



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**“Diseño, síntesis y caracterización de una  
nueva fase sólida de un IFA con efecto  
anticoagulante”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN FARMACIA**

**PRESENTA:**

**L. F. FLOR MAGALI RODRIGUEZ SOTO**

**CO-DIRECTORES DE TESIS**

**DRA. DEA HERRERA  
RUIZ**

**PITC, FF-UAEM**

**DR. HUGO MORALES  
ROJAS**

**PITC, CIQ-UAEM**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**DICIEMBRE DE 2020**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 2 de Biofarmacia y Farmacia Molecular de la Facultad de Farmacia y en el Laboratorio 221 de Química Supramolecular del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la codirección de la Dra. Dea Herrera Ruiz y del Dr. Hugo Morales Rojas.

Durante su realización se contó con el apoyo del CONACyT a través de la beca número 797736 del programa de Maestría en Farmacia de la Facultad de Farmacia de la UAEM (enero 2018 - enero 2020); así como de los proyectos CONACyT INF-251998 y CB-221455.

*Dedicada a mi mami y a mi hermana*

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Dea Herrera y al Dr. Hugo por haber sido un motor de inspiración para mí. Por haberme dado la confianza de compartir grandes momentos en el laboratorio y en su hogar. Por haberme apoyado bastante a cambiar mi vida mediante el estudio. Sin duda ustedes encabezan la lista de personas que más ha tocado mi vida para bien, y espero pronto regresar esto mismo a otras personas. Son seres invaluable de la cuales he aprendido bastante con su ejemplo, les aprecio bastante y estaré siempre muy agradecida.

A mi comité tutorial, al Dr. Juan Manuel Martínez y al Dr. Jesús Rivera por haber sido parte del comité evaluador para mi proyecto de tesis, gracias por todas sus aportaciones y por su tiempo.

A mi comité evaluador, al Dr. Efrén Hernández, al Dr. Juan Manuel Martínez, al Dr. Víctor Barba, a la Dra. Adriana Valladares y al Dr. Herbert Höpfl, gracias por su tiempo para la revisión de este proyecto, por su comentarios y correcciones.

A Laboratorios Senosiain S.A. de C.V., por su aportación con diferentes materias primas y con el apoyo en la realización de los estudios de estabilidad indicativa para la realización de este proyecto.

A los Dres. Jorge G. Domínguez Chávez y Karina Mondragón Vásquez de la Universidad Veracruzana (Campus Veracruz) por la realización de los estudios de calorimetría TGA y DSC.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo a través de los proyectos de infraestructura INF- 2015-251898 y de Ciencia Básica A1-S-21143 "Síntesis de Cocrisales Orgánicos Bajo un Enfoque Integral de Interacciones Intermoleculares". Se agradece el acceso a los equipos analíticos del Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM).

A Irma Delia, por haber sido mi compañera y amiga en esta etapa. Gracias infinitas por haber compartido conmigo muchas experiencias y aventuras, por esas tardes de estudio en el laboratorio antes de nuestros exámenes. Por las posadas que me diste en tu depa, por esos viajes divertidos que hicimos. Por ser una chica con mucha chispa que alegra a todos los que te rodeamos.

A Juan, gracias por todo tu apoyo desinteresado. Has sido una guía para muchos de nosotros. Gracias por tus consejos y enseñanzas en el laboratorio, jajaja aún recuerdo cuando empezaba a ayudarte y siempre te quejabas de que me tardaba mucho pesando.

A Ángel Daniel, muchas gracias por tu paciencia y enseñanza en diversas etapas de este proyecto, en especial por haberme apoyado bastante en la interpretación de mis resultados de RMN en solución, en 2D y en estado sólido, eres un máster.

A Ale Delgado, por muy seguido mantener comunicación conmigo y por darme muchos consejos, por haberme ayudado a financiar mi vestido de graduación. Eres una super chica que aprecio y admiro demasiado.

A compañeros y amigos que me ha tocado ver pasar por el Laboratorio 2: Evita, Ale Delgado, Andrea, Juan, Pablo, Zayra, Nancy, Luz, Lupillo, Lupita Badillo, Rafa, Cely, María, Ángel, Osvaldo, Christian, Reynaldo, Irma Delia, Leonardo Rafael, Lupita de Jesús, Yeny (Yeye), Jeny Gaona, Yoce, Andy, Alain, Brenda, Alondra, Alejandro y Andresito. Gracias por las experiencias.

Al todo el personal administrativo, profesores y técnicos de la Facultad de Farmacia por brindarme siempre su apoyo y por sus enseñanzas para mi crecimiento profesional.

Al personal del CIQ por su disposición para la realización de diversos análisis para mi proyecto de tesis.

A mis tíos Juan y Luisa, gracias por acogerme como parte de su familia, y por el soporte que me dieron durante mis estudios universitarios. A mis primas Liz, Ady y Katy, por todas las vivencias, consejos y charlas, por todas aquellas reuniones familiares y las comidas en fin de semana, por permitirme ser tía y aprender de sus familias.

A mi mami y hermana, sin duda siempre han sido un apoyo moral muy grande para mí, gracias por siempre levantarme los ánimos e impulsarme a ser mejor persona.

A todas aquellas personas que han creído en mí y me han apoyado en diversas etapas de mi vida para seguir creciendo. Estas líneas no me alcanzarían para expresarles el agradecimiento que tengo con ustedes, con la vida y con Dios.

*Sin duda este logro es el fruto de un éxito compartido.*

# ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>I</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>2 ANTECEDENTES</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1 Sistema de coagulación</b> .....	<b>6</b>
<b>2.2 Anticoagulantes</b> .....	<b>10</b>
<b>2.3 Dabigatran Etxilato</b> .....	<b>12</b>
2.3.1 Propiedades Físicoquímicas de DAB, DE y DEM .....	13
2.3.2 Otras propiedades de DE .....	20
<b>2.4 Modificación del Estado Sólido mediante Ingeniería de Cristales</b> .....	<b>21</b>
2.4.1 Clasificación de Fases Sólidas Farmacéuticas .....	26
2.4.2 Importancia y Diseño de Cocrystal .....	30
2.4.3 Formadores de Cocrystal .....	31
2.4.4 Métodos de Generación de Cocrystal farmacéuticos .....	31
<b>2.5 Métodos de Caracterización de Nuevas Fases Sólidas</b> .....	<b>34</b>
2.5.1 Caracterización Física y Espectroscópica .....	34
2.5.2 Caracterización Biofarmacéutica .....	39
<b>3 JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>46</b>
<b>4 HIPÓTESIS</b> .....	<b>47</b>
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
<b>5.1 OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>47</b>
<b>5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>47</b>
<b>6 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>48</b>
<b>6.1 Reactivos y equipos</b> .....	<b>48</b>
6.1.1 Reactivos .....	48
6.1.2 Equipos .....	48
<b>6.2 Métodos</b> .....	<b>49</b>
6.2.1 Neutralización de la sal comercial mesilato de dabigatran etexilato (DEM, por sus siglas en inglés).....	49
6.2.2 Rastreo <i>in silico</i> de la búsqueda de NFS a partir de DE .....	50
6.2.3 Síntesis de la NFS DE-HA.....	51
6.2.4 Escalamiento de la NFS DE-HA (1:1).....	51
6.2.5 Caracterización física y espectroscópica de materias primas y de la NFS (DE:HA 1:1).....	52

6.2.6	Preparación de soluciones .....	53
6.2.7	Método para la cuantificación de DE por UV-Vis .....	54
6.2.8	Caracterización biofarmacéutica .....	55
<b>7</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>58</b>
<b>7.1</b>	<b>Síntesis y caracterización de Dabigatrán Etxilato (DE) a partir de la sal comercial Mesilato de Dabigatrán Etxilato (DEM) .....</b>	<b>58</b>
7.1.1	Caracterización por espectroscopía IR.....	59
7.1.2	Caracterización por espectroscopía de RMN en solución.....	61
7.1.3	Caracterización térmica.....	67
7.1.4	DRXP .....	69
<b>7.2</b>	<b>Cribado <i>in silico</i> de NFS.....</b>	<b>71</b>
<b>7.3</b>	<b>Identificación de NFS .....</b>	<b>75</b>
<b>7.4</b>	<b>Caracterización Termogravimétrica y Espectroscópica de la NFS DE-HA .....</b>	<b>82</b>
<b>7.5</b>	<b>Método para la cuantificación de DE por UV-Vis.....</b>	<b>90</b>
<b>7.6</b>	<b>Caracterización Biofarmacéutica de la NFS DE-HA .....</b>	<b>92</b>
7.6.1	Estudio de la Estabilidad de la NFS en Solución .....	92
7.6.2	Estabilidad indicativa.....	95
7.6.3	Evaluación del perfil de disolución mediante disolución de polvos .....	100
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>112</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>114</b>
<b>10</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>115</b>
<b>11</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>123</b>
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>130</b>
	<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>131</b>
	<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>134</b>

## RESUMEN

El Dabigatrán etexilato (DE) es un profármaco con efecto anticoagulante que pertenece a la clase II del sistema de clasificación biofarmacéutico (alta permeabilidad, baja solubilidad). La formulación comercial contiene a la sal mesilato de DE (DEM), ya que esta presenta una mejor solubilidad que DE en medios acuosos. DEM tiene varios polimorfos. Además, la formulación comercial con DEM es susceptible a la humedad y temperatura. Por ende, su caracterización, desarrollo farmacéutico y almacenamiento puede ser complicado.

El objetivo de este trabajo fue obtener una nueva fase sólida (NFS) de DE a través de un estudio de ingeniería de cristales, estudiar sus propiedades del estado sólido y evaluar sus propiedades biofarmacéuticas.

Se realizaron experimentos de neutralización a DEM para obtener a DE. La identidad de este último se confirmó por diferentes técnicas espectroscópicas (RMN en solución e IR). DEM y diferentes lotes de DE se caracterizaron por difracción de rayos X de polvos (DRXP), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA). Los resultados de estas metodologías mostraron que DEM y DE tienen propiedades diferentes. De igual manera, la caracterización de los diferentes lotes de DE producidos demostró que se obtuvieron sólidos con diferentes grados de hidratación.

La selección de moléculas formadoras de cocrystal se realizó mediante un análisis *in silico* con la herramienta *Full Interaction Maps* de la base de datos cristalográficos de Cambridge (CSD). Para el análisis se consideró a la fase neutra de DE reportada en la CSD (Refcode EFAXAM). Este estudio delimitó el número de coformadores con potencialidad de formar NFS a 8, de un total de 18 moléculas evaluadas.

La búsqueda de NFS con las moléculas seleccionadas se realizó mediante molienda mecanoquímica asistida con gota de disolvente (SDG), permitiendo identificar una NFS con ácido hipúrico (HA). El análisis por RMN-<sup>1</sup>H en solución a partir del producto obtenido de reacción de cristalización (RxC) confirmó que DE-HA tiene una estequiometría 1:1.

