



FACULTAD DE FARMACIA  
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA  
LABORATORIO DE FOTOQUÍMICA

**“EFECTOS DEL ÁCIDO ASCÓRBICO Y TOCOFEROL, SOBRE LA  
FOTODEGRADACIÓN DE ATORVASTATINA”**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

**NICOLÁS LÓPEZ TOLEDO**

Director de Tesis: M.Sc. Georgina Sánchez Parra

Co-director de Tesis: Dr. Juan Ojeda Herrera

2019

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
1.1. Estatinas como fármacos hipocolesterolemicos	5
1.2. Radiación Ultravioleta y sus efectos sobre moléculas cromóforas	9
1.3. Fotodegradación de atorvastatina por radiación UV	13
1.4. Inhibición de la Fotodegradacion de atorvastatina por radiación UV mediante incorporación de compuestos antioxidantes	14
<b>2. HIPÓTESIS</b>	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
3.1. Objetivo general	17
3.2. Objetivos específicos	17
<b>4. MATERIALES</b>	<b>18</b>
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>19</b>
5.1. Cinética de fotodegradación de soluciones de atorvastatina	19
5.2. Cinética de fotodegradación de ácido ascórbico y tocoferol	20
5.3. Cinética de fotodegradación de soluciones de atorvastatina, en presencia de ácido ascórbico y tocoferol	21
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>23</b>
6.1. Fotoestabilidad de atorvastatina	23
6.2. Fotoestabilidad de atorvastatina en presencia de ácido ascórbico	24
6.3. Fotoestabilidad de atorvastatina en presencia de tocoferol	28
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>
7.1. Fotoestabilidad de atorvastatina	32
7.2. Fotoestabilidad de atorvastatina en presencia de ácido ascórbico	34
7.3. Fotoestabilidad de atorvastatina en presencia de tocoferol	35
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>37</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>38</b>
<b>10. ANEXOS</b>	<b>43</b>

## RESUMEN

Las estatinas son una familia de medicamentos con un alto grado de eficacia para el tratamiento de las dislipidemias. Son utilizadas como hipolipemiente de elección para la reducción del riesgo cardiovascular por sus beneficios demostrados en disminución de la mortalidad y morbilidad cardiovascular. No obstante, estos compuestos se pueden degradar al exponerse a la radiación Ultravioleta (UV), generando radicales libres y especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden provocar reacciones de fototoxicidad y fotoalergia a la piel.

Este trabajo evalúa el efecto de dos compuestos antioxidantes, ácido ascórbico (vitamina C) y tocoferol (vitamina E) sobre la fotodegradación de soluciones de atorvastatina expuestas a la radiación con luz UV-B monocromática en presencia y ausencia de las vitaminas, utilizando dos dosis de irradiancia de 216 y 426  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

Los resultados en general demostraron que la presencia de ácido ascórbico en la solución a irradiar de atorvastatina disminuye la fotodegradación de este fármaco. Al respecto, se observó que a los 70 minutos de radiación utilizando la dosis menor, fue alcanzada una disminución en la fotodegradación del fármaco de un 26,7% en comparación con el porcentaje de degradación de la muestra en ausencia de esta vitamina. Con la dosis mayor esta disminución alcanza un mayor valor en comparación a la menor dosis (39.35% a los 100 minutos de exposición)

En el caso de la adición de tocoferol a la solución de atorvastatina los resultados mostraron que la adición de este compuesto no genera una disminución significativa en la fotodegradación de atorvastatina.

Los resultados obtenidos en esta investigación sirven de antecedentes para evidenciar el eventual daño que podría causar a los pacientes la exposición al sol, cuando se encuentren en tratamiento farmacológico con atorvastatina. Asimismo, podrían servir como estudios bases de investigaciones a niveles in vivo, que evaluarán mecanismos que disminuyan los efectos adversos en personas que se exponga por periodos prolongados a la radiación UV-B o en aquellas horas del día en la que radiación UV es mayor.

## ABSTRACT

Statins are a family of medications with a high degree of efficacy for the treatment of dyslipidemias. They are used as a lipid-lowering agent of choice for the reduction of cardiovascular risk because of their demonstrated benefits in reducing cardiovascular mortality and morbidity. However, these compounds can degrade when exposed to ultraviolet (UV) radiation, generating free radicals and reactive oxygen species, which can cause phototoxicity and photoallergy reactions to the skin.

This work evaluates the effect of two antioxidant compounds, Ascorbic Acid (Vitamin C) and Tocopherol (Vitamin E) on the photodegradation of Atorvastatin solutions exposed to radiation with monochromatic UV-B light in the presence and absence of vitamins, using two doses of irradiance of 216 and 426  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

The results in general demonstrate that the presence of Ascorbic Acid in the solution to be irradiated from Atorvastatin controls the photodegradation of this drug. In this regard, it was observed that at 70 minutes of radiation using a lower dose, a decrease in the photodegradation of the drug of 26.7% will be achieved compared to the percentage of degradation of the sample in the absence of this vitamin. At higher doses this decrease reaches a higher value compared to the lower dose (39.35% at 100 minutes of exposure).

In the case of the addition of Tocopherol to Atorvastatin solution, the specific results that the addition of this compound does not generate a significant decrease in the photodegradation of Atorvastatin.

The results obtained in this background investigation to show the possible damage that could cause patients exposure to the sun, when they are in the pharmacological treatment with Atorvastatin. Likewise, it could serve as research base studies at in vivo levels, to evaluate mechanisms that reduce adverse effects in people who are exposed to UV-B radiation for prolonged periods or during the day in UV radiation is greater.

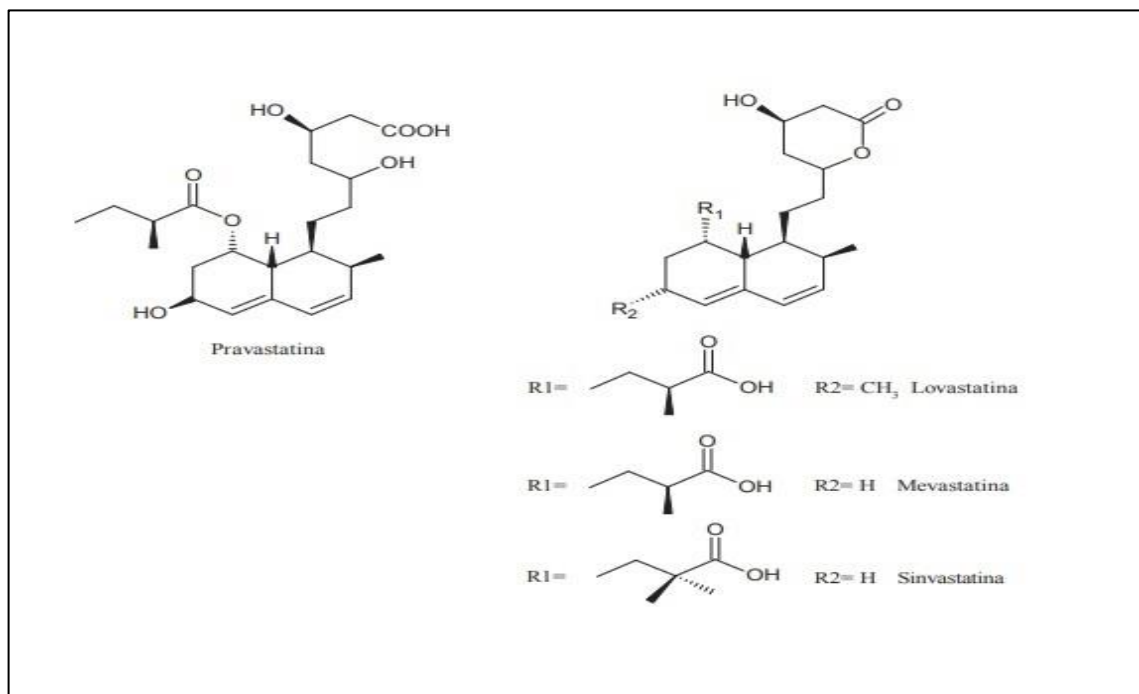
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Estatinas como fármacos hipocolesterolemicos

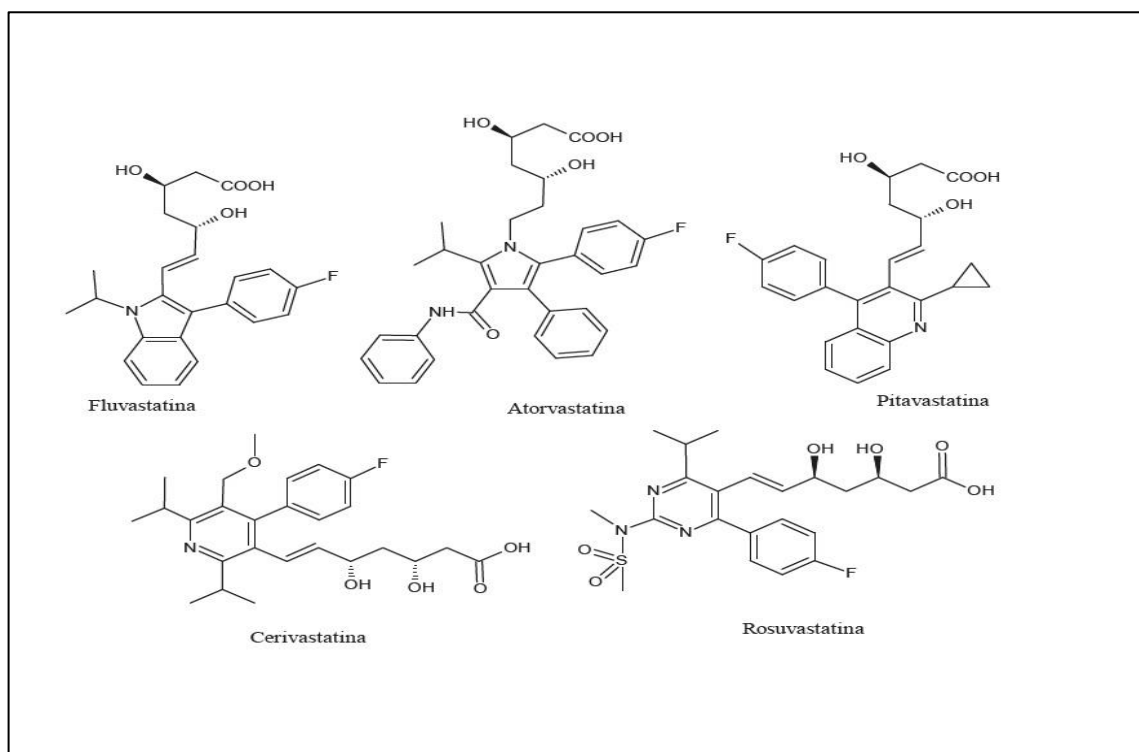
Las estatinas, una familia de fármacos que fueron introducidos al arsenal terapéutico hace aproximadamente treinta años, generan la inhibición competitiva de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa). Esta última, es una enzima clave que cataliza la conversión del HMG-CoA a ácido mevalónico, reacción determinante en la velocidad de la biosíntesis del colesterol en el hígado y de algunos metabolitos intermediarios que son importantes en otros procesos. Al bloquear su función, disminuye la cantidad de colesterol intrahepático, lo que lleva a un aumento de la expresión de receptores de LDL (Low density lipoproteins) en la superficie de los hepatocitos. Desde la sangre, estos receptores captan las LDL y otras lipoproteínas que contienen apolipoproteína B (ApoB), disminuyendo, así, los niveles de Colesterol-LDL plasmático<sup>1</sup>. Además, las estatinas, por un mecanismo aún no establecido, disminuyen la síntesis de VLDL (very low density lipoprotein), reduciendo también los niveles de Triglicéridos (TG)<sup>2</sup>. El efecto que estos fármacos tienen sobre los niveles TG y Colesterol-HDL es limitado a dosis bajas, pero en dosis mayores, alcanzan reducciones de 10-30% de los TG y un aumento de 5-10% del Colesterol-HDL<sup>1</sup>. Asimismo, las estatinas reducen la morbimortalidad cardiovascular, siendo indicadas en el síndrome coronario agudo y en la prevención de accidentes cerebrovasculares.

Esta familia de fármacos conforma un grupo de medicamentos empleados inicialmente por su efecto hipocolesterolémico, pero el avance de las investigaciones sobre sus propiedades biológicas ha permitido determinar que estos compuestos exhiben a la vez importantes efectos pleiotrópicos. Dichos efectos son definidos como todas aquellas bioacciones de un medicamento que son independientes de las originales para las que fue desarrollado. Entre los cuales destacan la actividad antiinflamatoria y antioxidante, utilidad en tratamientos para desórdenes neurodegenerativos como el Alzheimer, uso en cardiopatías no isquémicas, enfermedades autoinmunes, gastrointestinales, prevención de fracturas, osteoporosis degeneraciones maculares, entre otras<sup>3</sup>.

Las estatinas se pueden dividir en dos grupos bien diferenciados: las de origen natural denominadas del tipo I y aquellas que son productos de síntesis o del tipo II<sup>4</sup>. No obstante, ambos tipos poseen en común únicamente la porción afín con la HMG-CoA reductasa responsable de su acción inhibitoria<sup>5</sup>. Las estatinas del tipo I (Figura 1) presentan en común el anillo hexahidronaftaleno con un sustituyente éster  $\alpha$ -metilbutírico y una  $\beta$ -hidroxi- $\delta$ -lactona enlazada por un puente etilénico. En tanto las del tipo II (Figura 2) son moléculas más grandes que las naturales y tienen en común una cadena lateral fluoro-fenil y un ácido heptenoico<sup>6</sup>.



**FIGURA 1:** Estructuras estatinas tipo I



**FIGURA 2:** Estructuras estatinas tipo II

En Chile, según cifras del Ministerio de Salud a través de la encuesta nacional de salud 2016-2017, existe una alta prevalencia de hipercolesterolemia en la población adulta<sup>7</sup>, con un 8% de la población con colesterol elevado. En este sentido, tanto estatinas del tipo I como del tipo II son frecuentemente prescritas (tabla 1). Al respecto, se ha determinado que las dosis mínimas eficaces de las estatinas en la prevención de la enfermedad cardiovascular son: Atorvastatina 10 mg/día, Simvastatina 20-40 mg/día, Lovastatina 20-40 mg/día y Pravastatina 40 mg/día<sup>8</sup>.

Los fármacos de esta familia prescritos en Chile han reportados algunos efectos adversos tales como estreñimiento, náusea, dolor abdominal, diarrea, flatulencia, insomnio y cefalea, que suelen ser leves y transitorios<sup>9</sup>. Además, se ha descrito una elevación de las transaminasas hepáticas aproximadamente en el 1-2% de los pacientes tratados<sup>9</sup>, como también, la aparición de un cierto grado de toxicidad sobre el músculo estriado el cual se ha presentado en cerca de un caso por cada mil pacientes tratados<sup>10</sup>. Cuando las estatinas se utilizan como monoterapia la intensidad de estos efectos adversos puede variar desde mialgias no específicas hasta miositis, que en raras ocasiones progresa a rabdomiólisis, potencialmente mortal por insuficiencia renal aguda<sup>11</sup>.

