. Energía de transición de NOR-SNA y NOR-SMX vs χ_{ACN} ; y CIP-SNA y CIP-SMX vs χ_{ACN}	159
Figura 6.32. Espectro de absorción de CIP-SNA y CIP-SMX, en buffer-ACN.....	160
Figura 6.33. Espectro de absorción de CIP-SNA y CIP-SMX, en buffer-MeOH.....	160
Figuras 6.34. Energía de transición de NOR-SNA y NOR-SMX vs χ_{MeOH} ; y CIP-SNA y CIP-SMX vs χ_{MeOH}	162
Figura 6.35. Equilibrio intramolecular para FQ, entre las especies zwitteriónicas y no iónica.	163
Figura 6.36. Equilibrio intramolecular para SMX, entre la especie no iónica y aniónica.....	164
Figura 7.1. Representación de los procesos de diseño, síntesis y caracterización.....	171
Figura 7.2. Procedimiento para identificación y determinación de pureza.	184
Figura 7.3. Molienda en seco y LAG.	186
Figura 7.4. LAG seguido de evaporación.	187

Figura 7.5. Cristalización por difusión de vapor.....	187
Figura 7.6. Método de evaporación.....	188
Figura 7.7. Enfriamiento lento de disoluciones saturadas.	189
Figura 7.8. Técnicas analíticas para la caracterización de sólidos multicomponentes.....	191
Figura 7.9. Curvas DSC y TG de: NOR _{MPC-2015} , NOR _{MPC-2018} , NOR _{LAG-ACN}	193
Figura 7.10 Espectros DRIFT de: NOR _{MPC-2018} , NOR _{LAG-ACN30'} y NOR _{LAG-ACN60'}	194
Figura 7.11. Patrones DRXP de: NOR _{MPC-2018} , NOR _{LAG-ACN}	195
Figura 7.12. Patrones de DRX de NOR.....	196
Figura 7.13. Evaluación del aducto a partir de NOR _{MPC} y NOR _{LAG-ACN}	197
Figura 7.14. Patrones DRXP de: NOR _{MPC-SMX_{MPC}} y NOR _{LAG-ACN-SMX_{LAG-ACN}}	197
Figura 7.15. Curvas DSC y TG de: CIP _{MPC} y CIP _{LAG-ACN}	199
Figura 7.16. Espectros DRIFT de: CIP _{MPC} y CIP _{LAG-ACN}	199
Figura 7.17. Patrones DRXP de: CIP _{MPC} , CIP _{LAG-ACN30'} , CIP _{LAG-ACN60'}	200
Figura 7.18. Curvas DSC y TG de: SNA _{MPC} y SNA _{LAG-ACN}	201
Figura 7.19. Espectros DRIFT de: SNA _{MPC} y SNA _{LAG-ACN}	202
Figura 7.20. Patrones DRXP de: SNA _{MPC} y SNA _{LAG-ACN}	202
Figura 7.21. Curvas DSC y TG de: SMX _{MPC} y SMX _{LAG-ACN}	203
Figura 7.22. Espectros DRIFT de SMX _{MPC} y SMX _{LAG-ACN}	204
Figura 7.23. Patrones experimentales de DRXP de: SMX _{MPC} , SMX _{LAG-ACN}	204
Figura 7.24. Sólidos multicomponentes obtenidos con resultados promisorios.	206
Figura 7.25. Curvas DSC y TG NOR _{LAG-ACN} , SMX _{LAG-ACN} , NOR+SMX _{MF} y NOR-SMX _{LAG-ACN} ...	207
Figura 7.26. Patrones DRXP de: NOR _{LAG-ACN} , SMX _{LAG-ACN} , NOR+SMX _{MF} , y NOR-SMX _{LAG-ACN} 60 y 30 min.	208
Figura 7.27. Espectros DRIFT de NOR _{LAG-ACN} , SMX _{LAG-ACN} , NOR+SMX _{MF} , y NOR-SMX _{LAG-ACN} 60 y 30 min.....	209
Figura 7.28. ¹ H-RMN de NOR-SMX _{LAG-ACN}	210
Figura 7.29 Posibles interacciones en el estado sólido entre NOR-SMX _{LAG-ACN}	211
Figura 7.30. Curvas DSC y TG de: NOR _{LAG-ACN} , SNA _{LAG-ACN} , NOR-SNA _{MF} , NOR-SNA _{LAG-ACN30'} y NOR-SNA _{LAG-ACN60'}	212
Figura 7.31. Patrones DRXP de: A. NOR _{LAG-ACN} , SNA _{LAG-ACN} , NOR+SNA _{MF} , y NOR-SNA _{LAG-ACN} 60 y 30 min.....	213