Los estudios de caracterización física, espectroscópica y biofarmacéutica de DE-HA se realizaron a partir del producto obtenido en cantidad de gramos mediante SDG.

Para determinar si DE-HA es una sal o un cocrystal, se realizaron análisis comparativos de los desplazamientos observados por IR y RMN en solución y en estado sólido. Para el análisis por IR también se contrastó al hipurato de sodio. Los resultados mostraron que las especies presentes en el sólido de DE-HA no se encuentran ionizadas; sin embargo, se tendría certeza de ello con el análisis adicional de rayos-X de monocristal.

DE-HA y las materias primas se almacenaron bajo diferentes condiciones de estrés de humedad y temperatura. Los análisis por DRXP mostraron que ambas fases cocrystalinas sufren transformación física. DE se transformó a 50 °C y 0% HR, mientras que DE-HA resultó ser inestable a 40 °C y 75% HR. Estas se analizaron por DSC y TGA, donde se obtuvieron eventos diferentes a los sólidos iniciales. El análisis por RMN (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) en solución demostró que ambos sólidos mantienen íntegra su identidad química.

En los estudios biofarmacéuticos realizados, se demostró que DE-HA presenta una ventaja de solubilidad acuosa comparado con DE a un pH 6 y 37 °C. Sin embargo, DE-HA se comporta como un sólido de rápida disolución. Los estudios de estabilidad de fase bajo condiciones de supersaturación mostraron una transformación rápida de DE-HA hacia la base libre (DE), induciéndose su precipitación desde los 5 minutos del ensayo.

Mediante la técnica de *solvent shift* se eligió al polímero HPMC como inhibidor de la precipitación, el cual mejoró y mantuvo la ventaja de solubilidad de DE y de DE-HA, teniendo un impacto significativo en el ABC ( $ABC_{DE-HA} = 18.6 ABC_{DE}$ ).

Con estos resultados se demuestra que la NFS obtenida podría ser una alternativa a la contenida en la formulación comercial, ya que presentó ventajas biofarmacéuticas mejoradas sobre la solubilidad, el perfil de disolución y el ABC de DE.

---

## ABSTRACT

Dabigatran etexylate (DE) is a prodrug with anticoagulant effect belonging to class II of the Biopharmaceutical Classification System (high permeability, low solubility). The commercial formulation contains the mesylate salt (DEM) since it displays better solubility. DEM has several polymorphs whereas the commercial formulation is prone to change due to humidity and temperature, thus its characterization, pharmaceutical development and storage can be challenging. The goal of this work was to obtain new solid phases (NSPs) of DE through a crystal engineering study, to assess solid-state properties and to evaluate biopharmaceutical performance.

Since the raw material available for this project was DEM, neutralization experiments were conducted to obtain DE. The synthesis of DE was confirmed by different spectroscopic techniques (solution NMR and IR). Differences among DEM and different batches of DE were corroborated by powder X-ray diffraction (PXRD), differential scanning calorimetry (DSC), and thermogravimetric analysis (TGA). Batches of DE showed differences in their grade of hydration.

The selection of cocrystal-forming molecules was carried out through an *in-silico* analysis with the “Full Interaction Maps” tool of the Cambridge Structural Database (CSD). The DE phase reported in the CSD (Refcode EFAXAM) was used for the analysis. This study reduced the number of potential coformers to 8.

The screening was carried out by solvent drop-assisted mechanochemical grinding (SDG). One NSP was identified with hippuric acid (HA). Solution NMR-<sup>1</sup>H analysis from the product obtained by reaction crystallization (RxC) confirmed that NSP (DE-HA) has a 1:1 ratio. Physical, spectroscopic and biopharmaceutical studies on DE-HA were conducted on solid scaled-up by SDG.

Comparative analyses by IR, solution NMR and NMR CP-MAS were performed to determine whether DE-HA is a salt or a cocrystal. Sodium hippurate was included for the analysis by IR. These results showed that the species of DE-HA there are not ionized, for that reason it will be better to confirm the nature of this solid by single-crystal X-ray diffraction analysis.

DE-HA and raw materials were stored under different humidity and temperature stress conditions. PXRD analyses showed that both solids undergo physical transformation. DE was transformed to 50 °C and 0% RH, while DE-HA be showed unstable at 40 °C and 75% RH. These solids were analyzed by DSC and TGA, where events other than the initial solids were obtained. Solution NMR analysis showed that both solids maintain their chemical identity.

In biopharmaceutical studies, DE-HA was shown to have an aqueous solubility advantage compared to DE at pH 6 and 37 °C. However, DE-HA behaves like a solid of rapid dissolution. Phase stability studies under supersaturation conditions showed rapid transformation of DE-HA to DE inducing its precipitation from the first 5 minutes of the test.

The polymer HPMC was selected by the *solvent shift* technique as a precipitation inhibitor, which improved and maintained the solubility advantage of DE and DE-HA, having a significant impact on the AUC ( $AUC_{DE-HA} = 18.6 AUC_{DE}$ ). These results demonstrate that the NSP obtained could be an alternative to that contained in the commercial formulation, as it had improved biopharmaceutical advantages over solubility, dissolution profile and the AUC of DE.

# 1 INTRODUCCIÓN

La solubilidad acuosa en conjunto con la velocidad de disolución afecta directamente a la biodisponibilidad de los ingredientes farmacéuticos activos (IFAs). Actualmente en el mercado existen un gran número de IFAs que presentan una baja solubilidad acuosa, y se ha observado que el número de moléculas en fase de desarrollo con esta característica va en incremento. En los últimos años se han realizado diversos esfuerzos de investigación para mejorar las propiedades físicas y químicas de IFAs con baja solubilidad acuosa, siendo la obtención de cocrystal farmacéuticos una estrategia viable para modificar las propiedades fisicoquímicas intrínsecas de un IFA sin comprometer su acción terapéutica. Para ello se emplean agentes formadores de cocrystal, los cuales son sólidos inertes y seguros para el consumo humano. En el presente trabajo se abordó el diseño, obtención, caracterización y evaluación biofarmacéutica de una NFS generada a partir del profármaco dabigatrán etexilato (DE) en combinación con el ácido hipúrico como coformador.

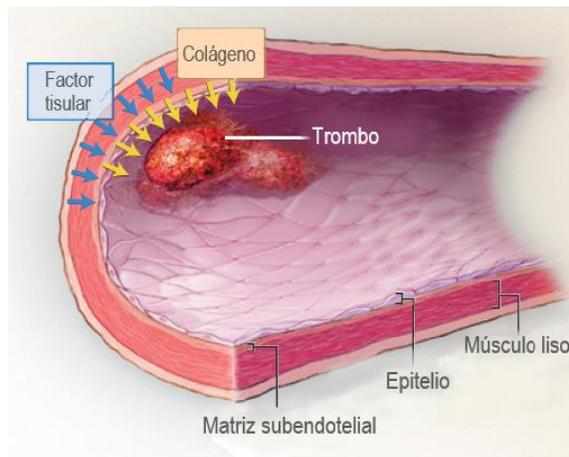
Dabigatrán etexilato es un IFA clase II del sistema de clasificación biofarmacéutico (SCB), el cual forma parte de los nuevos agentes anticoagulantes orales. En la clínica presenta diversas ventajas comparado con otros anticoagulantes, como un perfil del grado de anticoagulación predecible, que no necesita monitoreo periódico del grado de coagulación. Si bien DE tiene ventajas terapéuticas, este presenta ciertos aspectos farmacéuticos desventajosos; siendo uno de los mayores problemas su capacidad de generar polimorfos, ello genera diversas complicaciones durante la etapa de desarrollo. Este IFA se encuentra comercialmente en forma de sal con el anión mesilato. Se ha demostrado que la forma farmacéutica comercial es altamente inestable bajo condiciones variables de temperatura y humedad, lo cual complica su manejo, ya que debido a esto se tiene evidencia que la fase sólida cristalina sufre varios tipos de hidrólisis, resultando en un remanente del IFA de hasta 70% (Robertson & Glass, 2018), lo cual impacta directamente en su biodisponibilidad.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Sistema de coagulación

La coagulación es un proceso dinámico que sirve para mantener la hemostasia en el organismo. Esta última abarca los procesos estrictamente regulados de coagulación sanguínea, activación plaquetaria y reparación vascular (Versteeg, 2013). En condiciones fisiológicas, existe un balance entre la formación de un coagulo sanguíneo como respuesta inmediata a un daño tisular, y la disolución de éste cuando la zona afectada ha sido reparada (Furie & Furie, 2008). Para ello se requiere de un trabajo coordinado entre las plaquetas y diversas proteínas y factores sanguíneos (G. Walsh, 2007). En el humano existen tres mecanismos principales en el proceso hemostático (Martínez-Murillo, 2006):

**Hemostasia primaria:** Se activa cuando hay un daño tisular, ya sea por la ruptura de un vaso sanguíneo o del endotelio. El colágeno y el factor tisular (FT), asociados con la pared del vaso, proporcionan una barrera hemostática mediante la formación de trombos para mantener el sistema circulatorio con alta presión. En condiciones normales el colágeno no se encuentra expuesto al flujo sanguíneo; sin embargo, la exposición de éste desencadena la acumulación y activación de plaquetas, mientras que el FT expuesto inicia la generación de trombina. En este proceso no se convierte el fibrinógeno en fibrina, más bien el FT activa las plaquetas (**Figura 1**) (Furie & Furie, 2008).

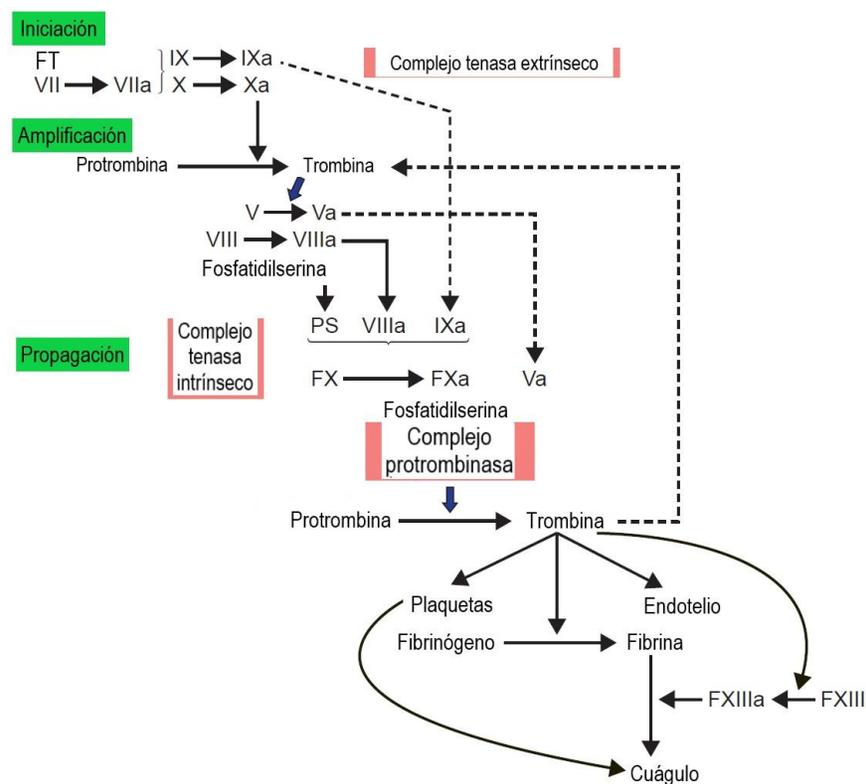


*Figura 1* Hemostasia primaria como respuesta de un daño vascular (Furie & Furie, 2008).