**TABLA 1:** Clasificación de las Estatinas y su actualidad en Chile.

<b>Origen</b>	<b>Tipo</b>	<b>Representante</b>	<b>Actualidad <sup>a</sup></b>
<b>Natural</b>	<b>I</b>	<b>Lovastatina</b>	<b>Con registro vigente</b>
		<b>Mevastatina</b>	<b>Sin registro vigente</b>
		<b>Pravastatina</b>	<b>Con registro vigente</b>
		<b>Simvastatina</b>	<b>Con registro vigente</b>
<b>Síntesis</b>	<b>II</b>	<b>Atorvastatina</b>	<b>Con registro vigente</b>
		<b>Cerivastatina</b>	<b>Sin registro vigente <sup>b</sup></b>
		<b>Fluvastatina</b>	<b>Sin registro vigente</b>
		<b>Pitavastatina</b>	<b>Con registro vigente</b>
		<b>Rosuvastatina</b>	<b>Con registro vigente</b>

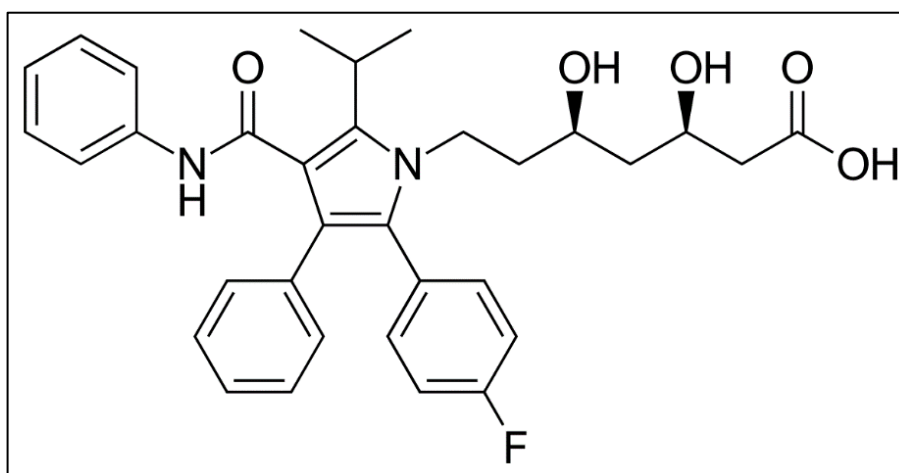
<sup>a</sup> Datos obtenidos del ISP, Sistema de consulta de Productos Registrados.

<sup>b</sup> Retirada del mercado el año 2001 debido a las notificaciones de debilidad muscular, rabdomiolisis y muertes asociadas a ella.

Entre las estatinas de origen sintético frecuentemente prescritas en nuestro país se encuentra la Atorvastatina (figura 3), y sus principales propiedades fisicoquímicas se pueden ver en la Tabla 2. Es un miembro de la familia de las estatinas sintetizada por primera vez en 1985 y aprobada por la Food and Drug Administration (FDA), para su comercialización en 1996<sup>12</sup>. Este compuesto está formado por un pirrol penta-sustituido formado por dos mitades contrastantes con una unidad central heterocíclica aquiral grupo fluorofenil y fenil, carbono dos y tres respectivamente. Asimismo, tiene un grupo fenil-carbamoil sobre el carbono 4, un grupo propan-2-il y sobre el carbono cinco una cadena lateral de ácido 3,5-dihidroxiheptanoico<sup>13</sup>.

Entre sus principales características farmacocinéticas se pueden encontrar su rápida absorción tras su administración oral la cual se incrementa en proporción con la dosis. Además, sus concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan en una o dos horas tras la administración, tiene una biodisponibilidad absoluta de 14% y se une a proteínas plasmáticas en un porcentaje cercano al 98%. Presenta también un volumen medio de distribución aproximado de 381L<sup>14</sup>, se metaboliza en un alto grado a derivados orto y para hidroxilados, y varios productos de beta-oxidación, a través del citocromo P450 3A4, aproximadamente 70 % de la actividad inhibitoria de la HMG-CoA reductasa es atribuida a los metabolitos activos.

La Atorvastatina y sus metabolitos son eliminados primariamente por la bilis siguiendo metabolismo hepático y/o extrahepático; sin embargo, la droga no parece sufrir recirculación enterohepática<sup>15</sup>. La vida media de eliminación plasmática es de catorce horas aproximadamente, mientras que la vida media de la actividad inhibitoria es de veinte a treinta horas debido al efecto de los metabolitos activos<sup>14</sup>, recuperándose al menos el 2% de la dosis de atorvastatina en la orina <sup>16</sup>



**FIGURA 3:** Estructura Atorvastatina

**TABLA 2:** Propiedades fisicoquímicas de atorvastatina <sup>17</sup>

<b>Nombre común</b>	<b>Atorvastatina</b>
<b>Nombre IUPAC</b>	<b>(3R,5R)-7-[2-(4-fluorofenil)-3-fenil-4-(fenilcarbamoil)-5-propan-2-ilpirrol-1-il]-3,5-dihidroxiheptanoico</b>
<b>Peso molecular</b>	<b>558,65 g/mol</b>
<b>Fórmula Química</b>	<b>C<sub>33</sub>H<sub>35</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>
<b>pKa<sub>1</sub></b>	<b>4,3</b>
<b>pKa<sub>2</sub></b>	<b>14,9</b>
<b>Solubilidad</b>	<b>Libremente en metanol</b>
	<b>Ligeramente en etanol</b>
	<b>Muy ligeramente en acetonitrilo, agua destilada y buffer fosfato (pH7,4)</b>
	<b>Insoluble en soluciones acuosas de pH menor a 4</b>

## **1.2 Radiación UV y sus efectos sobre moléculas cromóforas**

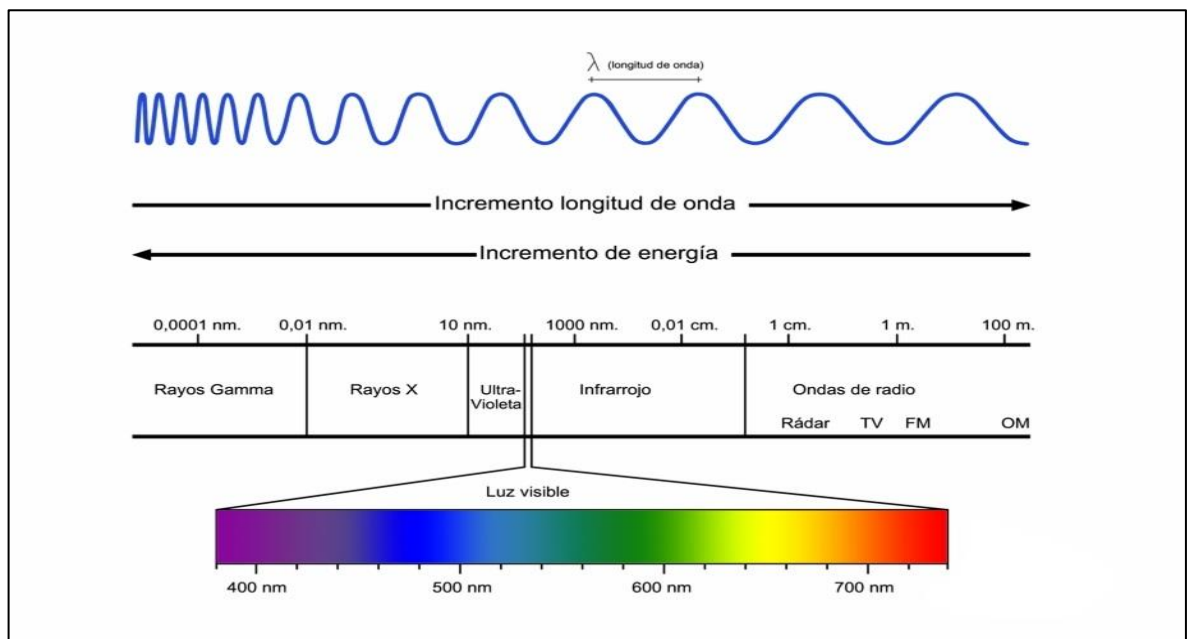
La radiación ultravioleta (UV) pertenece a la banda del espectro electromagnético con longitudes de onda que van desde los 100 a 400 nm aproximadamente. La principal característica de ella es la posibilidad de producir excitaciones en los átomos, generando reacciones químicas.

La radiación UV se divide en 3 zonas según la longitud de onda (figura 4):

- **Radiación UV-A** se extienden entre los 320 – 400 nm, es la parte menos energética de la radiación UV, esta a su vez esta se subdivide en radiación de onda corta (320 a 350 nm) y de onda larga (350 a 400 nm). Los rayos UV-A envejecen a las células de la piel y pueden dañar el ADN de estas. Estos rayos están asociados al daño de la piel a largo plazo tal como las arrugas, además promueven el bronceado y debido a que penetran hasta la dermis puede provocar eritema, también se considera que desempeñan un papel en algunos tipos de cáncer a la piel.

- **Radiación UV-B** se extienden entre los 280 – 320 nm, más energética que la radiación UV-A. Estos rayos pueden dañar directamente al ADN, ya que penetran profundamente la epidermis, producen quemaduras solares y se cree que causan la mayoría de los cánceres de piel.
- **Radiación UV-C** se extienden entre los 200 – 280 nm, es la porción más energética del espectro UV, La mayor parte de los rayos UV-C procedentes de la radiación solar son absorbidos por el ozono atmosférico, de forma que no alcanzan la superficie terrestre<sup>18</sup>.

**Figura 4:** Espectro electromagnético Ultravioleta. Fuente: Física Medica. Física de las radiaciones ionizantes.



Las radiaciones UV-A y en menor medida UV-B, penetran en la atmósfera y contribuyen a la fotosíntesis de las plantas, y a la síntesis de vitamina D. La potencia de la radiación UV que llega a la superficie terrestre depende de múltiples factores como: hora del día, estación del año, latitud, altitud, condiciones atmosféricas, reflejo en las superficies (agua, arena, pavimento, nieve, entre otras), grosor de la capa de ozono<sup>19-20</sup>.

Actualmente el debilitamiento de la capa de ozono, la exposición exagerada a la radiación solar e inadecuada protección frente a los rayos UV, ha desencadenado una serie de enfermedades y problemas a la piel. Esto debido a que los componentes de la radiación solar (fotones) pueden interactuar con numerosas moléculas orgánicas u otras sustancias, generando fotoproductos, los cuales pueden ser nocivos para la salud de las personas.

La radiación solar ejerce varios efectos importantes, tanto beneficiosos como perjudiciales, sobre la piel; la fotosensibilidad es el término utilizado para describir aquellas respuestas anormales a la radiación solar, sin especificar el mecanismo subyacente. Desde el punto de vista del mecanismo fisiopatológico y las manifestaciones clínicas, la radiación UV puede inducir dos tipos de reacciones: fototóxicas o fotoalérgicas

- **Reacciones fototóxicas:** son reacciones de fotosensibilidad de mecanismo no inmunológico, es una respuesta inflamatoria inmediata o retardada, que refleja un daño directo producido por una reacción fotoquímica resultante de las interacciones entre un agente fotosensibilizante y la radiación UV sobre la piel.

Generalmente el cuadro clínico de este tipo de reacciones cursa con ardor, picazón, eritema, edema, hiperpigmentación y descamación, pero se caracterizan por producirse solo en las zonas expuestas a la radiación y aparecer luego de la primera exposición<sup>21</sup>.

Las reacciones fototóxicas se caracterizan por ser dependientes o independientes de oxígeno. Las reacciones dependientes de oxígeno ocurren mediante dos mecanismos. En el primero denominado Tipo I se generan radicales libres, y en el segundo mecanismo denominado Tipo II, una molécula excitada en un estado singlete transfiere el exceso de energía al oxígeno triplete, produciendo la especie oxígeno singlete, altamente reactiva. Ambos mecanismos producen daño sobre las membranas celulares, con la consecuente alteración de la permeabilidad de la membrana y muerte celular <sup>22-23</sup>.

- **Reacciones fotoalérgicas:** son reacciones de fotosensibilidad de mecanismo inmunológico mediada por linfocitos; este tipo de fotosensibilidad tiene una incidencia mucho menor que las reacciones fototóxicas y cursan con eritema, eczema y/o erupciones vesiculobulosas, que por lo general se producen en lugares expuestos a radiación, sin embargo, pueden extenderse a zonas no expuestas<sup>21</sup>. Las moléculas luego de absorber la radiación UV, actúan como un hapteno que al combinarse con proteínas de la piel forman un nuevo antígeno (fotoantígeno), generando así una respuesta inmune. Estas reacciones requieren de una fase de sensibilización (respuesta inmunológica primaria), por lo tanto, no se producen luego de la primera exposición al agente fotosensibilizador y poseen un periodo de inducción de una a dos semanas antes de evidenciar reacciones en la piel<sup>18</sup>.

En la actualidad el tratamiento de este tipo de reacciones es principalmente la suspensión inmediata de la exposición a la fuente de radiación UV a la zona afectada y en caso de no ser posible se debe proteger las zonas. Asimismo, la suspensión o la disminución de dosis del agente fotosensibilizante y la evaluación del uso de fármacos para el alivio sintomático como lo son antihistamínicos y corticoides<sup>24-25</sup>.

La radiación UV también puede afectar a la estabilidad de fármacos resultando en una pérdida de potencia y/o generación de fotoproductos<sup>26</sup>. Los fármacos fotosensibles son cromóforos exógenos que absorben fotones, independientemente si son aplicados directamente sobre la piel (vía tópica) o administrados por vía oral o parenteral, esto debido a la capacidad de penetración que tiene la radiación UV<sup>27</sup>. La estructura química de un cromóforo determina las longitudes de onda de la radiación que absorbe. En este sentido es importante evaluar el comportamiento que tiene el fármaco ante la exposición a la luz no solo desde el punto de vista de su degradación, sino que también la posibilidad de formación de fotoproductos y radicales libres que pueden ser de peligro para los pacientes<sup>27</sup>.

### **1.3 Fotodegradación de Atorvastatina por radiación UV.**

La estructura base de la atorvastatina contiene cromóforos que absorben a longitudes de onda mayores que 290 nm, y por lo tanto, pueden ser susceptibles a la fotólisis directa por la luz solar. Al respecto, existen diversas investigaciones sobre los mecanismos de fotodegradación y caracterización de los fotoproductos generados luego de la exposición a la radiación UV.

Montanaro S. (2009) realizó un estudio fotoquímico de la atorvastatina encontrando que la exposición a la luz solar natural de una solución acuosa conduce a la formación de fotoproductos resultantes de la oxidación del anillo de pirrol y de la ciclación a un derivado de fenantreno<sup>28</sup>. Asimismo, se encontró que la fototoxicidad de la atorvastatina puede atribuirse a la formación de oxígeno singlete con el fotoproducto de tipo fenantreno como fotosensibilizador<sup>28</sup>.