Figura 7.32. Espectros DRIFT de: NOR _{LAG-ACN} , SNA _{LAG-ACN} , NOR+SNA _{MF} , y NOR-SNA _{LAG-ACN} 60 y 30 min.....	214
Figura 7.33. ¹ H-RMN de NOR-SNA _{LAG-ACN}	214
Figura 7.34 Posibles interacciones en el estado sólido entre NOR-SNA _{LAG-ACN}	215
Figura 7.35. Curvas DSC y TG de: CIP _{LAG-ACN} , SMX _{LAG-ACN} , CIP+SMX _{MF} y CIP-SMX _{LAG-ACN} . 216	
Figura 7.36. Patrones DRXP de: CIP _{LAG-ACN} , SMX _{LAG-ACN} , CIP+SMX _{MF} y CIP-SMX _{LAG-ACN} . 60' y 30'	217
Figura 7.37. Espectros DRIFT de: CIP _{LAG-ACN} , SMX _{LAG-ACN} , CIP+SMX _{MF} y CIP-SMX _{LAG-ACN} . 60' y 30'	218
Figura 7.38. Posibles interacciones en el estado sólido entre CIP-SMX _{LAG-ACN}	218
Figura 7.39. Curvas DSC y TG de: CIP _{LAG-ACN} , SNA _{LAG-ACN} , CIP+SNA _{MF} y CIP-SNA _{LAG-ACN30'} . 219	
Figura 7.40 Patrones DRXP de: CIP _{LAG-ACN} , SNA _{LAG-ACN} , CIP-SMX _{LAG-ACN} . 60' y 30'	220
Figura 7.41. Espectros DRIFT de: CIP _{LAG-ACN} , SNA _{LAG-ACN} , y CIP-SNA _{LAG-ACN30'}	220
Figura 7.42. Imágenes de NOR-CIT.....	221
Figura 7.43. Curvas DSC y TG de: NOR _{LAG-ACN} , CIT _{LAG-ACN} , NOR+ CIT _{MF} , NOR-CIT _{LAG-ACN} ...	222
Figura 7.44 Patrones DRXP de: NOR _{LAG-ACN} , CIT _{LAG-ACN} , NOR+ CIT _{MF} y NOR-CIT _{LAG-ACN}	222
Figura 7.45. Espectros DRIFT de: NOR _{LAG-ACN} , CIT _{LAG-ACN} , NOR+ CIT _{MF} y NOR-CIT _{LAG-ACN} . .	223
Figura 7.46. Posibles interacciones en el estado sólido entre NOR-CIT _{LAG-ACN}	223
Figura 8.1. Esquema de un equipo de disolución.....	242
Figuras 8.2. Concentraciones molares de solubilidad en equilibrio de NOR y SMX obtenidas a las 48, 72 y 96 horas.	247
Figuras 8.3. Concentraciones molares de solubilidad en equilibrio de CIP y SMX obtenidas a las 48, 72 y 96 horas.	248
Figura 8.4. Porcentaje de IFA disuelto de NOR y SMX: en 15, 30, 60, 90 y 120 min proveniente del IFA individual, de NOR+SMX _{MF} y de NOR-SMX _{LAG-ACN}	249
Figura 8.5. Porcentaje de IFA disuelto CIP y SMX: en 15, 30, 60, 90 y 120 min proveniente del IFA individual, de CIP+SMX _{MF} y de CIP-SMX _{LAG-ACN}	249
Figura A.1 Imágenes de NOR-TART _{LAG-ACN}	260
Figura A.2. Curvas DSC NOR _{LAG-ACN} , TART _{LAG-ACN} , NOR+TART _{MF} y NOR-TART _{LAG-ACN}	261
Figura A.3. Curvas TG de: NOR-TART _{LAG-ACN}	261
Figura A.4. Patrones DRXP NOR _{LAG-ACN} , TART _{LAG-ACN} , NOR+TART _{MF} , NOR-TART _{LAG-ACN}	262
Figura A.5. Espectros DRIFT NOR _{LAG-ACN} , TART _{LAG-ACN} , NOR+TART _{MF} , NOR-TART _{LAG-ACN} . .	263