**Hemostasia secundaria o coagulación:** en este proceso se activa la cascada de coagulación donde ocurren una serie de cambios bioquímicos y enzimáticos que culmina

con la conversión de fibrinógeno en fibrina. La fibrina forma agregados moleculares que generan coágulos insolubles en el sitio dañado (Furie & Furie, 2008). Durante años se han descrito dos vías de iniciación de la cascada de coagulación (vía intrínseca y vía extrínseca); sin embargo, han surgido nuevos conceptos sobre el proceso de coagulación *in vivo* y con ello el modelo de coagulación celular. El proceso de coagulación *in vivo* comprende las siguientes fases (**Figura 2**) (Palta, Saroa, & Palta, 2014):

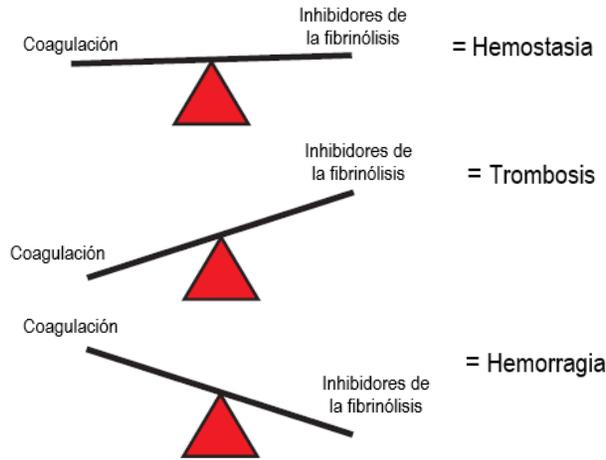
- **Iniciación:** Se inicia con la expresión de FT en un vaso dañado que une el factor VIIa para activar al factor IX y X. La activación del factor IX por el complejo TF-VIIa sirve como puente entre las vías extrínsecas e intrínsecas clásicas. El factor Xa se une al factor II (protrombina) para formar trombina (factor IIa). La generación de trombina a través de esta reacción no es robusta y puede ser terminada por el inhibidor de la vía del FT.
- **Amplificación:** En la fase anterior la cantidad de trombina no es suficiente, de ahí que existen otros circuitos de retroalimentación positiva que unen a la trombina con las plaquetas. Por lo tanto, la trombina que se genera en la primera fase continúa activando al factor V y al factor VIII. Este último sirve como cofactor en el complejo protrombinasa, ello acelera la activación del factor II para la formación de trombina.
- **Propagación:** Los complejos enzimáticos (complejo tenasa y protrombinasa) acumulados en la superficie de las plaquetas soportan cantidades robustas de generación de trombina y activación de plaquetas. Esto asegura la generación continua de trombina y fibrina para formar un coágulo lo suficientemente grande.
- **Estabilización:** La generación de trombina conduce a la activación del factor XIII (factor estabilizador de la fibrina), el cual es responsable de unir los polímeros de fibrina de manera covalente. Además, proporciona resistencia y estabilidad a la fibrina incorporada en el tapón de plaquetas. De igual manera, la trombina activa al inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI, por sus siglas en inglés) que protege el coágulo de la fibrinólisis.



**Figura 2** Proceso de coagulación in vivo (Blann Andrew, 2014). Ver **Anexo 1** para más información sobre las proteínas y factores del sistema de coagulación.

**Fibrinólisis:** en esta última fase se da la eliminación de los depósitos de fibrina una vez que las paredes vasculares han sido reparadas. Para ello el plasminógeno unido a fibrina es activado por el activador tisular del plasminógeno (tPA). La plasmina generada de esta forma es capaz de degradar proteolíticamente a la fibrina, disolviendo de esta manera la malla del coágulo.

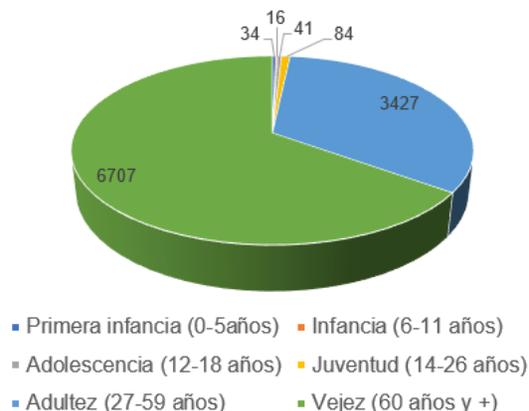
De manera fisiológica el sistema de coagulación tiene diversos mecanismos de regulación como el inhibidor del FT, el sistema de la proteína C (APC) y su cofactor la proteína S (PS), la antitrombina y glicosaminoglicanos (Roberts, Monroe, & Escobar, 2004). En procesos patológicos donde no hay una adecuada regulación de la hemostasia, se forman cantidades excesivas de trombina dando lugar a una trombosis (**Figura 3**) (Furie & Furie, 2008); la cual puede causar afecciones fisiológicas graves, asociadas con ataques cardíacos, trombosis coronaria, enfermedades cerebrovasculares (ECV) y embolismo, fibrilación auricular (FA), trombosis venosa profunda (TVP) y embolia pulmonar (EP) (Remko, Broer, & Remková, 2014a) (Li, Dong, Ren, & Li, 2015).



**Figura 3** Proceso dinámico de la hemostasia (Blann Andrew, 2014).

Se estima que cada año en Estados Unidos al menos 1.5 millones de personas sufren infarto agudo al miocardio, y 0.5 millones de personas sufren ataques cardiacos (G. Walsh, 2007). En México este tipo de enfermedades no transmisibles representan una de las mayores causas de morbilidad en el país (Secretaria de Salud México, 2017), siendo la principal la enfermedad cerebrovascular (ECV). Dicha enfermedad consiste en una serie de complicaciones causadas por una obstrucción arterial por un coágulo (isquemia), o bien por la ruptura de un vaso que lleva al acúmulo de sangre al del cerebro (hemorragia). La ECV es un problema importante de salud pública y se encuentra dentro de las cinco situaciones emergentes a nivel mundial, seguida por enfermedades asociadas al cáncer, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, diabetes mellitus tipo 2 y trastornos neurológicos; siendo los países de ingresos medios y bajos, los más afectados (IMSS, 2015) (Narro Robles, 2018).

Las ECV pueden causar daño permanente como alteraciones motoras, de lenguaje o de la memoria. Tan solo en México en el 2017 se reportó una mayor morbilidad en adultos mayores de 60 años, con 6707 casos. La incidencia de presentar una ECV aumenta con el incremento en la edad (**Figura 4**) (Secretaria de Salud México, 2017).



**Figura 4** Número de casos de ECV reportados en México en el 2017 (Secretaría de Salud México, 2017)

## 2.2 Anticoagulantes

La medicación con agentes anticoagulantes es clave para reducir esta habilidad del organismo de formar coágulos (Alegría et al., 2010). Durante décadas, los antagonistas de la vitamina K, como la warfarina, el acenocumarol y el fenprocumon fueron el pilar de los fármacos anticoagulantes administrados oralmente (Dimatteo et al., 2016). Sin embargo, este grupo de anticoagulantes tienen varios inconvenientes, los cuales incluyen (Breik, Tadros, & Devitt, 2013; Verma, 2010):

- Una acción terapéutica retardada
- Regímenes de dosificación individualizada
- Variabilidad del grado de anticoagulación intra e inter individual
- Interacciones con alimentos y fármacos ricos en vitamina K

Aunado a lo anterior, uno de los mayores inconvenientes sobre el uso de este tipo de anticoagulantes, es su estrecha ventana terapéutica. Por ello se requiere la necesidad de monitoreo y ajuste periódico del nivel de anticoagulación (expresado como tiempo de protrombina, índice normalizado internacional, INR, valores normales entre 2 y 3); de ahí que se tiene una alta incidencia de presentar eventos trombóticos (INR <2) o bien eventos hemorrágicos (INR >3) (Escobar, Barrios, & Jimenez, 2010).

Por otro lado, los anticoagulantes parenterales, como la heparina y las heparinas de bajo peso molecular (HBPM), son los estándares actuales en la anticoagulación en la terapia a corto plazo. Las HBPM reducen muchos de los efectos no deseados de las heparinas,

incluidas las respuestas variables debidas a la unión a proteínas plasmáticas, la baja actividad contra los trombos unidos a fibrina y la trombocitopenia inducida por heparina (Eriksson, Quinlan, & Weitz, 2009); sin embargo, también se requieren el monitoreo frecuente del tiempo de protrombina, el cual hace referencia a la medición de la respuesta terapéutica de la actividad anticoagulante.

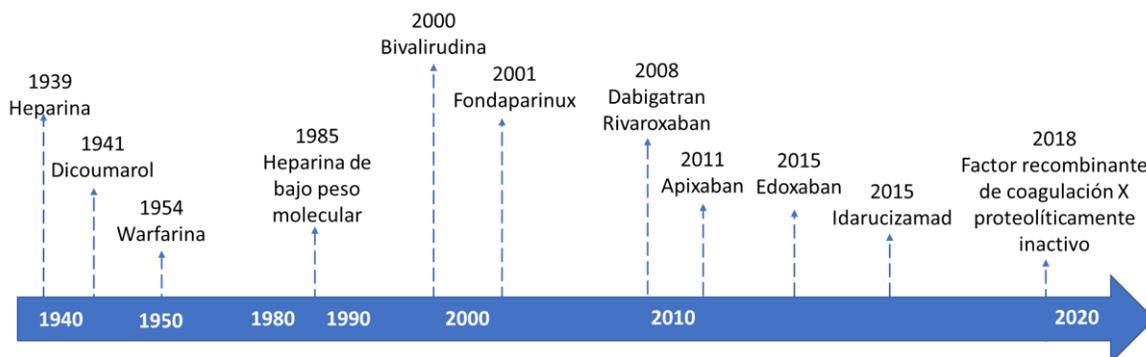
En este contexto, debido a todas las implicaciones que conlleva el uso de los anticoagulantes antes mencionados, en los últimos años se han desarrollado nuevos agentes anticoagulantes orales (**Figura 5**) (NOACs, por sus siglas en inglés), los cuales operan en la inhibición dirigida de proteínas específicas o proteasas de la cascada de la coagulación, además se ha encontrado que tienen un efecto antiplaquetario al reducir la activación de plaquetas mediada por trombina (Breik et al., 2013).