Por otro lado, Cermola F. (2006) llevo a cabo un estudio de fotodegradación de una solución acuosa de atorvastatina se logró identificar por medios espectroscópicos y aislar mediante cromatografía, los fotoproductos generados los cuales presentan un anillo de lactama derivado de una oxidación del anillo de pirrol<sup>29</sup>.

En 2005 Lam y colaboradores efectuaron un estudio del comportamiento fotoquímico de cuatro productos farmacéuticos en aguas naturales, entre ellos la atorvastatina, determinando que todos fueron susceptibles a la fotodegradación directa formando fotoproductos que pueden generar reacciones de fotosensibilización<sup>30</sup>.

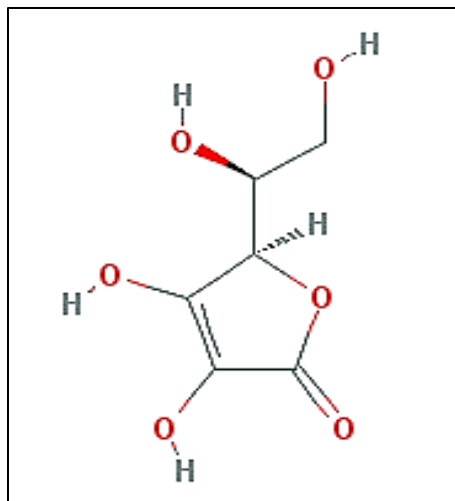
Vukkum P. (2012) en un estudio acerca del comportamiento de degradación de la atorvastatina en condiciones de stress, entre las que se incluyó la radiación UV, determino mediante un análisis químico a través de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), una fotodegradación significativa de este fármaco y la formación de fotoproductos<sup>31</sup>,

#### **1.4 Inhibición de la fotodegradación de Atorvastatina por radiación ultravioleta (UV) mediante incorporación de compuestos antioxidantes.**

La piel está continuamente expuesta a las radiaciones UV-A y en menor medida UV-B influyendo directamente en la formación de especies reactivas generadas por fotodegradación, como radicales libres. En este sentido, en condiciones fisiológicas los encargados de interferir con la acción de estas especies reactivas actuando como sistemas protectores son los sistemas enzimáticos en los que participan las enzimas catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, y glutatión reductasa<sup>32</sup>. Además de sistemas no enzimáticos en los que se involucran micronutrientes como vitaminas, principalmente,  $\beta$ -caroteno (pro-vitamina A), riboflavina (vitamina B2), ácido ascórbico (vitamina C) y tocoferol (vitamina E), entre otras.

Al respecto, los antioxidantes son uno de los compuestos más estudiados para la protección contra los rayos UV-B, ya que, son moléculas que tienen la capacidad de aceptar o donar electrones a los radicales libres desapareados, y en consecuencia neutralizarlos, evitando así la oxidación del sustrato. Algunos de los mecanismos de fotoprotección propuestos para los antioxidantes son: desactivación de estados excitados, transferencia de energía, reacción con radicales libres previniendo o reduciendo especies reactivas. Asimismo, mediante la absorción de la radiación UV, se sugiere que los antioxidantes pueden tener una actividad de filtro absorbiendo parte de la energía procedente de la luz UV<sup>33</sup>.

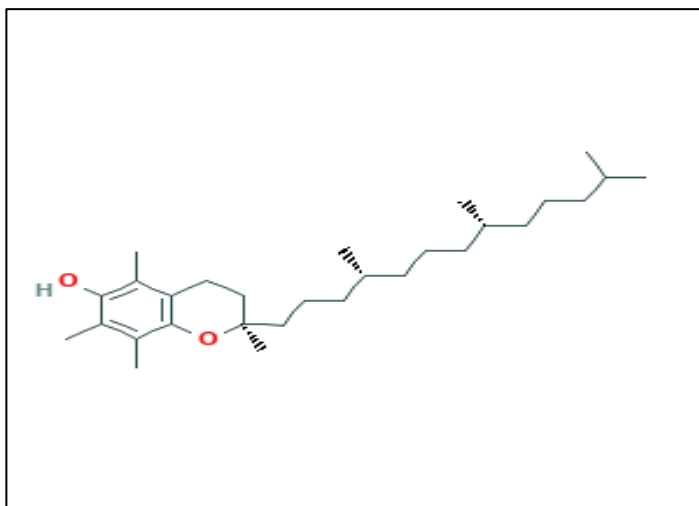
Entre los compuestos más utilizados como agentes antioxidantes se encuentra el ácido ascórbico, el cual es una vitamina hidrosoluble que tiene características reductoras por sus dos grupos donadores de electrones, (Figura 5) <sup>34</sup>.



**Figura 5:** Estructura química del ácido ascórbico.

Este compuesto es uno de los antioxidantes naturales más potentes en fase acuosa, actúa tanto a nivel extracelular como citológico. Reacciona con diferentes especies radicalarias ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $ROO^\cdot$ ,  $OH^\cdot$ ), oxidándose a ácido dehidroascórbico que es más estable a la luz UV y poco reactivo<sup>26</sup>, siendo reducido nuevamente a ácido ascórbico por acción del dehidroascorbato reductasa. La Vitamina C se clasifica como un antioxidante interruptor, ya que, actúa interrumpiendo la reacción en cadena de formación de radicales libres, atrapándolos y reduciéndolos, a diferencia de los antioxidantes, que evitan la iniciación de la secuencia de reacciones<sup>35</sup>. Esta vitamina también posee la capacidad de regenerar vitamina E, y de esta manera la mantiene en un estado activo contribuyendo a la acción antioxidante<sup>36</sup>. Entre las diferentes propiedades del ácido ascórbico cabe mencionar su capacidad de absorber radiación UV y evitar el daño fotoquímico.

Por otro lado, el tocoferol (vitamina E), es una vitamina liposoluble que actúa como antioxidante mediante la acción directa sobre el oxígeno singlete o el anión superóxido. No obstante, se ha demostrado que puede interrumpir la reacción en cadena de la formación de radicales libres, por la donación de hidrógeno a los radicales libres que favorecen la formación de compuestos de baja energía<sup>37-38</sup>. La importancia de esta función es mantener la integridad de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en las membranas de las células y así mantener su bioactividad. (Figura 6)



**Figura 6:** Estructura química del tocoferol<sup>39</sup>

Debido a la existencia de evidencias científicas, que demuestran que la atorvastatina produce reacciones de fotosensibilidad, y a su frecuente uso como fármaco hipolipemiente, este trabajo estudió la capacidad del ácido ascórbico (vitamina C) y del tocoferol (vitamina E) para inhibir la fotodegradación de la atorvastatina cuando se expone a la radiación UV-B.

## **2. HIPÓTESIS**

Compuestos antioxidantes como el ácido ascórbico (vitamina C) o el tocoferol (vitamina E) inhibirían la fotodegradación inducida por radiación UV-B de atorvastatina.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 General:

Determinar el efecto del ácido ascórbico y/o tocoferol en la velocidad de fotodegradación de atorvastatina.

#### 3.2 Específicos:

- Determinar la cinética de fotodegradación en soluciones de concentración terapéutica de atorvastatina, expuestas a la radiación UV-B utilizando dosis de irradiancia de 216 y 426  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .
- Determinar la cinética de fotodegradación de soluciones de atorvastatina, en presencia de Ácido ascórbico, expuestas a la radiación UV-B utilizando dosis de irradiancia de 216 y 426  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .
- Determinar la cinética de fotodegradación de soluciones de atorvastatina, en presencia de Tocoferol, expuestas a la radiación UV-B utilizando dosis de irradiancia de 216 y 426  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

## 4. MATERIALES

### ***Principios Activos***

- Atorvastatina Reutter S.A.
- Ácido ascórbico (vitamina C) Reutter S.A.
- Tocoferol (vitamina E) Reutter S.A.

### ***Reactivos***

- Ácido acético Merck®
- Acetonitrilo Tedia®
- Buffer fosfato salinoPBS
- Etanol Merck®
- Metanol Merck®

### ***Equipos y Materiales***

- Agitador magnético POBEL
- Bomba de vacío R-400 POBEL
- Balanza analítica Skinko Denski® modelo SH 210S
- Cromatógrafo líquido de alta resolución, HPLC Perkin Elmer® Series 200 TotalChrom v6.2.0.0.1
- Columna C – 18 (250mm D.I. 4,6mm, 5µm) RESTEK®
- Espectrofotómetro GENESYS 10 UV
- Filtros 0.22 µm. RESTEK
- Lámpara de arco de mercurio de presión media. Hanovia.
- Micropipeta p200 PIPETMAN. Gilson
- Micropipeta p1000 bioclick. Sartorius
- pH metro oyster PP-201K. GDO
- Radiómetro digital UVX S-8954
- Sistema de purificación de agua EASY pure II. Barnstead.
- Ultrasonido Elma® Transsonic T-310
- Viales ámbar 2 mL. RESTEK

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Cinética de fotodegradación de solución de Atorvastatina

#### 5.1.1 Preparación de solución

Se preparó una solución de atorvastatina 0,7 mM disolviendo 0,04 g del principio activo en 100 mL de una solución de ácido acético-acetonitrilo 30/70.

#### 5.1.2 Proceso de fotodegradación.

La solución de Atorvastatina fue llevada a cubetas de cuarzo, tomando una muestra inicial a tiempo cero de irradiación y el resto de esta solución fue irradiada con luz UV-B, a dosis de irradiancia de 216  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  y 426  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ , utilizando una lámpara de arco de mercurio. El tiempo total de irradiación para Atorvastatina fue de 120 minutos obteniendo muestras cada 10 minutos de irradiación. Se determinó la variación de la concentración del principio activo, en función de la dosis y el tiempo de irradiación a la que fue sometido.

#### 5.1.3 Método analítico

La concentración inicial del principio activo y después de ser irradiado se obtuvo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un cromatógrafo Líquido HPLC Perkin Elmer® Series 200 TotalChrom v6.2.0.0.1, con detector UV-Visible, utilizando una columna C-18 RESTEK. Este equipo entregó una señal de absorbancia, que fue directamente proporcional a la concentración del principio activo en análisis.

Para determinar las condiciones para la detección y cuantificación mediante HPLC se realizó una búsqueda bibliográfica y se seleccionó aquella que produjera una mejor señal. Este método se detalla en el anexo 1a.

#### **5.1.4 Determinación de la constante de cinética de fotodegradación y $t_{50}$ .**

Se determinaron las constantes de fotodegradación a las dos dosis de irradiancia, asumiendo una cinética de primer orden. A través del cálculo de estas constantes se determinaron los valores de  $t_{50}$ , los cuales corresponden al tiempo que debe ser irradiada la muestra para llegar a una concentración del 50 %.

Al considerar una cinética de primer orden, la constante se calculó mediante la aplicación de regresión lineal sobre el logaritmo natural de las concentraciones resultantes. Luego a través del cálculo de la pendiente de la ecuación se obtiene la constante cinética de fotodegradación. Una vez obtenida la constante el tiempo  $t_{50}$  fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$m = -k \qquad t_{50} = 0,693/k$$

m = Pendiente, k = Constante de velocidad

### **5.2 Cinética de fotodegradación de ácido ascórbico (vitamina C) y tocoferol (vitamina E).**

#### **5.2.1 Preparación de las soluciones**

Se prepararon soluciones de ácido ascórbico y tocoferol en concentraciones de 2 mg/dL y 1,5 mg/dL respectivamente en una solución de ácido acético-acetonitrilo 30/70, las cuales corresponden a las concentraciones plasmáticas al consumir la dosis diaria recomendada de estas vitaminas (90 mg/día para ácido ascórbico y 15 mg/día para tocoferol).

#### **5.2.2 Proceso de fotodegradación.**

Las soluciones de ambas vitaminas fueron llevadas a cubetas de cuarzo, tomando una muestra inicial a tiempo cero de irradiación y el resto de esta solución fue irradiada con luz UV-B, utilizando una lámpara de arco de mercurio a dosis de irradiancia de 216  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  y 426  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

El tiempo total de irradiación para ambas soluciones fue de 120 minutos obteniendo muestras cada 10 minutos de irradiación. Se determinó la variación de las concentraciones de estas vitaminas, en función de la dosis y el tiempo de irradiación a la que fue sometida.

### **5.2.3 Método analítico**

Se utilizó un cromatógrafo Líquido HPLC Perkin Elmer® Series 200 TotalChrom v6.2.0.0.1, con detector UV-Visible, utilizando una columna C-18 RESTEK. Este equipo entrega una señal de absorbancia, que es directamente proporcional a la concentración de las vitaminas en análisis.

Para determinar las condiciones para la detección y cuantificación mediante HPLC se realizó una búsqueda bibliográfica y se seleccionó aquella que produjera una mejor señal. Este método se detalla en el anexo 1b.

### **5.2.4 Determinación de la constante de cinética de fotodegradación y $t_{50}$ .**

Se determinaron las constantes de fotodegradación de ambas vitaminas a las dos dosis de irradiancia, asumiendo una cinética de primer orden. A través del cálculo de estas constantes se determinaron los valores de  $t_{50}$ .

## **5.3 Cinética de fotodegradación de soluciones de Atorvastatina en presencia de Ácido ascórbico y Tocoferol.**

### **5.3.1 Preparación de las soluciones**

Se prepararon dos soluciones en matraces de 100 mL, una de atorvastatina más ácido ascórbico y otra de atorvastatina más tocoferol ambas en ácido acético-acetonitrilo 30/70. En cada una de las soluciones la concentración de atorvastatina fue de 0,7 mM, mientras que para ácido ascórbico fue 11,35mM (2mg/mL) y para tocoferol fue de 3,48mM (1,5 mg/mL).

### **5.3.2 Proceso de fotodegradación.**

Las soluciones de atorvastatina en presencia de ácido ascórbico y tocoferol fueron llevadas a cubetas de cuarzo, tomando una muestra inicial a tiempo cero de irradiación y el resto de esta solución fue irradiada con luz UV-B, utilizando una lámpara de arco de mercurio a dosis de irradiancia de 216  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  y 426  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

El tiempo total de irradiación para ambas soluciones fue de 120 minutos obteniendo muestras cada 10 minutos de irradiación. Se determinó la variación de las concentraciones de estas vitaminas, en función de la dosis y el tiempo de irradiación a la que fue sometida.

### **5.3.3 Método analítico**

Se utilizó un cromatógrafo líquido HPLC Perkin Elmer® Series 200 TotalChrom v6.2.0.0.1, con detector UV-Visible, utilizando una columna C-18 RESTEK. Con este equipo se determinaron valores de absorbancia, que son directamente proporcionales a las concentraciones de las soluciones de atorvastatina en presencia de ácido ascórbico y de tocoferol. El método utilizado fue el mismo descrito para la determinación de atorvastatina.