Figura A.6. Imágenes de NOR-MAL _{LAG-ACN}	264
Figura A.7. Curvas DSC y TG NOR _{LAG-ACN} , MAL _{LAG-ACN} , NOR+ MAL _{MF} , NOR-MAL _{LAG-ACN}	264
Figura A.8. Patrones DRXP de: NOR _{LAG-ACN} , MAL _{LAG-ACN} , NOR+ MAL _{MF} , NOR-MAL _{LAG-ACN} ..	265
Figura A.9. Espectros DRIFT de: NOR _{LAG-ACN} , MAL _{LAG-ACN} , NOR+ MAL _{MF} , NOR-MAL _{LAG-ACN} .	265
Figura A.10. Imágenes de CIP-NIC _{Dif-AcOH}	266
Figura A.11. Patrones DRXP de: CIP _{Dif-AcOH} , NIC _{Dif-AcOH} , CIP-NIC _{Dif-AcOH}	266
Figura A.12. Espectros DRIFT de: CIP _{Dif-AcOH} , NIC _{Dif-AcOH} , CIP-NIC _{Dif-AcOH}	266
Figura A.13. Posibles interacciones en el estado sólido para CIP-NIC _{Dif-AcOH}	267
Figura A.14. Imágenes de CIP-TART _{Dif-AcOH}	267
Figura A.15. Patrones DRXP de: CIP _{Dif-AcOH} , TART _{Dif-AcOH} , CIP-TART _{Dif-AcOH}	268
Figura A.16. Espectros DRIFT de: CIP _{Dif-AcOH} , TART _{Dif-AcOH} , CIP-TART _{Dif-AcOH}	268
Figura A.17. Posibles interacciones en el estado sólido para CIP-TART _{Dif-AcOH}	268

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Técnicas convencionales y propiedades representativas medidas en AT	28
Tabla 2.1. Principales propiedades fisicoquímicas de: NOR, CIP, SNA y SMX.....	48
Tabla 2.2. Principales propiedades fisicoquímicas de: NIC, ANT, CIT, MAL, TART.....	49
Tabla 3.1. Clasificación de las quinolonas	58
Tabla 3.2. Mecanismos de resistencia a quinolonas y sus características	62
Tabla 5.1. Preparación de las soluciones	101
Tabla 5.2. Parámetros de validación del método para la determinación de NOR y SMX	104
Tabla 5.3. Resultados de la prueba F para evaluación de la linealidad.....	104
Tabla 5.4. LD y LQ de NOR y SMX.	105
Tabla 5.5. Rangos lineales y dinámicos de las curvas de calibrado.	105
Tabla 5.6. Parámetros para la estimación de la repetibilidad del equipo.....	105
Tabla 5.7. Coeficientes de variación para la estimación de la repetibilidad del método.	106
Tabla 5.8. Parámetros obtenidos de los ensayos de precisión intermedia	107
Tabla 5.9. Prueba F para varianzas de dos muestras.	107
Tabla 5.10. Coeficientes de variación para la estimación de la precisión entre analistas.....	108
Tabla 5.11. Evaluación de la especificidad del método para NOR y SMX.....	109
Tabla 5.12. Porcentajes de recuperación para NOR y SMX según el método de adición estándar.	109
Tabla 6.1. Esquema de dilución de las soluciones de FQ y SA.....	123
Tabla 6.2. Naturaleza y parámetros empíricos de los solventes utilizados.....	125
Tabla 6.3. Esquema de las diluciones correspondientes al ensayo de FQ o SA en mezclas binarias de solventes.....	126
Tabla 6.4. Esquema de las diluciones correspondientes al ensayo de mezclas binarias de FQ y SA en mezclas binarias de soventes.	127
Tabla 6.5. Parámetros solvatocrómicos (α , β y π *) para la mezcla buffer-ACN.	128
Tabla 6.6. Parámetros solvatocrómicos (α , β y π *) para la mezcla buffer-MeOH.	128
Tabla 6.7. Valores experimentales de longitud de onda y número de onda de soluciones de NOR y CIP en los distintos solventes.....	132