Este desarrollo se ha enfocado sobre la inhibición directa de la trombina (Argatroban y Dabigatran etexilato como profármaco) y del factor Xa (Rivaroxaban, Apixaban, Edoxaban y Betrixaban) (Steinmetzer, Pilgram, Wenzel, & Wiedemeyer, 2019); de los cuales se ha buscado que tengan una farmacocinética y farmacodinamia predecible, que cuenten con un mayor rango terapéutico y una dosis fija que no requiera monitorización (Milan Remko, Ria Broer, 2014).

Los efectos de sangrado secundarios provocados por el uso de NOACs se pueden revertir empleando antídotos específicos, tales como el fragmento de anticuerpo humanizado Idarucizamad (Praxbind®, Boehringer-Ingelheim, aprobado por la FDA en 2015) para pacientes tratados con Dabigatrán (Reilly, van Ryn, Grottke, Glund, & Stangier, 2016); así mismo, recientemente se aprobó el factor recombinante de coagulación X proteolíticamente inactivo (Andexxa®, Portola Pharmaceuticals, Inc., aprobado por la FDA en 2018) para pacientes tratados con Rivaroxabán y Apixaban (F. and D. Administration, 2018).

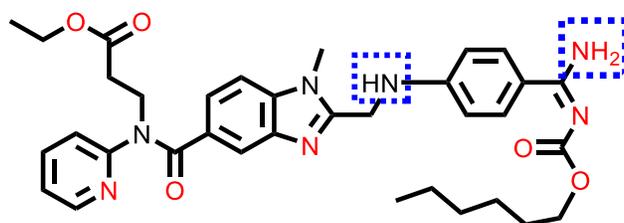
En cuanto a los inhibidores directos de la trombina, el primero en desarrollo fue Ximelagatran (Exanta, AstraZeneca, Ltd, Bedfordshire, UK), que mostró eficacia antitrombótica y seguridad en comparación con Warfarina, tanto preclínica como clínicamente. Sin embargo, la toxicidad hepática asociada con la administración a largo plazo (se observó por primera vez aproximadamente un mes después de iniciarse la terapia) resultó en una aprobación fallida en los Estados Unidos y el retiro del mercado en Europa (Eisert et al., 2010).

El siguiente inhibidor directo de la trombina es Dabigatrán (DAB), que se administra de forma oral como un profármaco (Dabigatrán etexilato, DE) en dosis fijas sin monitorización de la coagulación, lo cual es una gran ventaja para pacientes y médicos (Dimatteo et al., 2016). Además, tiene un perfil de seguridad aceptable cuando se usa apropiadamente, resultando en una disminución de forma notable tanto la morbilidad como la mortalidad de las patologías antes mencionadas. La investigación del presente proyecto se centrará sobre este IFA.



**Figura 5** Desarrollo de anticoagulantes y antidotos (Weitz & Harenberg, 2017).

### 2.3 Dabigatran Etexilato



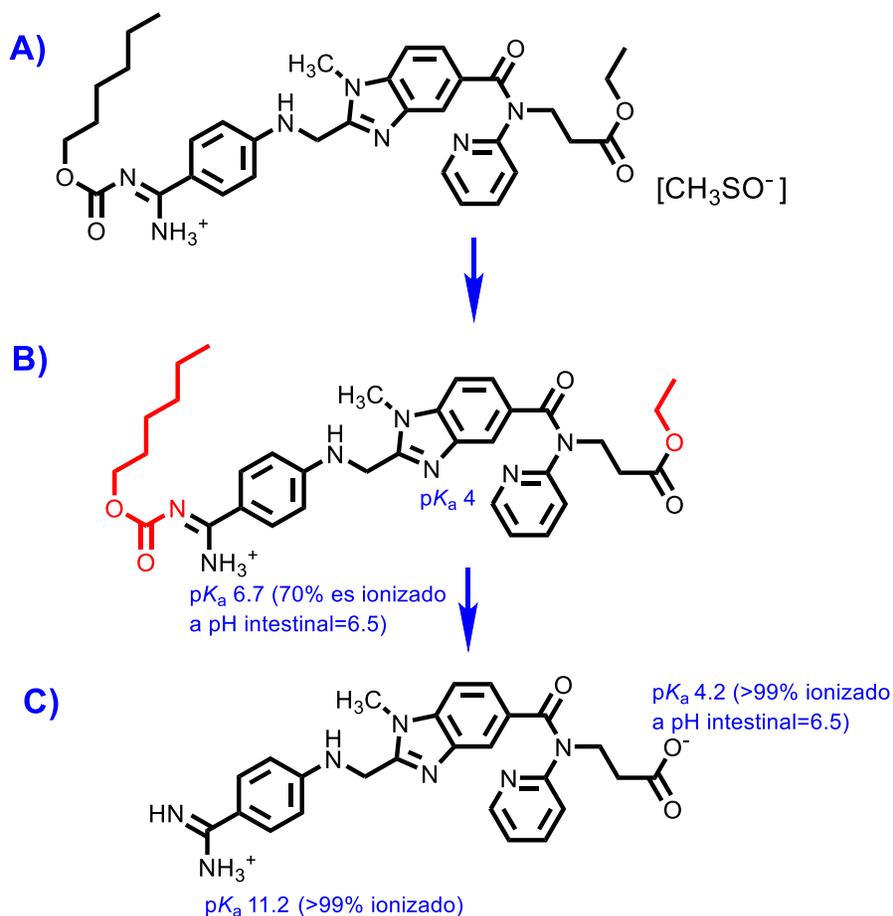
**Figura 6** Estructura molecular de Dabigatrán Etexilato (DE). En rojo se muestran los átomos potenciales que pueden actuar como aceptores de puentes de hidrógeno, en los recuadros azules se muestran los grupos funcionales con capacidad de donar un puente de hidrógeno.

Dabigatrán etexilato (DE, **Figura 6**) es un profármaco doble de bajo peso molecular de Dabigatrán (Breik et al., 2013). Dabigatrán (DAB) es un inhibidor directo, específico, competitivo y reversible de la trombina ( $K_i = 4.5 \text{ nM}$ ) (P. M. Fischer, 2018); la cual es una serina proteasa plasmática que juega un papel central en la cascada de coagulación; dicha

proteasa se produce por la escisión proteolítica de protrombina y cataliza la conversión de fibrinógeno en fibrina, lo que conduce a la formación de trombos (J Stangier, 2008). Esta proteasa también regula la retroalimentación positiva, activando los factores de coagulación sanguínea V, VIII, XI y XIII; así como la retroalimentación negativa, activando (en el complejo con trombomodulina) la PC, que limita la trombinogénesis mediante la escisión de los factores Va y VIIIa (Strukova, 2006). Se ha demostrado que DAB inhibe la trombina libre, la trombina unida a fibrina y la agregación plaquetaria inducida por trombina (Hyun et al., 2017), y se une covalentemente al sitio activo de la trombina (Polo García, Barón Esquivias, & Vicente García, 2011).

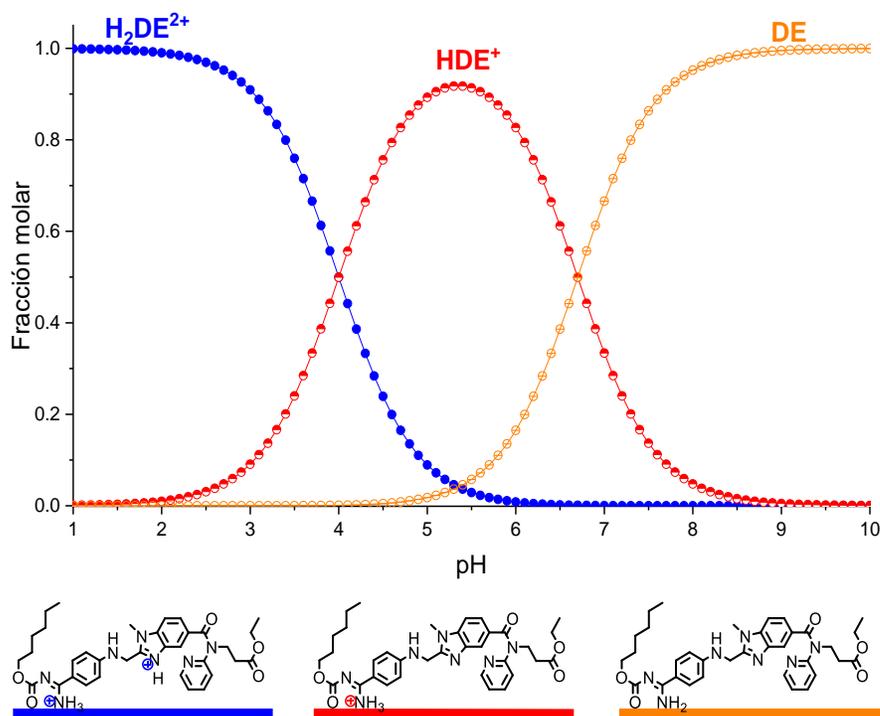
### **2.3.1 Propiedades Fisicoquímicas de DAB, DE y DEM**

DAB no está disponible por vía oral porque es una molécula zwitteriónica muy polar, con un log D de -2.4 (n-octanol/buffer, pH 7.4) y por lo tanto tiene una biodisponibilidad oral muy limitada (Ebner, Wagner, & Wiene, 2010). Así, un profármaco doble de DAB fue diseñado para enmascarar sus grupos funcionales ionizables, con un carbamato sobre el grupo amidina y un éster sobre el ácido carboxílico (para formar DE), los cuales se hidrolizan *in vivo* (**Figura 7**). Es así que DE sufre un metabolismo intermedio (dabigatrán etil ester) mediante la esterasa carboxilesterasa 2 (CES2) en el intestino, para dar lugar a su metabolito activo DAB mediante la esterasa carboxilesterasa 1 (CES1) en el hígado (Shi et al., 2016). Estas modificaciones químicas permiten generar una versión de DAB con mejor solubilidad y su permeabilidad (Clas, Sanchez, & Nofsinger, 2014; Garnock-Jones, 2011).



**Figura 7** Estructura química de a) la sal comercial (DEM), b) el profármaco dabigatrán etexilato (DE) y de c) la forma farmacológicamente activa, dabigatrán (DAB) (Solanki et al., 2018a)

DE pertenece al sistema de clasificación biofarmacéutico (BSC) II (baja solubilidad, alta permeabilidad). Debido a que DE es una base débil, su solubilidad es pH-dependiente, por lo que se obtiene mayor biodisponibilidad en pH ácido. Tal como se muestra en el diagrama de distribución de especies de DE en la **Figura 8**, a pH ácido ( $\text{pH} < 3$ ), la molécula se encuentra doblemente protonada ( $\text{H}_2\text{DE}^{2+}$ ), lo que le confiere alta solubilidad en medios ácidos. Conforme se aumenta el pH del medio, DE posee una carga positiva ( $\text{HDE}^+$ ) y finalmente a pH neutro se encuentra a DE en su forma neutra.