### **5.3.4 Determinación de la constante de cinética de fotodegradación y $t_{50}$ .**

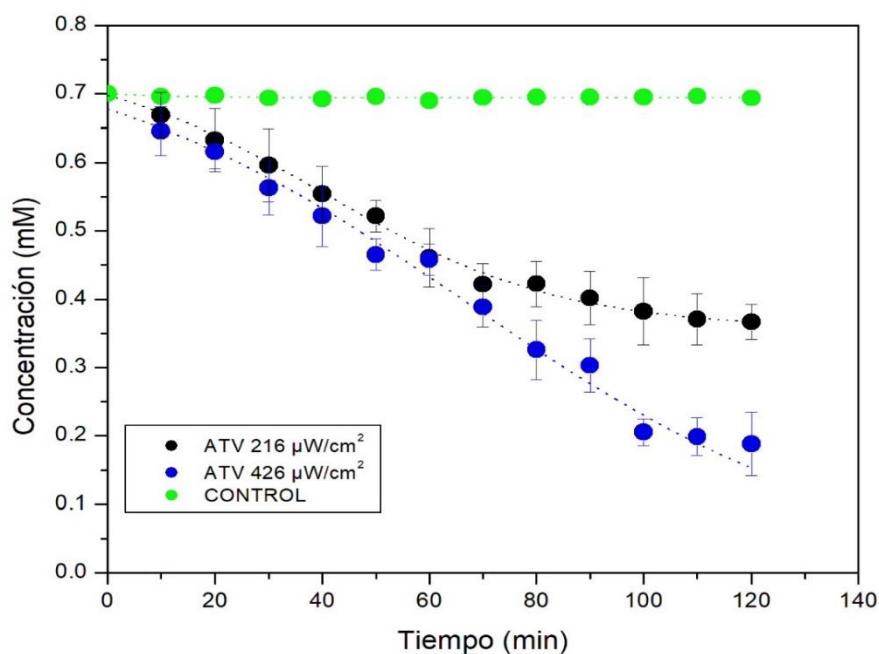
Se determinaron las constantes de fotodegradación de ambas soluciones a las dos dosis de irradiancia, asumiendo una cinética de primer orden. A través del cálculo de estas constantes se determinaron los valores de  $t_{50}$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Fotoestabilidad de Atorvastatina

#### 6.1.1 Seguimiento de fotodegradación de atorvastatina.

Los resultados de la variación de la concentración de la solución de atorvastatina en función del tiempo, al ser irradiadas con luz UV-B utilizando dos dosis de irradiancia ( $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  y  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ), se pueden observar en la figura 7. Estos valores se determinaron a través de los cromatogramas obtenidos por HPLC durante el proceso de fotodegradación de soluciones de atorvastatina (anexo 2). En esta figura se incluyen los resultados del control de la muestra de atorvastatina sin irradiar con la finalidad de descartar la descomposición del principio activo por algún otro proceso no radiativo. En dicha figura es posible apreciar que cuando la solución del fármaco se expuso a la radiación UV-B a una dosis de  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ , su máxima degradación alcanzada fue de aproximadamente un 47,62 % a un tiempo de radiación de 120 minutos. Mientras que, en el mismo período de tiempo, pero utilizando una dosis de  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  la degradación aumenta a un valor aproximado de 73,12 %.



**Figura 7:** Fotodegradación de solución de atorvastatina en función del tiempo, irradiado a  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  y  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Se incluyen además los resultados de degradación de la solución control de atorvastatina.

### **6.1.2 Cinética y porcentaje de fotodegradación de atorvastatina expuesto a dosis de irradiancia de 216 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ y 426 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .**

La tabla 3 muestra los valores de las constantes de velocidad de fotodegradación y de los tiempos de vida media obtenidos de las soluciones de atorvastatina irradiadas a dosis de 216  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  y 426  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . En dicha tabla se observa que la muestra irradiada a 216  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  presenta una constante de velocidad de fotodegradación equivalente a la mitad de la que presenta la muestra irradiada a la dosis de 426  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Respecto del tiempo  $t_{50}$  los resultados muestran un esperado comportamiento inverso, es decir, la muestra irradiada a la dosis de 426  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  presenta un tiempo cercano a la mitad del exhibido por la muestra irradiada a 216  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

<b>Tabla 3:</b> Constante de velocidad de fotodegradación y $t_{50}$ de atorvastatina irradiado a 216 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ y 426 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .		
<b>Dosis (<math>\mu\text{W}/\text{cm}^2</math>)</b>	<b>k (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>	<b><math>t_{50}</math> (min)</b>
216	$6 \times 10^{-3}$	115,55
426	$1,2 \times 10^{-2}$	59,74

## **6.2 Fotoestabilidad de atorvastatina en presencia de ácido ascórbico.**

### **6.2.1 Seguimiento de fotodegradación de atorvastatina en presencia de ácido ascórbico.**

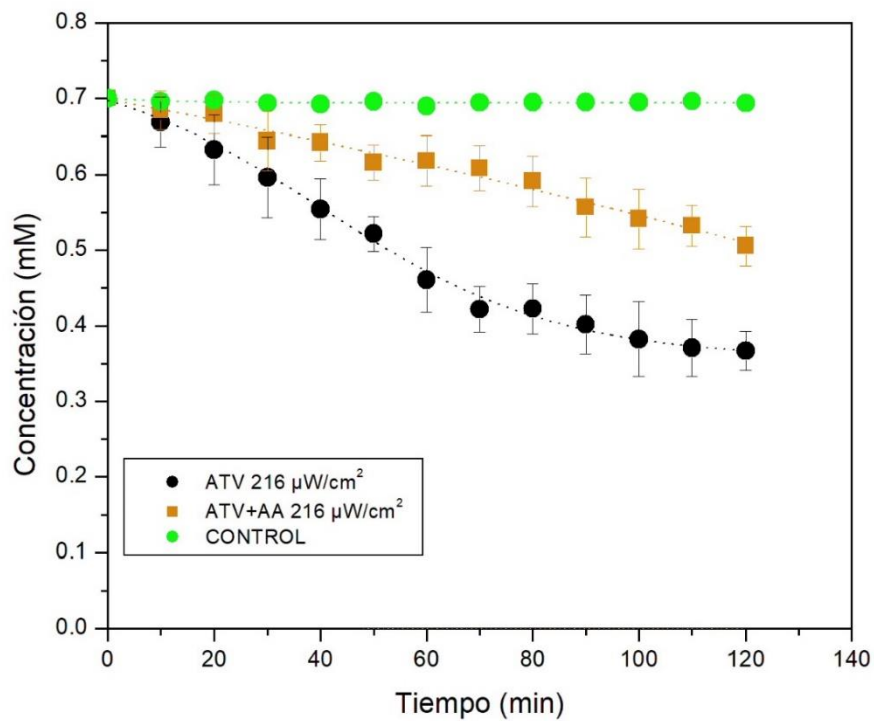
La figura 8 y 9 muestran los resultados de la variación de la concentración de las soluciones de atorvastatina en función del tiempo en presencia y ausencia de ácido ascórbico, en soluciones expuestas a dosis de 216  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  y 426  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ , respectivamente. En ambas figuras se incorporan los resultados del control de atorvastatina sin irradiar, estos valores se determinaron a través de los cromatogramas obtenidos por HPLC durante el proceso de fotodegradación de soluciones de atorvastatina en presencia de ácido ascórbico (anexo 3).

En la figura 8 se observa un máximo porcentaje de fotodegradación de la solución de atorvastatina en presencia de ácido ascórbico de aproximadamente un 27,78 %, cuando esta solución fue irradiada a 216  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  por 120 minutos.

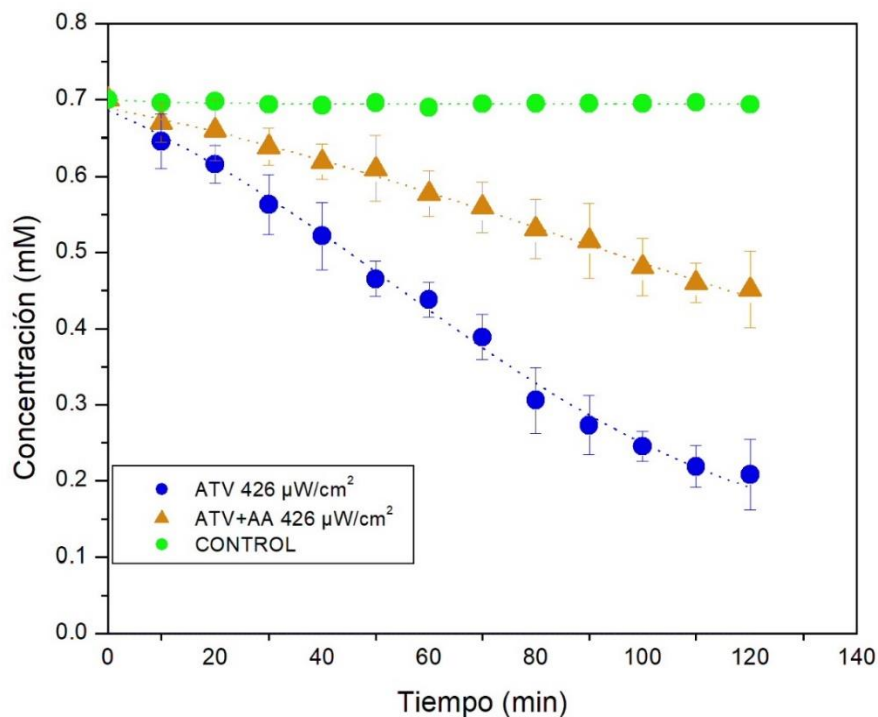
Por otro lado, en la figura 9 se puede observar un porcentaje de fotodegradación de la solución de atorvastatina, de aproximadamente un 35,54 %, cuando esta solución se irradia en presencia de ácido ascórbico y a una dosis 426  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

En la tabla 4 se muestra la disminución en la fotodegradación de atorvastatina que se obtuvo al comparar los resultados obtenidos en presencia de la vitamina con los valores de degradación obtenidos en ausencia de la vitamina (Figura 7) a los 120 minutos de irradiación en ambas dosis.

<b>Tabla 4:</b> Fotodegradación en ausencia y presencia de ácido ascórbico y disminución de la fotodegradación.			
<b>Dosis (<math>\mu\text{W}/\text{cm}^2</math>)</b>	<b>Fotodegradación en ausencia de ácido ascórbico</b>	<b>Fotodegradación en presencia de ácido ascórbico</b>	<b>Disminución fotodegradación</b>
216	47,62%	27,78 %	19,84 %
426	73,12%	35,54 %	37,58 %



**Figura 8:** Comparación entre la fotodegradación de la solución de atorvastatina en presencia y ausencia de ácido ascórbico a una dosis de irradiancia de 216  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Se incluyen además los resultados de degradación de la solución control de atorvastatina.



**Figura 9:** Comparación entre la fotodegradación de la solución de atorvastatina en presencia y ausencia de ácido ascórbico a una dosis de irradiancia de  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Se incluyen además los resultados de degradación de la solución control de atorvastatina.

### **6.2.2 Cinética y porcentaje de fotodegradación de atorvastatina en presencia de ácido ascórbico expuesto a dosis de irradiancia de $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ y $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ .**

En la tabla 5 es posible observar los valores de las constantes de velocidad de fotodegradación y de los tiempos de vida media obtenidos de soluciones de atorvastatina en presencia de ácido ascórbico, sometidas a las dosis de irradiación de  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  y  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Los resultados de dicha tabla muestran que el valor de la constante de velocidad de fotodegradación de la solución irradiada a  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  corresponde aproximadamente a la mitad del obtenido a una irradiación de  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ . En el caso del valor de  $t_{50}$  de la muestra irradiada a  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  se puede observar que este disminuye en 82 minutos aproximadamente respecto del obtenido con la solución de irradiada a  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

Al comparar los valores de las constantes de velocidad de degradación de las muestras irradiadas en presencia de ácido ascórbico, se puede evidenciar una disminución cercana al 65% con respecto al valor obtenido en la solución irradiada en ausencia de esta vitamina, en ambas dosis de irradiancia. Respecto a la comparación del valor del tiempo  $t_{50}$  en presencia y ausencia de este compuesto, se observa que existe un aumento de 151 minutos a dosis de  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  y de 125 minutos a dosis de  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ , cuando las muestras son irradiadas en presencia de ácido ascórbico (tabla 3).

**Tabla 5:** Constante de velocidad de fotodegradación y  $t_{50}$  de atorvastatina irradiado a  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  y  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  en presencia de ácido ascórbico.

Dosis ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ )	k ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{50}$ (min)
216	$2,1 \times 10^{-3}$	266,55
426	$4,0 \times 10^{-3}$	184,80

### **6.3 Fotoestabilidad de atorvastatina en presencia de tocoferol.**

#### **6.3.1 Seguimiento de fotodegradación de atorvastatina en presencia de tocoferol.**

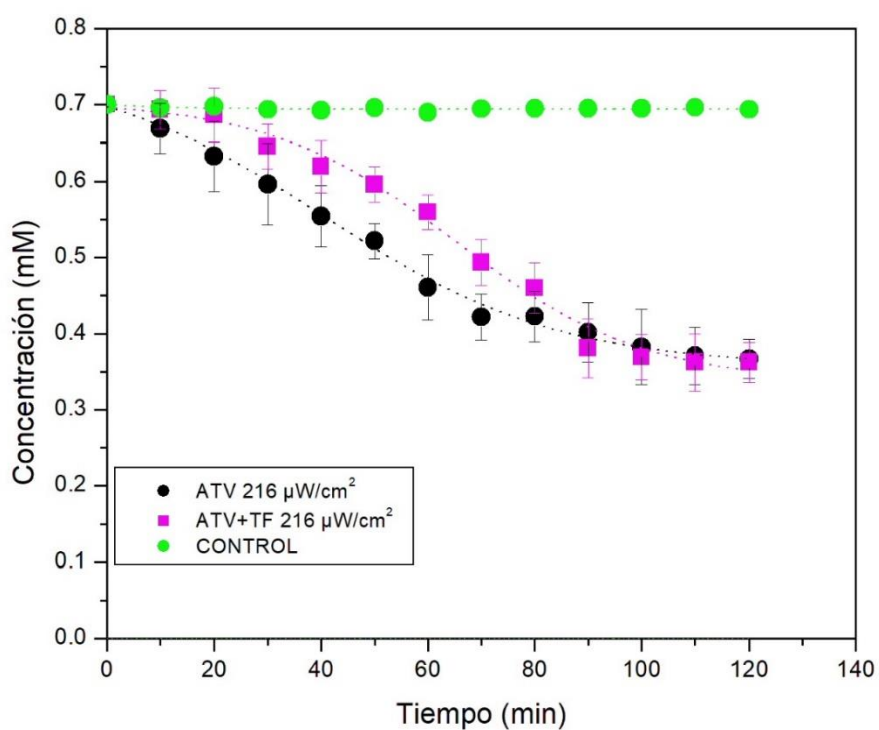
Las figuras 10 y 11 muestran los resultados de la variación de la concentración de las soluciones de atorvastatina en función del tiempo en presencia y ausencia de tocoferol, en soluciones expuestas a dosis de  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  y  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ , respectivamente. En ambas figuras se incluyen los resultados del control de la solución de atorvastatina sin irradiar, estos valores se determinaron a través de los cromatogramas obtenidos por HPLC durante el proceso de fotodegradación de soluciones de atorvastatina en presencia de tocoferol (anexo 4).