Tabla 6.8. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas obtenidas del análisis de regresión lineal múltiple de datos experimentales de NOR.	135
Tabla 6.9. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas de los coeficientes del parámetro para el análisis de regresión lineal múltiple de datos experimentales de CIP.	135
Tabla 6.10. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas de los coeficientes del parámetro para el análisis de regresión lineal múltiple de datos experimentales de FQ.	137
Tabla 6.11. E_{12} , χ^L_{ACN} y δ_{S2} de NOR y CIP en distintas fracciones molares de ACN (χ_{ACN}). .	137
Tabla 6.12. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas de los coeficientes del parámetro para el análisis de regresión lineal múltiple de datos experimentales de NOR y CIP.	139
Tabla 6.13. E_{12} , χ^L_{MeOH} y δ_{S2} de NOR y CIP en distintas χ_{MeOH}	140
Tabla 6.14. Resumen de los parámetros más relevantes por solvatocromismo en solventes puros y en mezclas de solventes; y Solvatación Preferencial.	141
Tabla 6.15. Valores experimentales de longitud de onda de máxima absorción y número de onda de SNA y SMX en los distintos solventes.	144
Tabla 6.16. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas de cada parámetro obtenido del análisis de regresión lineal múltiple de datos experimentales de SNA.	146
Tabla 6.17. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas de los coeficientes del parámetro para el análisis de regresión lineal múltiple de datos experimentales de SMX.	146
Tabla 6.18. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas de los coeficientes de los parámetros para el análisis de regresión lineal múltiple de SNA y SMX en buffer-ACN.	148
Tabla 6.19. E_{12} , χ^L_{ACN} y δ_{S2} de SA en distintas fracciones molares de ACN (χ_{ACN}).	148
Tabla 6.20. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas de los coeficientes del parámetro para el análisis de regresión lineal múltiple de datos experimentales de SA.	150
Tabla 6.21. Se muestran los parámetros E_{12} , χ^L_{ACN} y δ_{S2} de SA en MeOH.	150
Tabla 6.22. Resumen de los parámetros más relevantes obtenidos por solvatocromismo en solventes puros y en mezclas de solventes; y Solvatación Preferencial.	151