**Figura 8** Diagramas de distribución de especies de DE en función del pH (EMA, 2008)

A continuación, en la **Tabla 1** se muestran las propiedades fisicoquímicas de DE y su sal comercial.

**Tabla 1** Principales características fisicoquímicas de DE y la sal comercial DEM

	<b>Dabigatrán etexilato</b> (DE, profármaco)	<b>Mesilato de dabigatrán etexilato</b> (DEM, sal comercial)
Nombre químico	[etil 3-[[2-[[4-(N'-hexiloxycarbonilcarbomimidol) fenil] amino]metil]-1-metil-1H-benzimidazol-5-il)carbonil] (piridina-2-il-amino) propanoato]	etil 3-[[2-[[4-(Z)-N'-hexiloxycarbonilcarbomimidol] anilino]metil]-1-metilbenzimidazol-5-carbonil]-piridina-2-il-amino]propanoato; ácido metansulfónico
Apariencia	Sólido cristalino blanco	Sólido cristalino amarillento
Fórmula condensada	C <sub>34</sub> H <sub>41</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>35</sub> H <sub>45</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> S
Peso molecular (g/mol)	627.734	723.86
Punto de fusión (°C)	86 <sup>a</sup>	180 <sup>b</sup>
Solubilidad acuosa	4.66 µg/mL <sup>c</sup> a 25°C	1.8 mg/mL a 25°C 14.7 mg/mL a 37°C <sup>d</sup>
LogP	2.6 (n-octanol/buffer, pH 7.4) <sup>e</sup>	3.8
Naturaleza	Neutro	Sal
pK <sub>a</sub>	pK <sub>a1</sub> = 4, pK <sub>a2</sub> = 6.7	pK <sub>a1</sub> = 4, pK <sub>a2</sub> = 6.7

<sup>a</sup> (Cai, Hou, Kong, Hou, & Hu, 2016), <sup>b</sup> (PUBCHEM, n.d.), <sup>c</sup> (Remko, Broer, & Remková, 2014b), <sup>d</sup> (WO 2012/044595, 2011), <sup>e</sup> (Hauel et al., 2002)

Se han implementado estrategias para mejorar la solubilidad y la velocidad de disolución de DE. Se han generado sales con ácidos orgánicos e inorgánicos (empleando en su mayoría el ácido fosfórico, sulfúrico, maleico, metansulfónico, oxálico, clorhídrico y p-toluensulfónico) (KIRÁLY et al., 2011). También se han reportado nuevas formas polimórficas, anhidros, hidratos, solvatos y polimorfos. Sin embargo, el gran inconveniente que presentan estas NFS es su alto grado de polimorfismo. Se han reportado dos formas polimórficas de la sal formada con ácido fosfórico (I y II), dos polimorfos (III y IV) de la sal formada con ácido fumárico, tres polimorfos (I, II y V) de la sal formada con ácido oxálico, tres polimorfos (II, V y VI) de la sal formada con cloruro de hidrógeno y cuatro polimorfos (I, V, VI y VII) de la sal formada con ácido p-toluensulfónico (WO 2008/043759 A1, 2008). Se ha descrito también la formación de una sal bimesilato que se encuentra como una mezcla de fracciones polimórficas y cristalinas de la sal (WO 2012/044595, 2011). Tal como se ha mencionado antes, la formulación comercial se encuentra en forma de sal con el anión mesilato (a partir del ácido metanosulfónico). Se ha observado que esta sal, en presencia de distintos disolventes, sufre transformación de fase hacia un sesquihidrato descrito como fase III (hemihidrato de DEM,  $T_{\text{peak}} = 120 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Cabe mencionar que la formulación comercial está compuesta mayormente por la forma I ( $T_{\text{peak}} = 180 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y en pequeña cantidad de la forma II ( $T_{\text{peak}} = 190 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (MXPA06001959A, 2006).

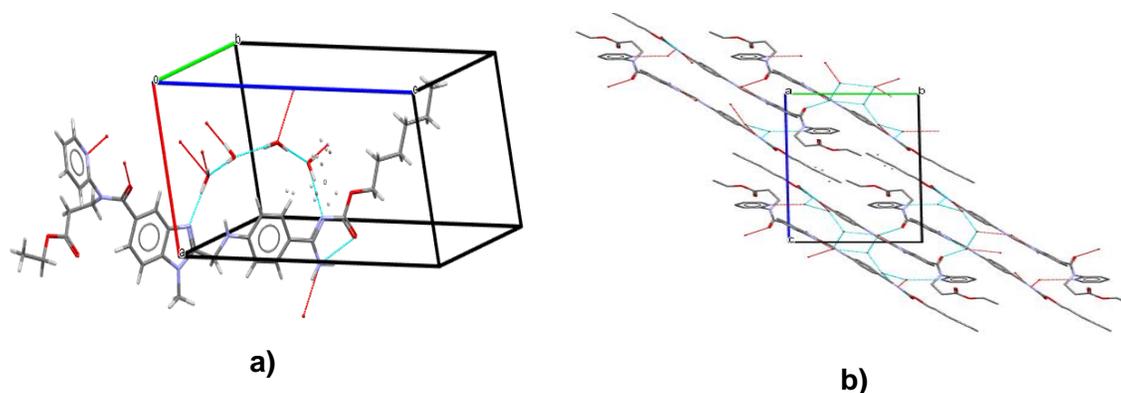
En el 2016, Zhi-Quan Hu y colaboradores reportaron la estructura cristalina de DE correspondiente a la fase neutra tetrahidratada (Cai, et al., 2016) (Refcode: EFAXAM en la CSD). Los datos cristalográficos de esta estructura se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2** Datos cristalográficos de dabigatran etexilato tetrahidrato (Cai et al., 2016).

Clave	EFAXAM
Fórmula empírica	$\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{N}_7\text{O}_9$
Sistema cristalino, grupo espacial	Triclínica, P-1
Parametros de la celda (Å)	a = 9.1140(13) b = 10.9700(14) c = 18.3830(17)
Ángulos ( $^\circ$ )	$\alpha = 88.510(10)$ $\beta = 85.455(9)$ $\gamma = 83.034(12)$
Volumen de la celda (Å <sup>3</sup> )	1818.4 (4)
Z	2

La unidad asimétrica (**Figura 9a**) está compuesta por una molécula de DE y cuatro moléculas de agua, formando una especie de anillo de seis miembros entre los protones de las moléculas de agua con el N del carbamato y el N del benzimidazol de DE; además se

observa la formación de un enlace intramolecular por puente de hidrógeno formado entre una amina primaria y el carbonilo del carbamato. El crecimiento cristalino está dado mediante interacciones de tipo O–H•••O, O–H•••N y N–H•••O; en el eje a se observa un crecimiento en capas paralelas, sirviendo las moléculas de agua como un puente entre las moléculas de DE (**Figura 9b**). Es así que la formación de una fase cocrystalina podría ser viable al emplear coformadores donadores de puentes de hidrógeno que sustituyan a las moléculas de agua. Hasta el momento no se han descrito la formación de cocrystalos farmacéuticos de DE, dicha alternativa podría minimizar el efecto de polimorfismo observado en los reportes antes mencionadas.



**Figura 9** a) Unidad asimétrica de EFAXAM y b) crecimiento cristalino de EFAXAM en el eje a

### Farmacocinética y Mecanismo de Acción

La biodisponibilidad oral de DAB es de 7.2%, el pico plasmático se consigue en 1-1.5 horas; tiene un tiempo de vida media de 8 horas cuando se administra en dosis única, y de 14-17 horas después de varias dosis. El estado estacionario se alcanza después de aproximadamente 3 días de tratamiento dos veces al día (Staab, Clemens, & Lehr, 2013). DAB se elimina principalmente (80-85% de la dosis) mediante filtración glomerular (Lehr, Dansirikul, Reilly, & Connolly, 2011), por lo que el 80% se excreta sin cambios y parcialmente (20%) es conjugado por glucuronosil transferasas a conjugados farmacológicamente activos. La glucoronidación no tiene ningún efecto en la eficacia clínica de DAB (Blech, Ebner, Ludwig-schwelling, Stangier, & Roth, 20AD; J Stangier, 2008). DE esta contraindicado en pacientes con insuficiencia renal grave (aclaramiento de creatinina  $[Cl_{Cr}] < 30$  ml/min) (Food and Drug Administration, 2013).

DE no interacciona con tabaco, alcohol y el peso del paciente no influye en el perfil farmacocinético de este (Eriksson et al., 2009). Se ha observado que administrado tanto en

estado de ayuno como con alimentos el ABC y la  $C_{max}$  permanecen prácticamente igual. La administración conjunta de alimentos retrasa la absorción de DAB, resultando en un aumento en el  $t_{max}$  en aproximadamente 2 horas (Joachim Stangier et al., 2005). El volumen de distribución de DAB administrado mediante infusión intravenosa es de 50-70 L, indicando que DAB presenta moderada distribución en tejidos (Eriksson et al., 2009).

DE no se metaboliza en el hígado ni es sustrato, inhibidor o inductor del CYP-450 ni de algunas otras oxidorreductasas (Kumar et al., 2017). Sin embargo, DE es sustrato de la glicoproteína P (P-gp) localizada principalmente en el intestino delgado (Gabriel, Ruiz, Nydia, López, & Medina, 2012), mientras que su metabolito activo, DAB, es sustrato del transportador MATE1 (Kumar et al., 2017). Al no ser metabolizado por CYP-450 se le atribuyen eventos adversos reducidos y una baja unión a proteínas plasmáticas (alrededor del 35%) (Eisert et al., 2010). La administración conjunta con inhibidores de la P-gp como el verapamil, la amiodarona y la quinidina ha mostrado que aumentan las concentraciones plasmáticas de DAB hasta en un 50% la  $C_{max}$  y en un 60% el ABC; sin embargo, no existen interacciones cuando se coadministra DE con atorvastatina, un sustrato/inhibidor de la P-gp, o con digoxina, la cual es un sustrato modelo de la P-gp (Härter, Sennewald, Nehmiz, & Reilly, 2013).

Como se mencionó antes, DE se comercializa como la sal de mesilato bajo la denominación comercial de Pradaxa® (Boehringer Ingelheim, Alemania). Está incluido en una solicitud de nuevo medicamento (NDA, new drug application) de la FDA. Hay cinco patentes que protegen a este medicamento en 52 países. Dicha formulación consiste en cápsulas duras en dosis de 75, 110 y 150 mg (EMA, 2014). La solubilidad de DE en condiciones ácidas (valores de pH <3) es muy importante para su absorción en el tracto gastrointestinal (TGI) (Berkovits & Mezzano, 2011). Es por ello que la cápsula comercial contiene un núcleo de ácido tartárico en pequeños pellets (~ 1 mm diámetro) que optimiza su absorción y la hace en teoría independiente de la acidez del TGI, no siendo afectado por la administración conjunta de un inhibidor de la bomba de protones (Gabriel et al., 2012; Hyun et al., 2017; Verma, 2010). La ingesta máxima por día permitida del contraión mesilato es de 420 mg (Saal & Becker, 2013). Además, la patente de este medicamento expira en 2025, por lo que es relevante continuar con otros desarrollos farmacéuticos para este IFA.