En la figura 10 se observa una fotodegradación de la solución de atorvastatina en presencia de tocoferol de un 48,25 % al ser irradiada a  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  durante 120 minutos, en tanto en la figura 11 se observa una fotodegradación de la solución de atorvastatina en presencia de tocoferol de un 74,39 % al ser irradiada a  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  durante 120 minutos.

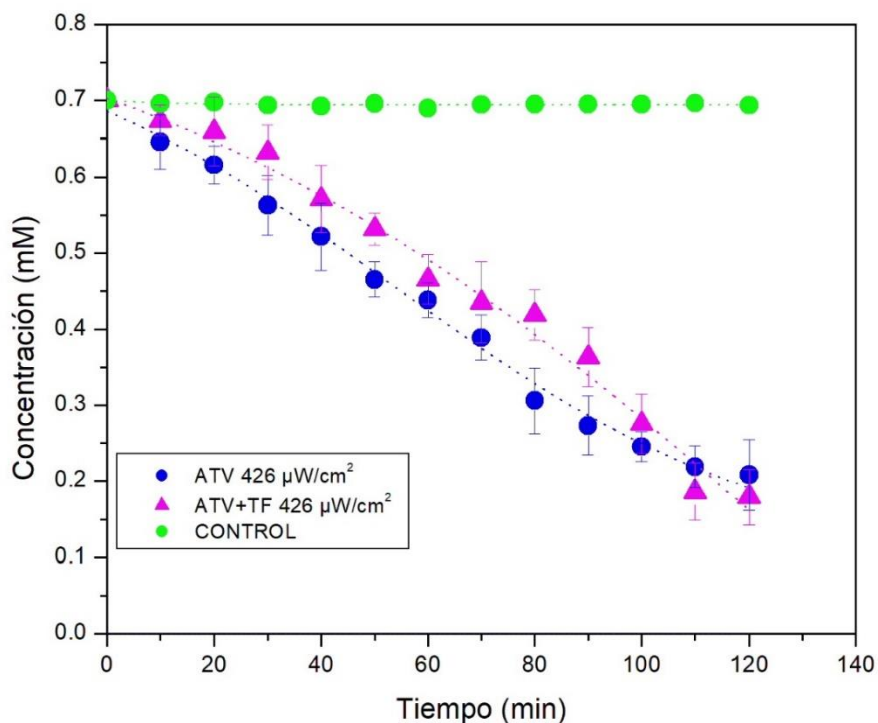
La tabla 5 muestra que no se registraron cambios significativos en la fotodegradación de atorvastatina al comparar con los resultados obtenidos en presencia de la vitamina con los valores de degradación obtenidos en ausencia de la vitamina (Figura 7) a los 120 minutos de irradiación en ambas dosis.

**Tabla 5:** Fotodegradación en ausencia y presencia de tocoferol y disminución de la fotodegradación.

Dosis ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ )	Fotodegradación en ausencia de tocoferol	Fotodegradación en presencia de tocoferol	Disminución fotodegradación
216	47,62%	48,25 %	No significativa
426	73,12%	74,39 %	No significativa



**Figura 10:** Comparación entre la fotodegradación de la solución de atorvastatina en presencia y ausencia de tocoferol a una dosis de irradiación de 216  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Se incluyen además los resultados de degradación de la solución control de atorvastatina.



**Figura 11:** Comparación entre la fotodegradación de la solución de atorvastatina en presencia y ausencia de tocoferol a una dosis de irradiancia de  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Se incluyen además los resultados de degradación de la solución control de atorvastatina.

### **6.3.2 Cinética y porcentaje de fotodegradación de atorvastatina en presencia tocoferol expuesto a dosis de irradiancia de $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ y $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ .**

En la tabla 6 se detallan los valores de las constantes de velocidad de fotodegradación y de los tiempos de vida media obtenidos de soluciones de atorvastatina en presencia de tocoferol sometidas a dosis de irradiación de  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  y  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ . En esta tabla se observa que la muestra irradiada a  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  presenta una constante de velocidad de fotodegradación aproximadamente equivalente a la mitad de la correspondiente a la muestra irradiada a la dosis de  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Respecto de los valores del tiempo  $t_{50}$  se puede observar en la misma tabla 5, que la muestra irradiada a la dosis de  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  presenta una disminución de 56 minutos aproximadamente respecto a muestra irradiada a  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

Los valores obtenidos para la constante de velocidad de degradación de atorvastatina en presencia tocoferol, utilizando ambas dosis de irradiancia, son similares en presencia y ausencia de vitamina. Respecto del tiempo de vida se observa una disminución de 11 minutos cuando se utilizó una dosis de 216  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ , mientras que para dosis mayores solo se evidencia un aumento cercano a los 2 minutos.

**Tabla 6:** Constante de velocidad de fotodegradación y  $t_{50}$  de atorvastatina irradiado a 216  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  y 426  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  en presencia de tocoferol.

Dosis ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ )	k ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{50}$ (min)
216	$6,6 \times 10^{-3}$	104,69
426	$1,1 \times 10^{-2}$	61,28

## 7. DISCUSIÓN

En el desarrollo de esta investigación inicialmente se había propuesto utilizar soluciones de atorvastatina en concentraciones similares a las plasmáticas, las cuales estaban en el orden de los 13 ng/mL. Sin embargo, debido a la baja solubilidad del fármaco en buffer fosfato salino (PBS) a pH 7,4 se debió disolver en una mezcla acetonitrilo y ácido acético 70/30 a pH cercano a 7, utilizando además una concentración mayor a la plasmática. Esto con el objetivo de generar una señal analítica confiable y cuantificable en el cromatograma del equipo HPLC.

En el caso de las soluciones de las vitaminas ambas fueron utilizadas a una concentración similar a la plasmática, Sin embargo, el efecto observado en este rango de concentración es totalmente extrapolable a concentraciones menores. Respecto a su solubilidad en trabajos anteriores<sup>40-41</sup>, se señala que el solvente utilizado permite su disolución.

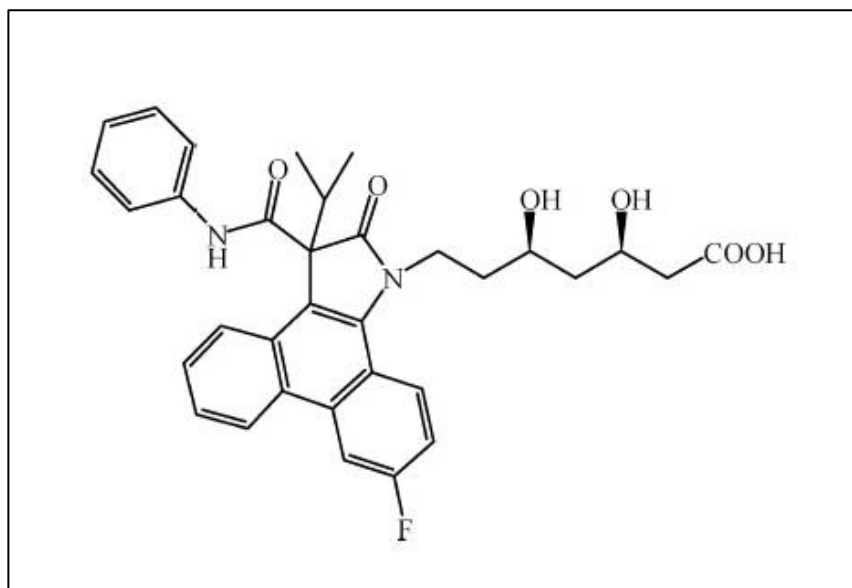
El rango de radiación utilizado en este trabajo fue elegido en la región UV-B (280-315 nm) debido a que esta radiación es la que llega con mayor intensidad a la superficie de la Tierra, mientras que la radiación UV-C es filtrada por la capa de ozono y la UV-A se desestima por tener menor energía.

Las intensidades de ambas dosis de irradiación utilizadas en el transcurso de este estudio fueron establecidas en un trabajo anterior<sup>42</sup>, las cuales equivalen a las dosis de mayor irradiación solar del día en la ciudad de Valparaíso en época de verano (216  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) y el doble de la irradiancia determinada a medio día (426  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ).

### **7.1 Fotoestabilidad de atorvastatina.**

En la figura 7 es posible observar que cuando soluciones de atorvastatina son expuestas a la radiación UV-B, se observa una disminución en la concentración de este fármaco, por ende, una fotodegradación en ambas dosis de irradiancia utilizadas. Sin embargo, dicha degradación aumenta con el incremento de la dosis alcanzando un máximo valor de 73,12% a un tiempo de exposición de 120 minutos, cuando fue utilizada una irradiancia de 426  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

En este sentido se ha descrito que la principal ruta de degradación de este fármaco sería cuando la porción con estructura similar al estilbeno presentaría una electrociclación generando un estado transitorio denominado dihidrofenantreno. Posteriormente, este último compuesto se oxidaría formando finalmente una estructura de fenantreno (figura 12), que es un compuesto que posee mayor estabilidad frente a la fotólisis<sup>43</sup>. Adicionalmente a esta ruta, existen otras que siguen tres diferentes vías, que incluyen hidroxilaciones en el anillo aromático que se deshidratan intramolecularmente para formar lactonas hidroxiladas, clivaje del grupo N-fenilamida y finalmente una vía en la que el oxígeno singlete ataca el anillo pirrol generando una apertura de este ciclo <sup>44</sup>.



**Figura 12:** Estructura fotoproducto de atorvastatina.

Debido a que la cuantificación de los valores de degradación de atorvastatina fue realizada sólo en función de la medición de la señal principal que representa a la molécula del fármaco en el cromatograma de HPLC (Anexo 2), no se cuantificaron las señales de los fotoproductos de degradación. Esto debido principalmente a que no se contaba con muestras patrones que permitieran la identificación analítica de dichas moléculas intermediarias.

De manera anexa a los ensayos de degradación de atorvastatina utilizando ambas dosis de irradiancia, fue medida una solución control la cual no fue expuesta a la radiación UV. La determinación de este control permite asegurar que la descomposición del fármaco sólo se realiza por un proceso fotodegradativo y no por otros factores externos como son el pH y temperatura de la solución o el porcentaje de humedad.

Los valores de la constante de velocidad de fotodegradación calculados para atorvastatina descritos en la tabla 3 indican que a medida que el fármaco es expuesto a una mayor dosis de irradiancia existe un aumento en la velocidad de degradación y por ende una disminución en el valor de tiempo  $t_{50}$ . Cabe destacar, que el cálculo de la constante de velocidad y del  $t_{50}$  fue realizada asumiendo que la degradación de este fármaco sigue una cinética de primer orden, de acuerdo con lo establecido en estudios previos<sup>42-45</sup>.

La importancia de determinar cómo afecta la radiación UV-B a la estabilidad de atorvastatina, a través de la determinación de parámetros como la constante de velocidad y  $t_{50}$  radica en que, a nivel biológico, se podría cuantificar la disminución de la concentración plasmática del fármaco en función de dosis de radiación recibida por el paciente.

Debido a la probada inestabilidad que presentaron soluciones de atorvastatina frente a la radiación UV-B, es objeto de interés el estudio de la incorporación de agentes antioxidantes, que permitan una disminución de su fotodegradación. En esta investigación se utilizó el ácido ascórbico (vitamina C) como agente inhibidor de la fotodegradación, debido a su alta reactividad con los agresivos radicales de oxígeno, siendo un antioxidante importante<sup>46</sup>, además en trabajos anteriores realizados por el grupo investigativo se demostró su capacidad de disminuir la fotodegradación de diversos fármacos <sup>42-45</sup>. Por otro lado, adicionalmente se estudió el efecto de la incorporación de tocoferol, ya que, este compuesto orgánico liposoluble es conocido por su alta capacidad antioxidante, siendo capaz de capturar los radicales libres y detener las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica<sup>47-48</sup>.

Ambas vitaminas se encuentran entre los sistemas antioxidantes mas estudiados para la protección del stress oxidativo en sistemas biológicos<sup>49</sup>.

## **7.2 Fotoestabilidad de atorvastatina en presencia de ácido ascórbico**

Los resultados del efecto de ácido ascórbico sobre la fotodegradación de atorvastatina utilizando ambas dosis de 216  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  y 426  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  se muestran en las figuras 8 y 9 respectivamente. En ambas figuras se puede observar una disminución en los porcentajes de degradación de Atorvastatina en presencia de vitamina C, en todo el rango de tiempo de radiación ensayado

Al utilizar una dosis mayor de irradiación (figura 9) se observa de igual manera una disminución en la degradación de la atorvastatina en todo el rango de tiempo estudiado. Sin embargo, esta disminución alcanza un mayor valor en comparación a la menor dosis, debido a que a los 100 minutos de exposición se observa un porcentaje de degradación 39,35% más bajo que la muestra del fármaco en ausencia de la vitamina.

Al observar los valores de las constantes de fotodegradación (tabla 4) se evidencia que los valores para ambas dosis de irradiancia tienen una disminución cercana al 35%, en comparación con los valores obtenidos en ausencia de la vitamina. Respecto al tiempo  $t_{50}$  para ambas dosis de irradiación  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  y  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  existe un aumento del valor aproximadamente de 44% y un 32% respectivamente, en comparación con los valores obtenidos en ausencia de ácido ascórbico.

El análisis de los cromatogramas obtenidos por HPLC de ácido ascórbico luego de la fotodegradación por la luz UV-B (Anexo 5), no muestran señales atribuibles a subproductos, lo que evidencia que dicho compuesto no generaría especies reactivas.

### **7.3 Fotoestabilidad de atorvastatina en presencia de tocoferol.**

Los resultados del efecto de tocoferol sobre la fotodegradación de atorvastatina utilizando ambas dosis de  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  y  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  se pueden observar en las figuras 10 y 11 respectivamente.

Un análisis general de ambas figuras permite observar que la presencia de tocoferol en la solución de irradiación de atorvastatina disminuye levemente la fotodegradación de este fármaco, y sólo en un rango de tiempo entre 40 y 70 minutos para la dosis de  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  y entre 50 y 80 minutos en la dosis de  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ . A tiempos mayores de irradiación no se observa alguna disminución significativa en los porcentajes de degradación de atorvastatina.