Tabla 6.23. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas de los coeficientes del parámetro analizado, para el análisis de regresión lineal múltiple de datos experimentales de FQ-SA en buffer-ACN.	158
Tabla 6.24. E_{12} , χ^L_{ACN} y δ_{S2} de mezcla equimolar de NOR-SA en distintas fracciones molares de ACN (χ_{ACN}).	158
Tabla 6.25. E_{12} , χ^L_{ACN} y δ_{S2} de mezcla equimolar de CIP-SA en distintas fracciones molares de ACN (χ_{ACN}).	159
Tabla 6.26. Coeficientes estimados y errores estándar, correlaciones, significancia y porcentaje de contribuciones relativas de los coeficientes del parámetro para el análisis de regresión lineal múltiple de datos experimentales de FQ-SA en buffer-MeOH.	161
Tabla 6.27. E_{12} , χ^L_{ACN} y δ_{S2} de mezcla equimolares de NOR-SA en MeOH.	161
Tabla 6.28. E_{12} , χ^L_{ACN} y δ_{S2} de mezcla equimolares de CIP-SA en MeOH.	162
Tabla 6.29 Resumen de los resultados obtenidos para FQ-SA por solvatocromismo en mezclas de solventes y Solvatación Preferencial.	163
Tabla 7.1. Temperatura de pico, Temperatura de inicio extrapolada y calor de fusión de NOR en la fusión y transición; y datos bibliográficos.	192
Tabla 7.2. Temperatura de pico y de inicio extrapolada de: CIP_{MPC} y $CIP_{LAG-ACN}$ y datos bibliográficos.	198
Tabla 7.3. Temperatura de pico, Temperatura de inicio extrapolada y calor de fusión de SNA_{MPC} y $SNA_{LAG-ACN}$ y datos bibliográficos de diferentes polimorfos.	201
Tabla 7.4. Temperatura de pico, Temperatura de inicio extrapolada de SMX_{MPC} (2015 y 2019) y $SMX_{LAG-ACN}$ y datos bibliográficos.	203
Tabla 7.5. Temperatura Fusión, Temperatura de inicio extrapolada y calor de fusión de: $NOR_{LAG-ACN}$, $SMX_{LAG-ACN}$, $NOR+SMX_{MF}$ y $NOR-SMX_{LAG-ACN}$	207
Tabla 7.6. Temperatura de Fusión, Temperatura de inicio extrapolada y calor de fusión de: $NOR_{LAG-ACN}$, $SNA_{LAG-ACN}$, $NOR-SNA_{MF}$ y $NOR-SNA_{LAG-ACN}$	211
Tabla 7.7. Temperatura Fusión, Temperatura de inicio extrapolada de: $CIP_{LAG-ACN}$, $SMX_{LAG-ACN}$, $CIP-SMX_{MF}$ y $CIP-SMX_{LAG-ACN}$	215
Tabla 7.8. Temperatura de Fusión, Temperatura de inicio extrapolada de: $CIP_{LAG-ACN}$, $SNA_{LAG-ACN}$, $CIP-SNA_{MF}$ y $CIP-SNA_{LAG-ACN30'}$	219
Tabla 7.9. Temperatura de Fusión y Temperatura de inicio extrapolada de: $NOR_{LAG-ACN}$, $CIT_{LAG-ACN}$, $NOR+ CIT_{MF}$, $NOR-CIT_{LAG-ACN}$	221
Tabla 8.1. Valores de longitud de onda, Absorbancia inicial y de Absorbancia luego de la partición, de las soluciones de FQ y SA.	243

Tabla 8.2. Comparación entre los valores de $\log P_{ap}$ determinados experimentalmente y hallados en bibliografía de FQ y SA.	244
Tabla 8.3. Valores $\log P_{ap}$ determinados de mezclas FQ-SA	245
Tabla 8.4. Concentraciones de IFA obtenidas a las 48, 72 y 96 horas.....	246
Tabla 8.5. Concentraciones molares de solubilidad en equilibrio de: $NOR_{LAG-ACN}$, $SMX_{LAG-ACN}$, $NOR+SMX_{MF}$, $NOR-SMX_{LAG-ACN30}$, $NOR-SMX_{LAG-ACN60}$ obtenidas a las 48, 72 y 96 horas.	246
Tabla 8.6. Concentraciones molares de solubilidad en equilibrio de: $CIP_{LAG-ACN}$, $SMX_{LAG-ACN}$, $CIP+SMX_{MF}$ y $CIP-SMX_{LAG-ACN}$ a las 24, 48, 72 y 96 horas.	247
Tabla A.1. Temperatura de Fusión y Temperatura de inicio extrapolada de: $NOR_{LAG-ACN}$, $TART_{LAG-ACN}$, $NOR+TART_{MF}$, $NOR-TART_{LAG-ACN}$	260
Tabla A.2. Temperatura de Fusión y Temperatura de inicio extrapolada de: $NOR_{LAG-ACN}$, $MAL_{LAG-ACN}$, $NOR+MAL_{MF}$, $NOR-MAL_{LAG-ACN}$	264



CONICET



**Secretaría de
Ciencia y Tecnología**
Gobierno del Chubut