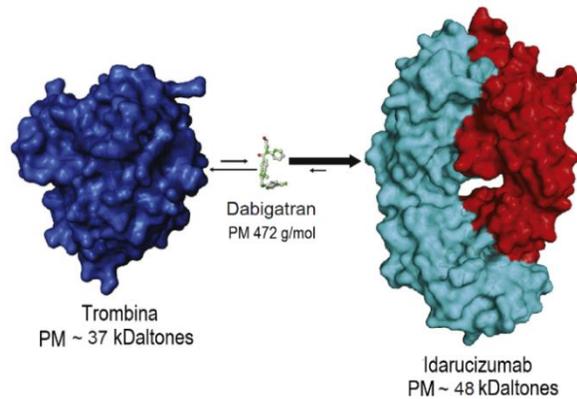
De igual manera la investigación se ha centrado en la generación de otras formulaciones con el fin de mejorar la solubilidad de DE, tales como la formación de micelas, y la

generación de sistemas sólidos autoemulsificantes (Fujian, Chai. Linlin, Yafei, Ding. Xiaoqing, Liu. Yajie, Thomas, & Zheng., 2016; Mei et al., 2017).

DE como terapia crónica (desde 6 meses hasta 3 años de tratamiento) previene efectivamente la recurrencia de tromboembolismo venoso y del accidente cerebrovascular cardioembólico, y hasta el momento no hay evidencia de toxicidad hepática (Eisert et al., 2010).

Un efecto adverso de cuidado en la administración de DE son las hemorragias. Algunos factores que se asocian con un mayor riesgo de hemorragia incluyen la edad ( $\geq 75$  años), insuficiencia renal y el uso de medicamentos concomitantes. Un análisis adicional de los datos agrupados de los ensayos RE-COVER durante el período de doble simulación ( $n = 4,918$ ) indicó que, aunque la frecuencia de cualquier episodio de sangrado gastrointestinal fue numéricamente mayor en el grupo de DE que en el grupo de warfarina, la frecuencia de hemorragias digestivas mayores fue numéricamente menor con DE (Garnock-Jones, 2011).

En situaciones de emergencia donde se requiere detener el efecto anticoagulante de DE de manera efectiva (es decir, para cirugía de emergencia, en procedimientos urgentes o si hay hemorragia potencialmente mortal o no controlada) se emplea su antídoto específico Idarucizumab (Praxbind®, Boehringer-Ingelheim). La unión de DAB-Idarucizumab esta mediada por interacciones hidrofóbicas, por puente de hidrógeno y por un enlace iónico. Por estas razones, Idarucizumab exhibe una alta afinidad por DAB (constante de disociación [ $K_D$ ]  $2.1 \pm 0.6$  pM, aproximadamente 350 veces más fuerte que la afinidad de DAB por la trombina). Esta alta afinidad corresponde a una velocidad de activación rápida (en el primer minuto tras su administración), lo que da como resultado una unión casi irreversible de Idarucizumab a DAB. A pesar de las similitudes estructurales con la trombina (**Figura 10**), Idarucizumab no se une a los sustratos de trombina, incluidos los factores V, VIII, XIII, o al fibrinógeno (Reilly et al., 2016).



**Figura 10** Estructuras y tamaños relativos de la trombina, DAB y de Idarucizumab (Reilly et al., 2016).

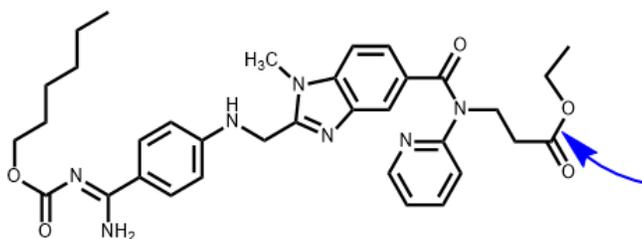
### 2.3.2 Otras propiedades de DE

En cuanto a las recomendaciones sobre el uso y almacenamiento de las cápsulas comerciales, se recomienda no aplastar, masticar ni romper las cápsulas debido a que se puede liberar todo el medicamento a la vez, lo cual puede provocar aumento en el riesgo de efectos secundarios tales como hemorragias interna; además, la acidez añadida por el ácido tartárico puede ser problemática en pacientes que desarrollan úlceras marginales después de una cirugía gástrica (Hakeam & Al-Sanea, 2017). Se recomienda además mantener bien cerrado el empaque principal para protegerlo de la humedad, ya que la estabilidad de DE se ve afectada debido a la formulación.

La humedad puede afectar la estabilidad química de los medicamentos susceptibles a sufrir hidrólisis; pero también es la estabilidad física en términos de ganancia de peso, cambios en la dureza, friabilidad, desintegración y disolución; todo ello puede comprometer la integridad física del producto terminado y su eficacia debido a un comportamiento de disolución alterado y por ende su biodisponibilidad. Se ha observado que DE sufre principalmente hidrólisis ácida (basado en la guía ICH, 200 mg de IFA se mantuvieron en agitación en 10 mL de HCl 0.5 N durante 24 h, Mutha et al., 2018), cuya velocidad puede acelerarse con el aumento de la temperatura. En la **Figura 11** se muestra el enlace éster, que es uno de los sitios favorecidos para que se lleve a cabo la hidrólisis ácida (Robertson & Glass, 2018).

En el 2018, Robertson y colaboradores publicaron un estudio de almacenamiento de las cápsulas comerciales de DE bajo condiciones de humedad y temperatura específicas: 30°C

$\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $75\% \pm 5\%$  de humedad relativa por periodos de 14 y 28 días, resultando un  $92.5\%$  y un  $71.6\%$  del IFA remanente, respectivamente (Robertson & Glass, 2018).



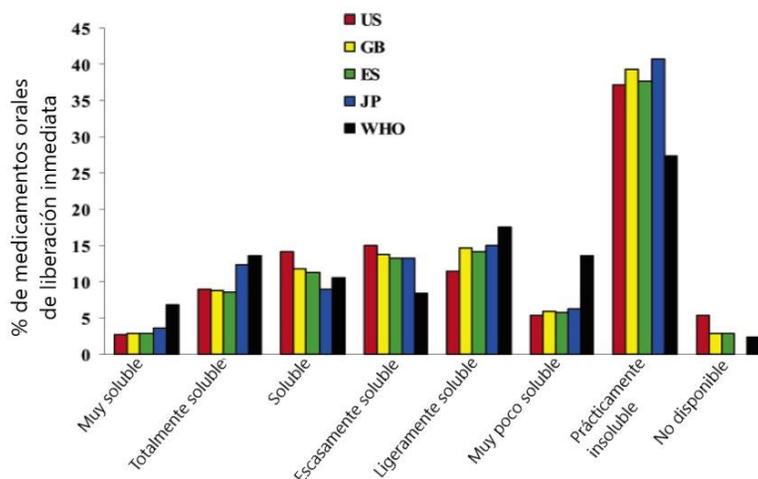
**Figura 11** Estructura química del dabigatrán etexilato, se muestra uno de los sitios de incisión por hidrólisis ácida

Por lo que nuevas formulaciones han sido investigadas, y una nueva fase sólida que module la forma de liberación del IFA y asegurando que se mantenga estable sería de gran interés.

#### 2.4 Modificación del Estado Sólido mediante Ingeniería de Cristales

Actualmente, la vía de administración oral es la mayormente empleada debido a la comodidad y facilidad para el paciente. Sin embargo, la mayoría de los ingredientes farmacéuticos activos (IFAs) que se prescriben oralmente presentan una baja solubilidad acuosa, lo cual impacta directamente en su disolución en el tracto gastrointestinal antes de ser absorbido en el organismo (Fucke et al, 2012). Se estima que el 40% de los medicamentos comercializados y al menos el 75% de los IFAs que se encuentran en desarrollo presentan una baja solubilidad acuosa, aumentando en frecuencia esta característica en los nuevos desarrollos farmacéuticos (Williams et al., 2013b).

En el 2006, Takagi y colaboradores realizaron una comparación de las solubilidades de los 200 productos principales que se comercializan en Estados Unidos, Gran Bretaña, España, Japón, así como aquellos contenidos en la lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud (OMS). En la **Figura 12** se muestra que la mayoría de estos medicamentos corresponden a aquellos que son prácticamente insolubles (Takagi et al., 2006).



**Figura 12** Comparación de la distribución de la solubilidad del top de los 200 medicamentos orales en Estados Unidos (US), Gran Bretaña (GB), España (ES), Japón (JP) y de la lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud (WHO). Fármacos muy solubles: arriba de 1000 mg/mL; totalmente solubles: 100-1000 mg/mL; fármacos solubles: 33-100 mg/mL; escasamente soluble: 10-33 mg/mL; ligeramente soluble: 1-10 mg/mL; muy poco soluble: 0.1-1 mg/mL; prácticamente insoluble: <0.1 mg/mL. (Takagi et al., 2006)

Generalmente los sólidos farmacéuticos que se administran oralmente se encuentran como sólidos cristalinos o amorfos. Siendo los primeros los que exhiben baja solubilidad acuosa, donde la velocidad de disolución del IFA es a menudo más lenta que la velocidad de absorción; lo cual se convierte en la clave determinante de la biodisponibilidad de estos (Fucke et al., 2012). En cambio los sólidos amorfos presentan una ventaja sobre dicho parámetro de solubilidad, pero en su mayoría son metaestables, pues en un corto periodo de tiempo precipitan a la forma termodinámicamente más estable (Jones & Eddleston, 2014).

Para modificar ciertas propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de algunos IFAs con baja solubilidad acuosa se han tomado en cuenta varias estrategias para mejorar ya sea la solubilidad y/o la velocidad de disolución. Se han empleado modificaciones físicas tales como la generación de amorfos, micronización (reducción del tamaño de partícula) y dispersiones sólidas amorfas o complejación con ciclodextrinas; así como modificaciones químicas como la formación de sales, síntesis de profármacos y generación de sólidos cristalinos multicomponentes (Fucke et al., 2012).