Al observar los resultados utilizando la dosis de irradiancia menor es posible ver (figura 10) que el efecto de la vitamina en la disminución de la fotodegradación del fármaco es máximo a los 60 minutos obteniendo un 14,10% menos de degradación en comparación con la muestra irradiada en ausencia de la vitamina. Asimismo, es posible evidenciar que el efecto del tocoferol en la fotodegradación del fármaco es hasta los 80 minutos de irradiación presentando una fotodegradación de 34% lo que equivale a una disminución de sólo un 5,33% en la fotodegradación de la atorvastatina.

Los resultados que se muestran en la figura 11, permiten observar que utilizando una dosis mayor de irradiación el efecto máximo de la vitamina se evidencia sólo a los 80 minutos obteniendo un 13,31% menos de fotodegradación en comparación con la muestra del fármaco en ausencia de la vitamina. Se observa, además, que el efecto de tocoferol sobre la fotodegradación del fármaco es significativo hasta los 110 minutos de irradiación presentando una fotodegradación de 74,40% lo que equivale a un 2,8% menos de fotodegradación. A tiempos superiores no se observa un efecto significativo de la vitamina E en la disminución de la degradación de atorvastatina.

Este comportamiento, puede ser cuantificado al observar los valores obtenidos para la constante de velocidad de fotodegradación de atorvastatina y para el tiempo  $t_{50}$  (tabla 6) en presencia de tocoferol. Los resultados evidencian que no hubo cambios significativos de estos parámetros cinéticos, cuando se realizó la fotodegradación del fármaco en presencia de tocoferol.

Los resultados obtenidos en esta investigación podrían servir de antecedentes para evidenciar el eventual daño que podría causar a los pacientes la exposición al sol, cuando se encuentren en tratamiento farmacológico con atorvastatina. Asimismo, podrían servir como estudios bases de investigaciones a niveles *in vivo*, que evaluarán mecanismos que disminuyan los efectos adversos en personas que se exponga por periodos prolongados a la radiación UV-B o en aquellas horas en la que radiación UV es mayor.

## **8. CONCLUSIONES**

- Soluciones de atorvastatina son degradadas cuando se exponen a la radiación UV-B a dosis de  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  y  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$
- La adición de ácido ascórbico a una solución de atorvastatina logra disminuir la fotodegradación del fármaco, frente a la radiación UV-B debido a su alto poder reductor lo que le permite interactuar con diferentes especies radicalarias
- La adición de tocoferol a una solución de atorvastatina no genera una disminución significativa de la fotodegradación de atorvastatina
- El ácido ascórbico resulta ser una buena alternativa para ser utilizado como agente inhibidor de la fotodegradación en fármacos fotosensibles.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Arteaga A MA, Rigotti A, Cortes V. Manual de Dislipidemias. Metabolismo y clínica. Santiago de Chile: Editorial Mediterráneo; 2016. 192 pp.
2. Stein EA, Lane M, Laskarzewski P. Comparison of statins in hypertriglyceridemia. *Am J Cardiol.* 1998;81(4a):66b-9b
3. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol.* 2005; 45 89-118pp.
4. Istvan E. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. *Atherosclerosis Supplements.* 2003; 4: 3-8pp.
5. Manzoni M, Rollini M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl Microbiol Biot.* 2002; 58:555-56pp.
6. Nirogi R, Mudigonda K, Kandikere V. Chromatography–mass spectrometry methods for the quantitation of statins in biological samples. *J Pharm Biomed Anal.* 2007 jun; 44 (2): 379-387pp.
7. Ministerio de salud Gobierno de Chile. Encuesta Nacional de Salud 2016-2017. 2017.8.
8. Elsevier. <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-atorvastatina-13128913>. (Página visitada el 25 de julio del 2019).
9. Black DM, Bakker-Arkema RG, Nawrocki JW (1998). An overview of the clinical safety profile of atorvastatin (Lipitor), a new HMG-CoA reductase inhibitor. *Arch Intern Med;* 158:577-584pp.
10. Maron DJ, Fazio S, Linton MF, et al. (2000) Current perspectives on statins. *Circulation.* 101:207-213.
11. Scielo. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872001001100001>. (Página visitada el 10 de julio del 2018).
12. Corey, Czako B, and Kurti L. (2007). *Molecules and medicine*. John Wiley & Sons, Inc.

13. Ye YC, Zhao XL, Zhang SY: Use of atorvastatin in lipid disorders and cardiovascular disease in Chinese patients. *Chin Med J (Engl)*. 2015 Jan 20;128(2):259-66.
14. A multiple-dose, dose-proportionality study of atorvastatin tablets prepared from crystalline 1 lots. Parke-Davis Research. RR 744-00247.
15. A study of the effects of activated charcoal on the pharmacokinetics of atorvastatin (Protocol 981-097-0). Parke-Davis Research. RR 744-00258.
16. A study of the mass balance and metabolism of [14C]CI-981 following multiple-dose CI-981 administration in healthy volunteers (Protocol 981-020-0). Parke-Davis Research. RR 744-00163.
17. Pubchem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60823#section=2D-Structure>. (Página visitada el 5 de julio del 2019).
18. Cabrera S, Lissi E, Honeyman J. (2005). Radiación ultravioleta y salud. 1ª Edición. Editorial Universitaria, S.A. Chile.
19. Vásquez R. (1984). Cinética y estudios mecanísticos preliminares sobre fotodegradación de Griseofulvina (Tesis de pregrado). Universidad de Valparaíso. Escuela de Química y farmacia. Valparaíso.
20. American Cancer Society. (2017). ¿Qué es la radiación ultravioleta UV? <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-piel/prevencion-y-deteccion-temprana/que-es-la-radiacion-de-luz-ultravioleta.html>. (Página visitada el 16 de julio del 2019).
21. Miranda, M. A. (1997). Phototoxicity of drugs. In vitro methods in pharmaceutical research, 13, 289-315 pp.
22. Fernández, E, & Sánchez, G. (2005). Relación estructura-fotoestabilidad y fototoxicidad de fluoroquinolonas. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 71(4), 835–848.
23. Kevin R. Stein, Noah S. Scheinfeld. (2007). Drug-induced photoallergic and phototoxic reactions. *Expert Opin. Drug Saf*, 6(4):431-443.

24. Bonet, R. & Garrote, A. (2011) Farmacoterapia y exposición solar. Revisión. *Ámbito farmacéutico*, 30(4), 7-75.
25. Lobos, C. & Cárdenas J (2017) Fotosensibilidad: Fotoalergia y fototoxicidad asociada a medicamentos y cosméticos. *Boletín de farmacovigilancia N°9 Instituto de Salud Pública*.
26. Sheraz, M. A., Ahmed, S., Ahmed & Vaid, F. H. M (2010). Photodegradation and photostabilization of ascorbic acid in pharmaceutical preparations.1, 68-70
27. Vinod, V., Budhwaar, V., & Nanda, A. (2015). Photochemical fate of pharmaceuticals: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-science*, 4(2), 54-70.
28. Montanaro S, Lhiaubet-Vallet V, Iesce MI, Previtera L, Miranda MA. (2009) A mechanistic study on the phototoxicity of atorvastatin: singlet oxygen generation by a phenanthrene-like photoproduct. 22(1);173-78pp.
29. Cermola F, DellaGreca M. (2006). Photochemical behavior of the drug atorvastatin in water. 62(1);7390-95pp.
30. Lam, M. W., and Mabury, S. A. (2005) Photodegradation of the pharmaceutical's atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquat. Sci.* 67, 177–188.
31. Vukkum P, Moses Babu J, Muralikrishna R. (2013). Stress Degradation Behavior of Atorvastatin Calcium and Development of a Suitable Stability-Indicating LC Method for the Determination of Atorvastatin, its Related Impurities, and its Degradation Products. 81(1); 93-114.
32. Patil S. B, Kodliwadmath, S. M. (2007). Study of oxidative stress and enzymatic antioxidants in normal pregnancy. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22(1), 135-137.
33. Coelho, L., Almeida, I. F., Sousa Lobo, J. M., & Sousa e Silva, J. P. (2018). Photostabilization strategies of photosensitive drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 541(1–2), 19–25.

34. Pubchem. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54670067#section=2D-Structure\\_](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54670067#section=2D-Structure_)  
(Página visitada el 30 de julio del 2019).
35. Trigo, J. (2006). Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed*, 25(2).
36. Serra, H. M., & Cafaro, T. A. (2007). Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41(4), 525–532.
37. Steenvoorden DP. van Henegouwen GM. (1997). The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J Photochem Photobiol B* 41: 1–10.
38. Nachbar F. Korting H. (1995). The role of vitamin E in normal and damaged skin. *J Mol Med*; 73: 7–17.
39. Pubchem. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14985#section=2D-Structure\\_](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14985#section=2D-Structure_)  
(Página visitada el 30 de julio del 2019).
40. Misato Iwatsuki. Jyunichi Tsuchiya. Erika Komuro. (1994). Effects of solvents and media on the antioxidant activity of a-tocopherol. *1200(1)*; 19-26.
41. Anvar Shalmashi. Ali Eliassi. (2008). Solubility of L-(+)-Ascorbic Acid in Water, Ethanol, Methanol, Propan-2-ol, Acetone, Acetonitrile, Ethyl Acetate, and Tetrahydrofuran. 1332-1334.
42. León. C. (2018). Efecto de ácido ascórbico y riboflavina, en la Fotodegradación de paracetamol, ibuprofeno y ketoprofeno. (Tesis de pregrado). Universidad de Valparaíso. Escuela de Química y Farmacia. Valparaíso.
43. Gilbert, A. (2004). Cyclization of stilbene and its derivative. In *Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, 2nd ed. (Horspool, W., and Lenci, F., Eds.) Chapter 33, pp 1-11.
44. Mengjie Wang. Jianhua Li. Huanhuan Shi. (2018). Photolysis of atorvastatin in aquatic environment: Influencing factors, products, and pathways. 467-475.

45. Henríquez. C. (2019). Evaluación del efecto fotoprotector de ácido ascórbico sobre las fluoroquinolonas ciprofloxacino y moxifloxacino, expuestos a radiación UV-B. (Tesis de pregrado). Universidad de Valparaíso. Escuela de Química y Farmacia. Valparaíso.
46. Branka Rozman and Mirjana Gasperlin. (2008). Stability of Vitamins C and E in Topical Microemulsions for Combined Antioxidant Therapy. 14(4);235-45.
47. Njus D, Kelley PM. (1991). Vitamins C and E donate single hydrogen atoms in vivo. FEBS. Lett 284;147-51.
48. M. Waghmode, M. Kamble, A. Shruti, (2012). Pharmaceutical profile of alpha-tocopherol. A brief review, Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci. 1. 1023–1039
49. Offord E. A., Gautier, J. C. Avanti, O., Scaletta, C., Runge, F., Kramer, K., and Applegate, L. A. (2002). Photoprotective potential of lycopene,  $\beta$ -carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UV irradiated human skin fibroblasts. Free Radic. Biol. Med. 32:1293–1303.

## ANEXOS

**Anexo 1: Condiciones para la detección y cuantificación de muestras de atorvastatina, ácido ascórbico y tocoferol**

**a. Condiciones para la detección de atorvastatina.**

	<b>atorvastatina</b>
<b>Fase móvil</b>	ácido acético 0,1 % / acetonitrilo (25:75)
<b>T° columna</b>	25 °C
<b>Longitud de onda</b>	238 nm
<b>Velocidad de flujo</b>	1 mL/min
<b>Volumen de inyección</b>	5 µL
<b>Tiempo de análisis</b>	8 min

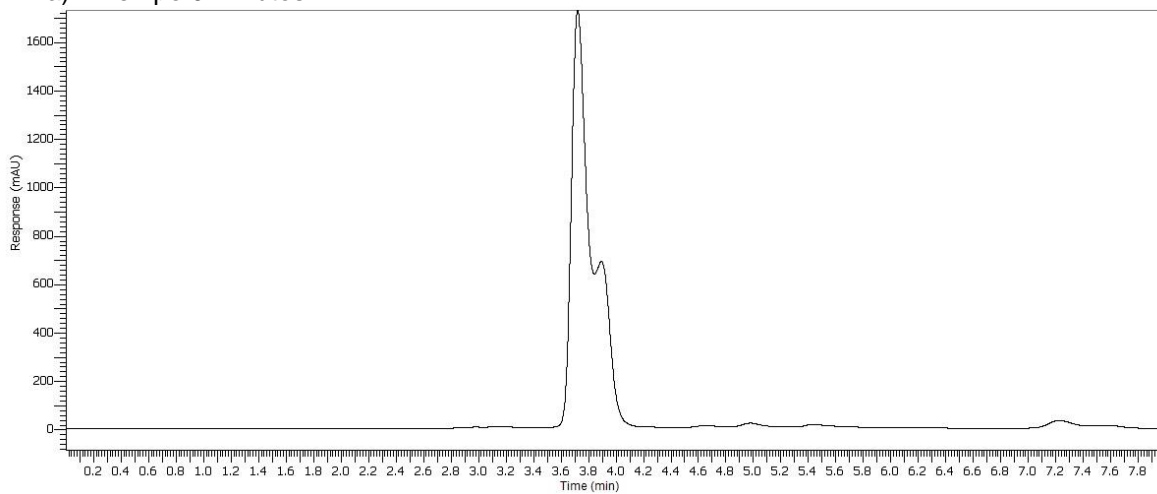
**b. Condiciones para la detección de ácido ascórbico y tocoferol.**

	<b>ácido Ascórbico</b>	<b>tocoferol</b>
<b>Fase móvil</b>	agua UP/metanol (80:20)	acetonitrilo/metanol (70:30)
<b>T° columna</b>	25 °C	25 °C
<b>Longitud de onda</b>	230 nm	325 nm
<b>Velocidad de flujo</b>	1 mL /min	1 mL/min
<b>Volumen de inyección</b>	10 µL	10 µL
<b>Tiempo de análisis</b>	10 minutos	10 minutos

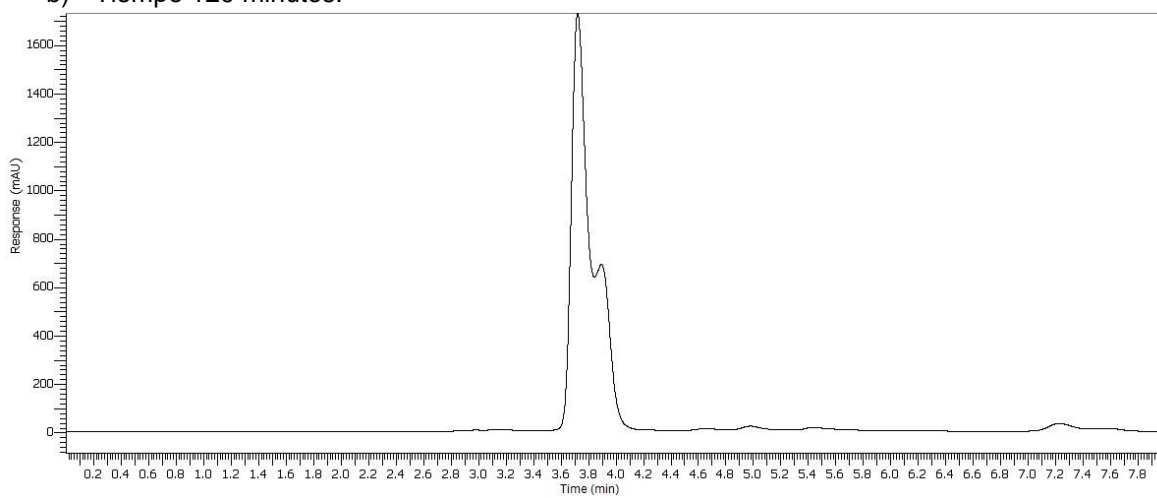
**Anexo 2:** Cromatogramas fotodegradación atorvastatina son irradiar e irradiado a  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  y  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

1. Atorvastatina 0,7 M sin irradiar.

a) Tiempo 0 minutos.

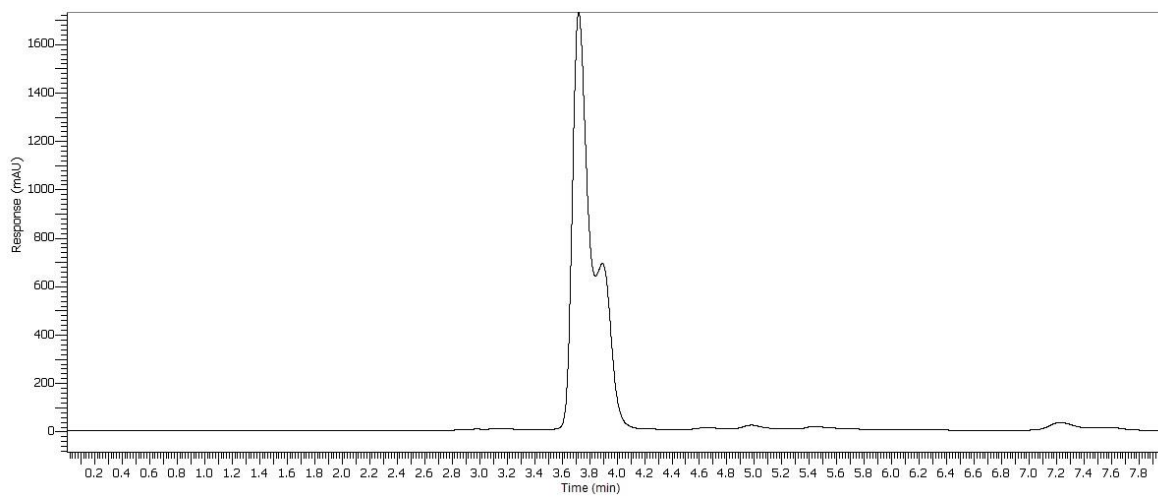


b) Tiempo 120 minutos.

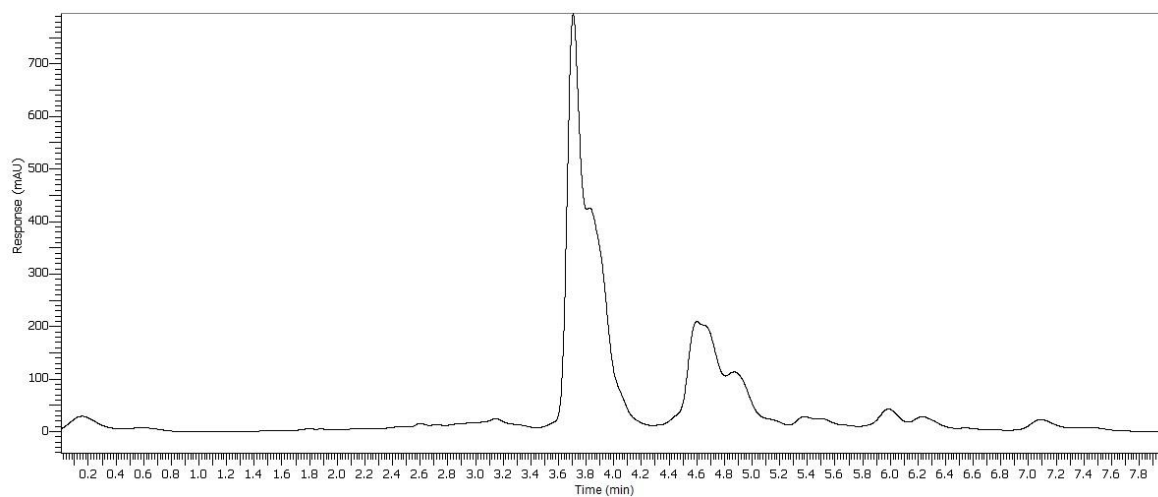


2. Atorvastatina 0,7 M expuesta a  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

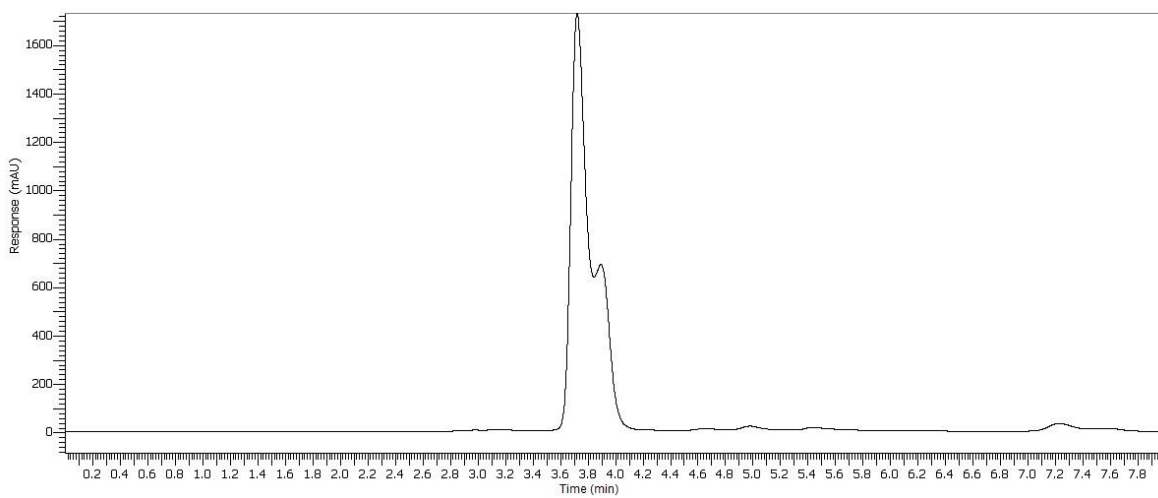
a) Tiempo 0 minutos



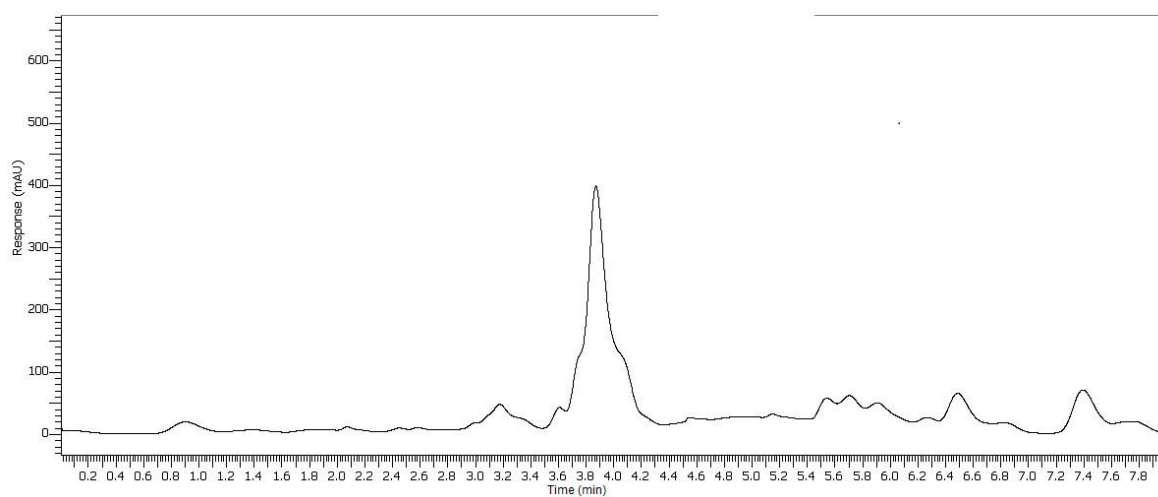
b) Tiempo 120 minutos



3. Atorvastatina 0,7 M expuesta a  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ .



a) Tiempo 0 minutos

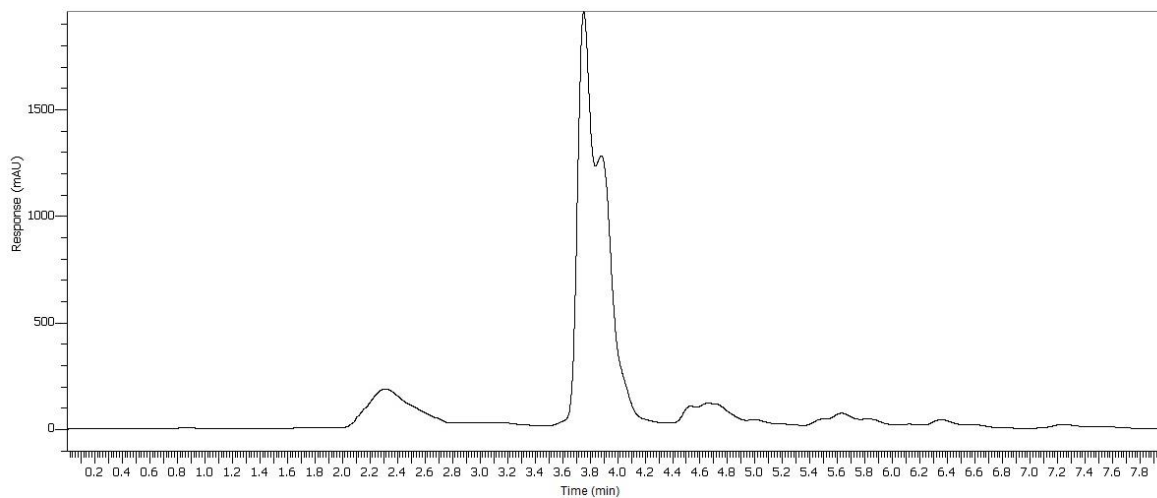


b) Tiempo 120 minutos

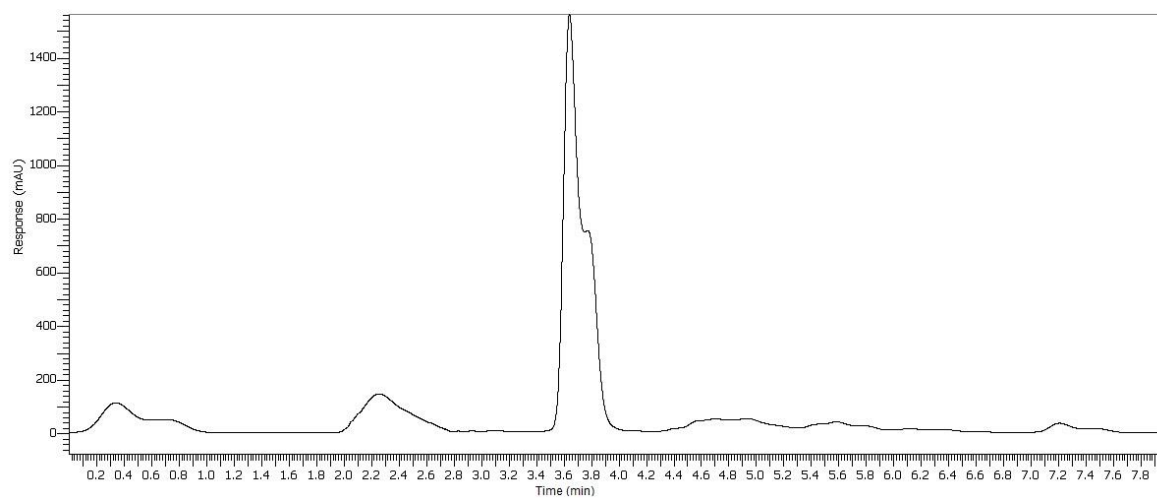
**Anexo 3:** Cromatogramas fotodegradación atorvastatina en presencia de ácido ascórbico sin irradiar e irradiado a  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  y  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

1. Atorvastatina 0,7 M en presencia de ácido ascórbico expuesto a  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

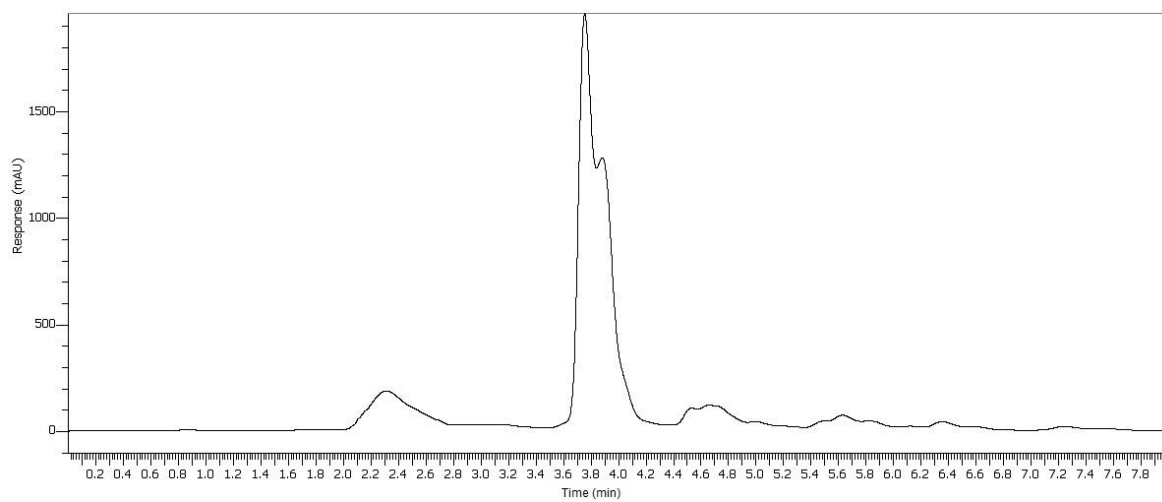
a) Tiempo 0 minutos



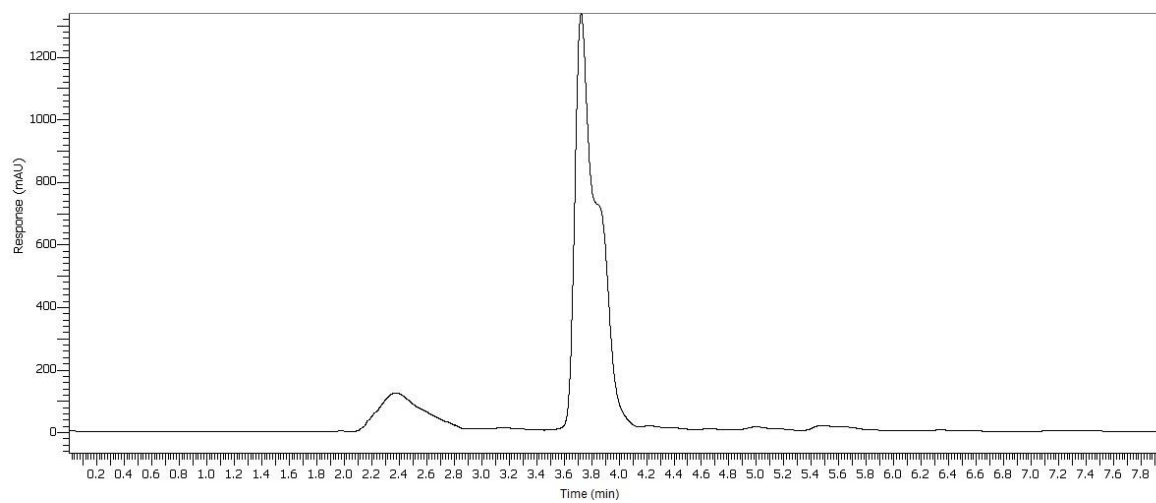
b) Tiempo 120 minutos



2. Atorvastatina 0,7 M en presencia de ácido ascórbico expuesto a  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ .