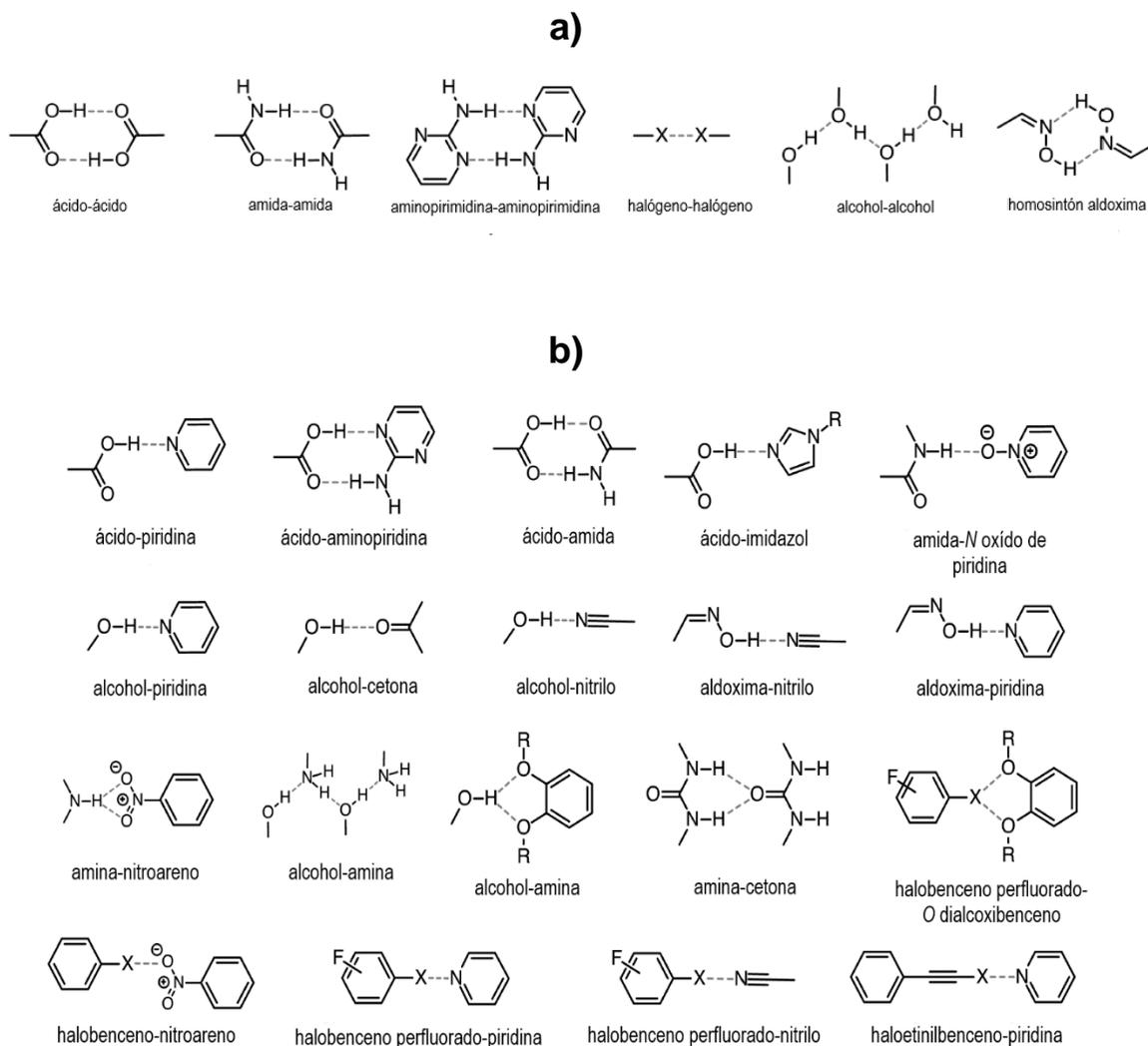
Lo nuevo que se ha introducido en el área de la química del estado sólido debido al desarrollo de la química supramolecular es el uso amplio del concepto de reconocimiento molecular para el ajuste predecible de los bloques constructores de la red cristalina, y así la creación de las estructuras cristalinas con propiedades deseadas. Es así como nace la

ingeniería de cristales, dicho concepto fue introducido por Pepinsky, en 1955 (Gadade & Pekamwar, 2016). En 1989, Desiraju G. definió a la ingeniería de cristales como *el entendimiento de las interacciones intermoleculares en el contexto del empaquetamiento cristalino y la utilización de dicho entendimiento en el diseño de nuevos sólidos con las propiedades físicas y químicas deseadas* (Desiraju, 2007). Ello permite estudiar aspectos fundamentales tales como: las interacciones intermoleculares, las formas de empaquetamiento y las propiedades del cristal.

Las interacciones que existen entre los sólidos que forman un cocrystal se dan mediante sintones supramoleculares, los cuales son fragmentos moleculares que se asocian principalmente mediante puentes de hidrógeno, interacciones iónicas o interacciones de Van der Waals (Williams et al., 2013a). Para acelerar el proceso de síntesis, se toma en cuenta el diseño, en retrosíntesis, de una unidad cristalina pequeña mediante el sintón supramolecular (Thakuria et al., 2013). Ello permite predecir, con cierto grado de exactitud, el crecimiento cristalino en una, dos y tres dimensiones; así como comprender la relación estructura-propiedad de tales compuestos, ya que se aprovechan las características de reconocimiento químico y geométrico de estos (Desiraju, 1995; Shattock, Arora, Vishweshwar, & Zaworotko, 2008).

El concepto de sintón fue introducido por Corey en 1967 de manera muy general. Sin embargo, más tarde Desiraju lo retoma como sintón supramolecular y lo definió como *una entidad estructural entre moléculas, las cuales se ensamblan por reconocimiento molecular a través de interacciones intermoleculares conocidas o concebibles* (principalmente puentes de hidrógeno) (Desiraju, 1995).

Así los grupos funcionales del IFA y del coformador pueden unirse formando homosintones supramoleculares (entre los mismos grupos funcionales) o bien, mediante heterosintones supramoleculares (grupos funcionales diferentes pero complementarios) (**Figura 13**) (R. D. B. Walsh et al., 2003) (Shattock et al., 2008).



**Figura 13** Ejemplos de a) homosintones y b) heterosintónes supramoleculares comúnmente estudiados y empleados en el diseño cristalino (donde  $R = H$ , alquil;  $X = Br, I$ ) (Corpinot & Bučar, 2019).

Existen algunas reglas empíricas (reglas de Etter) para predecir la formación de un puente de hidrógeno (Etter, 1991): **1)** el mejor donador de protones formará un enlace de hidrógeno con el mejor aceptor de puente de hidrógeno; **2)** los enlaces intramoleculares por puente de hidrógeno son favorecidas para la formación de anillos de seis miembros con respecto a la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares; y, **3)** los mejores donadores y aceptores de protones restantes, después de la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares, formarán enlaces de hidrógeno intermoleculares entre sí.

Lo referido anteriormente cobra sentido, ya que se ha observado ampliamente que los grupos ácido carboxílico y fenol son igualmente competitivos en la formación de un heterosintón supramolecular en presencia de un nitrógeno aromático (Duggirala, Perry, Almarsson, & Zaworotko, 2016). Además cabe resaltar que estos dos grupos funcionales, ácido carboxílico y fenol, se encuentran con alta incidencia en las estructuras químicas de los IFAs (Shattock et al., 2008). Así en la **Figura 13** se observa que se favorece más la formación de heterosintones supramoleculares (en presencia de grupos ácido carboxílico) con respecto a la formación de homosintones supramoleculares.

Es así entonces que ambas moléculas (IFA y coformador) se deben escoger debido a la habilidad que tengan de donar o aceptar enlaces de hidrógeno y que, por lo tanto, pueden formar un sintón supramolecular estable.

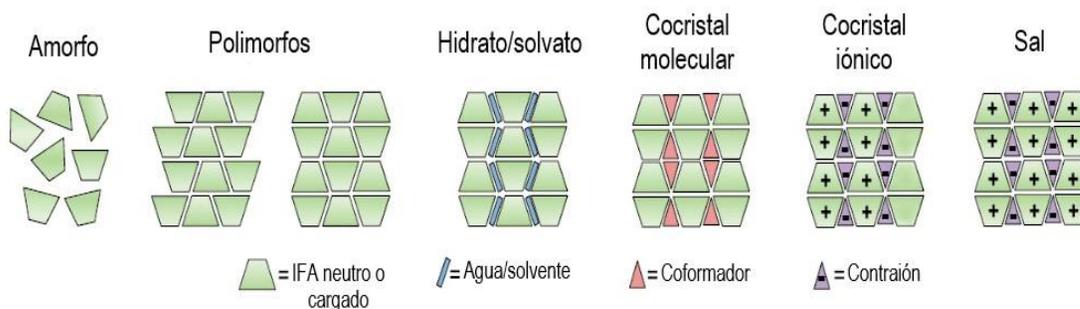
El diseño de un cocrystal, en los últimos años también se ha basado en una predicción mediante métodos estadísticos y computacionales sobre la interpretación de los posibles enlaces no covalentes que se puedan formar (Desiraju, 1995). La base de datos cristalográficos de Cambridge (CSD) (Allen & Taylor, 2004) desde hace varios años ha desarrollado un conjunto de herramientas que permiten predecir la estructura molecular, conocer el grupo espacial y los parámetros posicionales de los átomos en la estructura cristalina. Es así como se estiman las posibles interacciones entre IFA y coformador para la formación de puentes de hidrógeno. La CSD tiene la ventaja de que proporciona evidencia inequívoca de conformaciones observadas en una fase condensada. También puede confirmar relaciones teóricamente predichas entre conformaciones y longitudes de ángulos de enlace (Taylor & Wood, 2019).

Por ejemplo, la herramienta IsoStar es una biblioteca con información sobre interacciones intermoleculares en forma de diagramas de dispersión, cada uno de estos se relaciona con un grupo central y un grupo de contacto. El diagrama de dispersión se produce superponiendo en 3D, pares interactivos de grupos funcionales con un grupo funcional central. Ello permite visualizar mapas de densidad escalables para la formación de un nuevo enlace; sin embargo, solo es aplicable a grupos funcionales individuales. Para obtener estos mapas de moléculas complejas se desarrolló la herramienta Full Interaction Maps, la cuál permite obtener información de las interacciones más probables, y proporciona mapas de interacción indicativos de aceptores de puentes de hidrógeno (mostrados en rojo), donadores (azul) e interacciones hidrófobas (naranja). Esta metodología ofrece una

visualización general del comportamiento preferido de una interacción y sirve como punto de partida en la búsqueda de NFS (Wood et al., 2013).

### 2.4.1 Clasificación de Fases Sólidas Farmacéuticas

Existen varias fases sólidas en las que se encuentran los IFAs, las cuales se muestran en la **Figura 14**. A continuación, se describirán cada una de estas.



**Figura 14** Posibles arreglos cristalinos en estado sólido de un IFA y su forma amorfa (Williams et al., 2013b).

#### ❖ **Amorfos:**

Se trata de aquellos compuestos que carecen de algún arreglo cristalino. Debido a esta característica, los amorfos exhiben diferentes energías libres, lo que a su vez da lugar a propiedades fisicoquímicas únicas. Entre una forma cristalina y una forma amorfa de un mismo IFA, esta última es menos estable debido a la falta de una estructura cristalina tridimensional, tienen un volumen libre y una mayor movilidad molecular (Gupta, Bhatia, Dave, Sutariya, & Gupta, 2018).