a) Tiempo 0 minutos

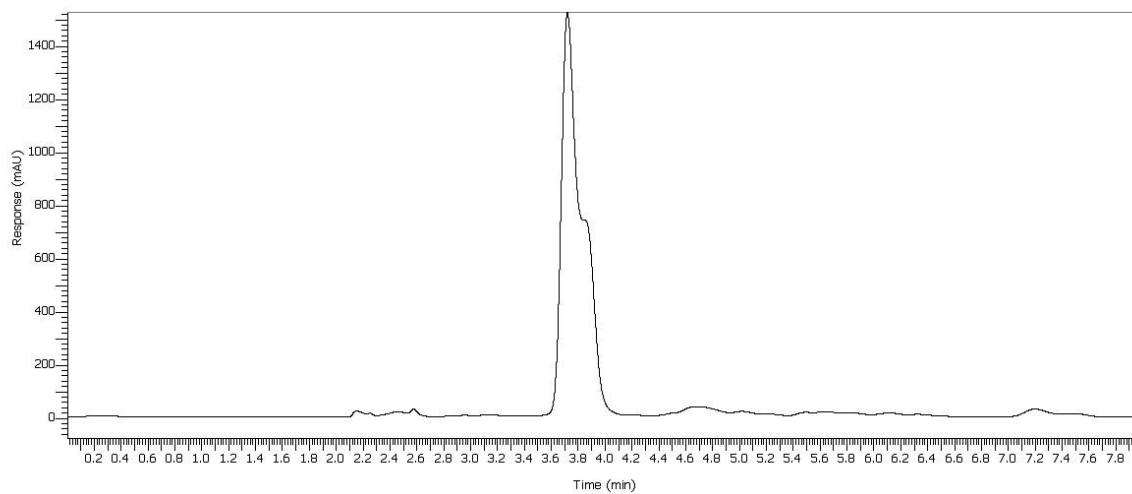


b) Tiempo 120 minutos

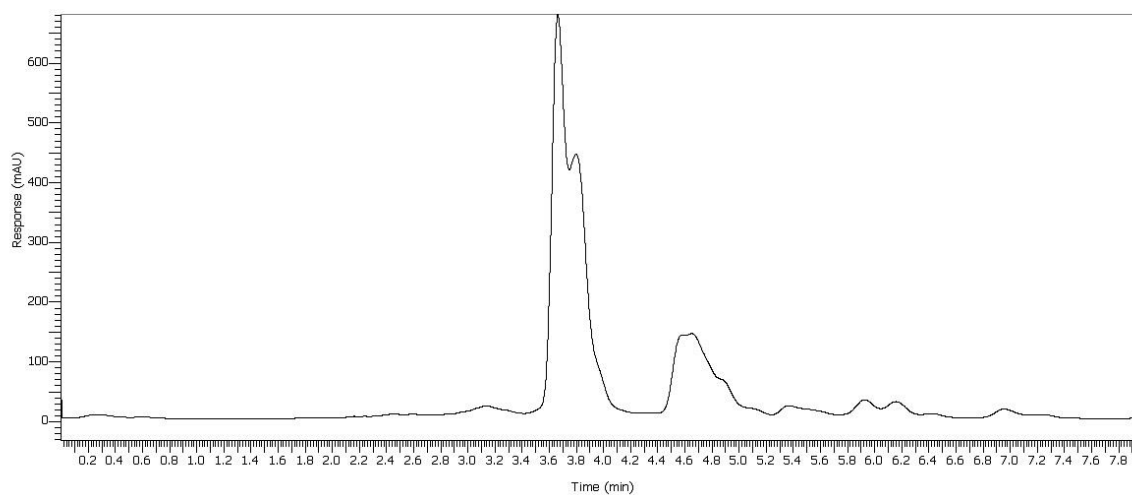
**Anexo 4:** Cromatogramas fotodegradación atorvastatina en presencia de tocoferol sin irradiar e irradiado a  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  y  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

1. Atorvastatina 0,7 M en presencia de tocoferol expuesto a  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

a) Tiempo 0 minutos

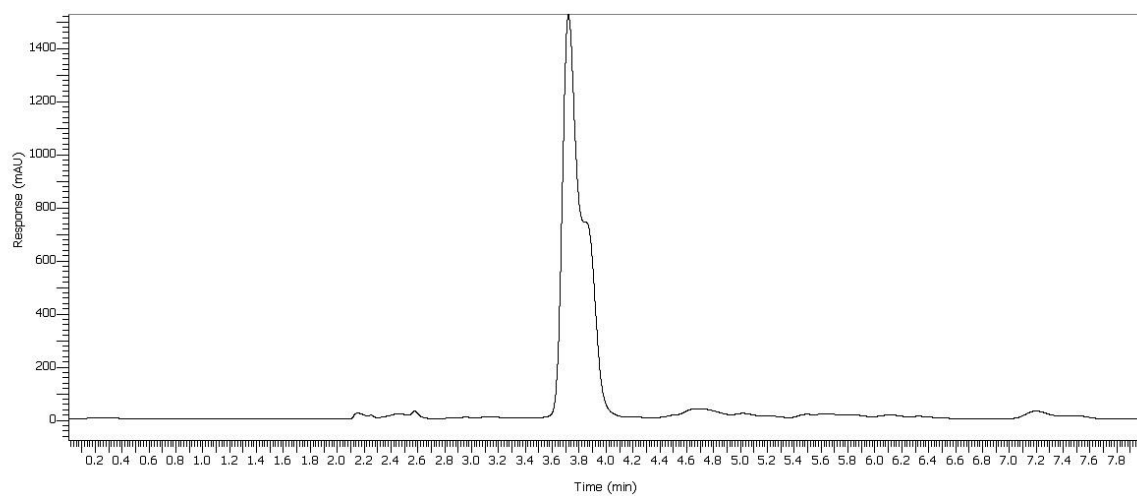


b) Tiempo 120 minutos

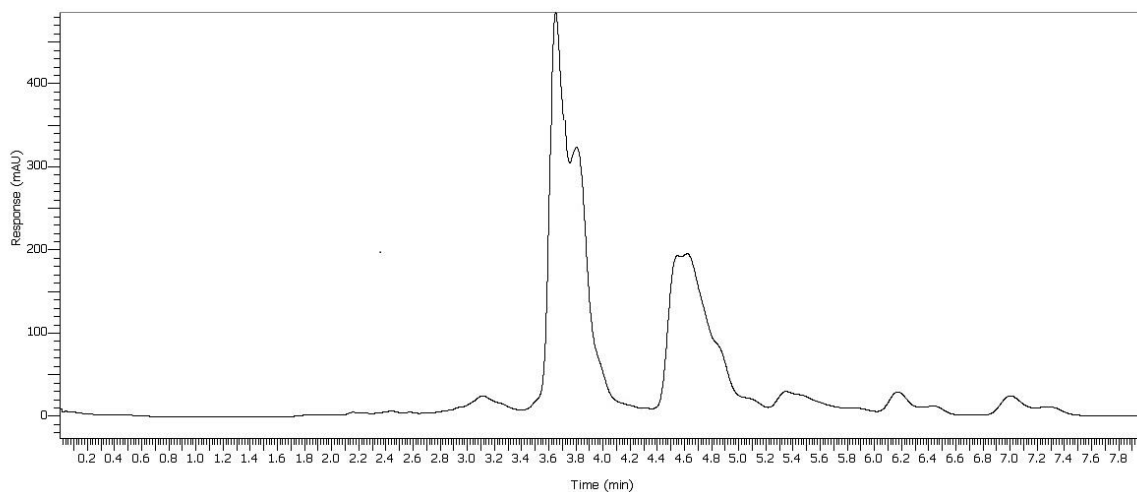


2. Atorvastatina 0,7 M en presencia de tocoferol expuesto a  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

a) Tiempo 0 minutos



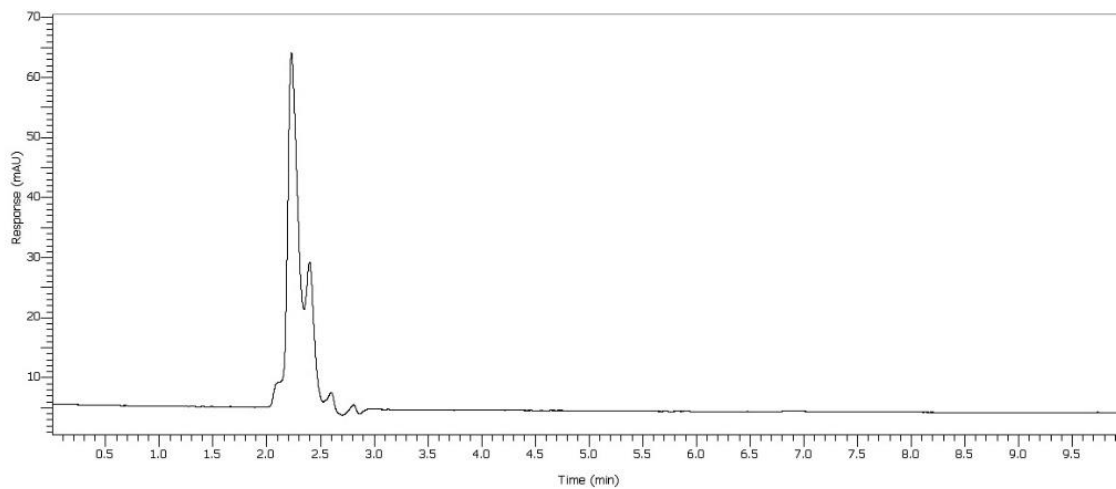
b) Tiempo 120 minutos



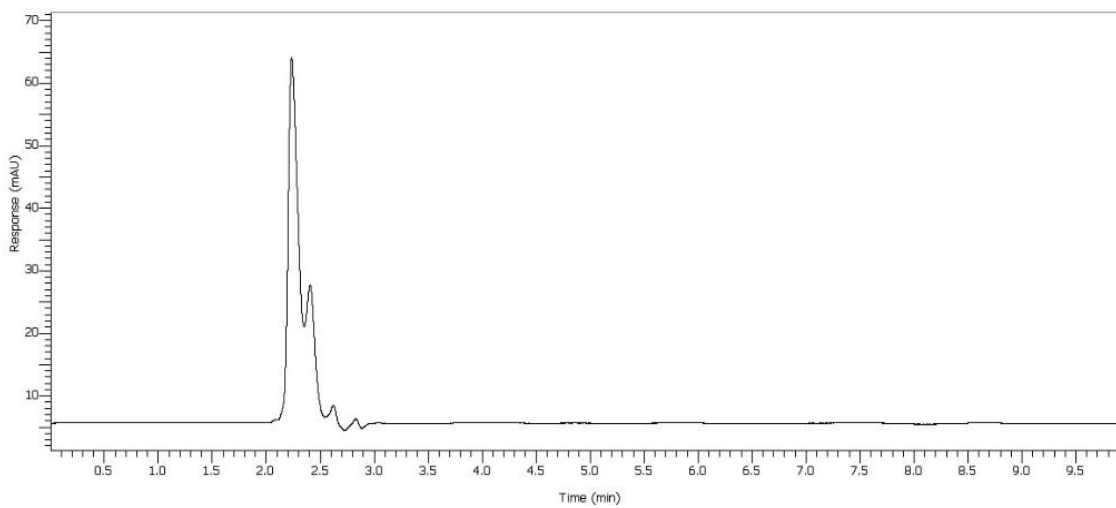
**Anexo 5:** Cromatogramas fotodegradación de ácido ascórbico irradiado a  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  y  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

1. Ácido ascórbico expuesto a  $216 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

a) Tiempo 0 minutos

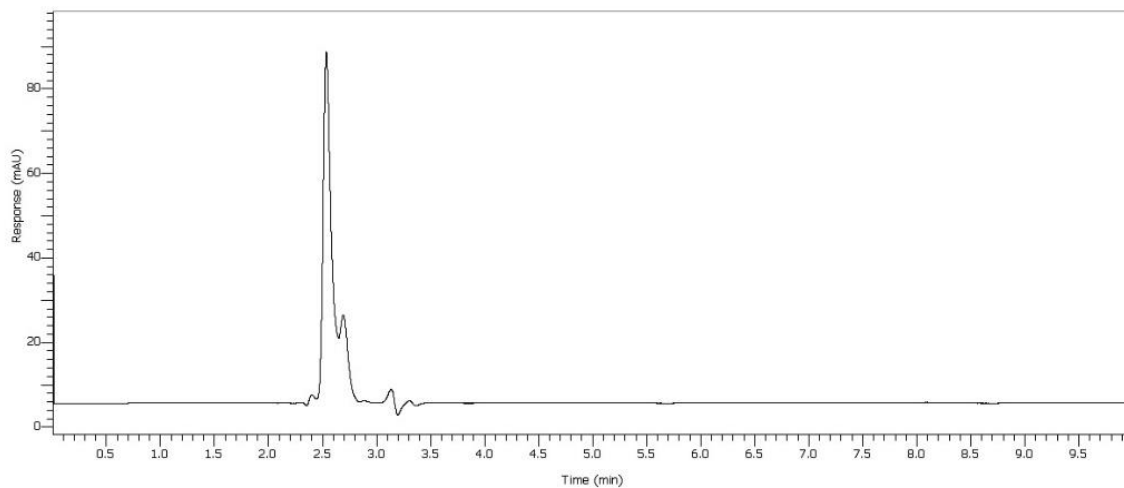


b) Tiempo 120 minutos



2. Ácido ascórbico expuesto a  $426 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

a) Tiempo 0 minutos



b) Tiempo 120 minutos