Para estabilizar esta fase amorfa, en los últimos años se han generado dispersiones sólidas amorfas empleando sistemas poliméricos, los cuales ayudan a reducir la movilidad molecular, generando interacciones intermoleculares entre la matriz polimérica y el IFA; ello es una gran alternativa durante el proceso de almacenamiento, ya que reduce el riesgo de cambios en la estructura de cristal amorfo (Williams et al., 2013a).

#### ❖ **Sales:**

Una sal generalmente se constituye entre una entidad ionizable y algún contraión. Una sal farmacéutica comprende un IFA (catión, anión ó zwitterión) y un contraión que podría ser molecular (mesilato, acetato, etc) o monoatómico (bromuro, sodio, etc) (Vioglio, Chierotti, &

Gobetto, 2017). Para ello se requiere un balance de carga, lo cual significa que una sal debe tener una estequiometría definida (Aitipamula et al., 2012).

Se estima que más del 50% de los IFAs comercializados se encuentran en su forma de sales (Schultheiss & Newman, 2009). La formación de estas entidades sólidas ayuda a modificar y a optimizar las propiedades fisicoquímicas del IFA puro, por ende mejorar su biodisponibilidad; así como modificar su grado de higroscopicidad, tener un mayor punto de fusión, mayor cristalinidad y mejor estabilidad física (Saal & Becker, 2013). Todo ello utilizando una gran variedad de contraiones farmacéuticamente aceptables, los cuales deben encontrarse en la lista GRAS de la FDA (**Tabla 3**, Gupta et al., 2018; Paulekuhn, Dressman, & Saal, 2007). Saal y colaboradores en el 2013 publicaron un review indicando las dosis máximas permitidas para el consumo humano de estos contraiones (Saal & Becker, 2013), por lo que es suma importancia tomar en cuenta esta información en el desarrollo de NFS. Por otro lado la base de datos del Orange Book (compendio de medicamentos aprobados en EUA a partir de 1982) clasifica a los IFAs en tres categorías (Paulekuhn et al., 2007):

**Categoría I:** Sales formadas por IFAs básicos (contraión ácido).

**Categoría II:** Sales formadas por IFAs ácidos (contraión básico).

**Categoría III:** Agentes sin transferencia de protón (no sales).

La selección del contraión generalmente se basa en la regla del  $\Delta pK_a$  entre el IFA y el contraión ( $\Delta pK_a = pK_{aBaseH^+} - pK_{aÁcido}$ ); cuando esta diferencia es  $>2$  ó  $3$ , se espera la formación de una sal. Idealmente para un IFA básico, el  $pK_a$  debe ser al menos 2 unidades de pH mayor que el  $pK_a$  del contraión; por el contrario, para un IFA ácido, el  $pK_a$  de este debe encontrarse al menos 2 unidades de pH más bajo que el  $pK_a$  del contraión elegido (Gupta et al., 2018).

**Tabla 3** Contraiones disponibles para la formación de una sal (Gupta et al., 2018).

Naturaleza del ión	Ejemplos de contraiones		
<b>Catión</b>	Aluminio	Etanolamina	Meglumina
	Arginina	Etilendiamina	Potasio
	Benzatina	Lisina	Procaína
	Calcio	Magnesio	Sodio
	Cloroprocaina	Histidina	Trietilamina
	Colina	Litio	Zinc
	Dietanolamina		
<b>Anión</b>	Acetato	Fosfato	Metilsulfonato
	Aspartato	Fumarato	Mucato
	Bencenosulfonato	Gluceptato	Napsilato
	Benzoato	Gluconato	Nitrato Octanoato
	Besilato	Glutamato	Oleato
	Bicarbonato	Glycolato	Pamoato
	Bitartrato	Hexanoato	Pantotenato
	Bromuro	Hidroxinaftato	Poligalacturonato
	Camsilato	Yoduro	Propionato
	Carbonato Clorhidrato	Isetionato	Salicilato
	Citrato	Lactato	Succionato
	Decanoato	Lactobionato	Sulfato
	Edetato	Malato	Tartrato
	Esilato	Maleato	Teoclato
	Estearato	Mandelato	Tosilato
		Mesilato	

#### ❖ Hidratos/solvatos

Los hidratos/solvatos son conocidos también como pseudopolimorfos y se generan durante el proceso de síntesis. Son acoplamientos moleculares del IFA con moléculas de agua (hidrato) o algún solvente orgánico (solvato); los cuales forman interacciones intermoleculares con el IFA y son incorporados en la misma red cristalina (Williams et al., 2013a). Durante el proceso de síntesis es preferible el uso de solventes de la clase 3 de la FDA, ya que se consideran menos tóxicos y de menor riesgo para la salud humana. Sin embargo, no existen estudios de toxicidad o carcinogenicidad a largo plazo para muchos de estos solventes. Se considera que cantidades residuales de estos disolventes menores a 50 mg/día serían aceptables (U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 2017a).

#### ❖ Polimorfos

Hacen referencia a las diferentes formas cristalinas de un IFA (Kawakami, 2012). Además, se sabe que las diferentes disposiciones de empaquetamiento cristalino influyen en un conjunto de propiedades fisicoquímicas, que incluyen a la estabilidad, la solubilidad y la velocidad de disolución entre un polimorfo y otro (Thakuria et al., 2013).

Un ejemplo emblemático de ello fue el caso de Ritonavir. Un IFA que fue aprobado como agente antiretroviral en 1996, formulado como semisólido en cápsulas de gel para el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia humana. La formulación comercial contenía la Forma I hasta el momento conocida; sin embargo, cuatro años más tarde se percataron que en la formulación comercial habría precipitado una nueva forma de Ritonavir (Forma II), la cual resultó ser menos soluble que la anterior. Además, se presentaron problemas en la reproducibilidad de la manufactura de la Forma II. Ello trajo consigo diversos problemas de estabilidad de la formulación, además de que miles de pacientes se quedaron sin tratamiento y resultando en pérdidas millonarias para la industria farmacéutica productora (Gupta et al., 2018) (Domingos et al., 2015).

Hasta el momento no existe un patrón identificado en los IFAs en cuanto a la aparición de nuevas modificaciones polimórficas; sin embargo, se ha observado que dicho fenómeno es más común entre aquellas moléculas que tienen conformaciones flexibles ó bien en aquellas que cuenten con muchos grupos funcionales capaces de formar enlaces por puente de hidrógeno (Desiraju, 1995) (Domingos et al., 2015).

Finalmente, identificar las posibles fases polimórficas en el desarrollo temprano de medicamentos es de suma importancia para minimizar los problemas relacionados con la inestabilidad de la fase en etapas posteriores.

### ❖ **Cocristales**

Un cocrystal es una entidad sólida homogénea cristalina formado por dos o más componentes diferentes y/o iónicos con una estequiometría definida, los cuales no son solvatos ni sales simples; y el arreglo cristalino debe estar dado por interacciones no covalentes (Duggirala et al., 2016; Vioglio et al., 2017).

En los **cocristales farmacéuticos** al menos uno de los componentes debe ser un IFA y el otro componente auxiliar en la formación del cocrystal (denominado coformador) debe ser un sólido a temperatura ambiente e inocuo para el consumo humano; generalmente los coformadores se seleccionan de la lista GRAS (generalmente reconocido como seguro) de la FDA (Food and Drug Administration).

Zaworotko y colaboradores han clasificado a los cocristales en dos grupos, cocristales moleculares y cocristales iónicos, dependiendo de la naturaleza de los coformadores que contengan (Duggirala et al., 2016).

**Cocristales moleculares:** Aquellos que contienen dos o más coformadores en estado neutro, los cuales deben estar en una proporción estequiométrica y unidos generalmente mediante puentes de hidrógeno.

**Cocristales iónicos:** Son aquellos constituidos entre una molécula orgánica y una sal iónica. Se representan de la siguiente manera:  $[A^+B^-N]$ , donde  $A^+$  es una catión,  $B^-$  es un anión y N es la molécula neutra u otra sal (Domingos et al., 2015). Normalmente se unen mediante enlaces de puente de hidrógeno asistidos por carga y/o enlaces de coordinación (Duggirala et al., 2016). El primer cocrystal iónico reportado (entre sacarosa y bromuro de sodio) fue en 1946 por Beevers y colaboradores (Delori, Frišić, & Jones, 2012).

Actualmente existen varios cocristales farmacéuticos disponibles comercialmente (**Tabla 4**), y algunos otros que se encuentran en desarrollo y en fases clínicas para su aprobación.

**Tabla 4** Cocristales farmacéuticos comercialmente disponibles (Kavanagh, et al.,2019).

Denominación comercial	Aprobación por la FDA	Componentes	Indicación terapéutica
Depakote®	1983	Ácido valproico...valproato de sodio	Epilepsia
Cafcit®	1999	Cafeína...ácido cítrico	Apnea infantil
Lexapro®	2002	Oxalato de escitalopram...ácido oxálico	Depresión
Suglat®	2014	lpraglifozina...L-prolina	Diabetes
Entresto®	2015	Valsartán sódico...sacubitril sódico	Insuficiencia cardiaca
Odomzo®	2015	Sonidegib monofosfato...ácido fosfórico	Carcinoma de células basales
Steglatro®	2017	Ertuglifozina...L-ácido piroglutámico	Diabetes

#### 2.4.2 Importancia y Diseño de Cocristales

Frecuentemente, las propiedades de un IFA representan varios inconvenientes durante el desarrollo o manufactura del producto final. De los más comunes se incluyen, susceptibilidad a la humedad, problemas de flujo y compresibilidad, inestabilidad térmica, baja solubilidad y tasas de disolución insuficientes, lo cual impacta directamente en una baja biodisponibilidad (Delori et al., 2012; Jones & Eddleston, 2014).

Los cocristales farmacéuticos abren una nueva dimensión a buscar formas sólidas ya que se modifica la biodisponibilidad de un IFA, pues se modulan ciertos aspectos como los mencionados anteriormente sin afectar sus propiedades farmacológica intrínsecas (Vioglio

et al., 2017). Además de que han ganado cierto interés por la industria farmacéutica ya que son seguros y con bajo costo de síntesis, aunado a solicitar la propiedad intelectual sin infringir con la patente original del IFA en cuestión (Jones & Eddleston, 2014; Kavanagh et al., 2019).

### **2.4.3 Formadores de Cocrystal**

Los formadores de cocrystal o coformadores son componentes inertes, generalmente reconocidos como seguros (lista GRAS de la FDA), que interactúan con el IFA de manera no iónica y no covalente (donde el enlace por puente de hidrógeno es el de mayor importancia) en la misma red cristalina (Baldrighi et al., 2013). Deben ser baratos y de bajo peso molecular (Kavanagh, et al., 2019). Se encuentran en relación estequiométrica con el IFA, y son sólidos a temperatura ambiente. Para que un coformador sea empleado en la obtención de cocristales farmacéuticos, se debe asegurar que esta entidad cocrystalina se disocia antes de que el IFA llegue a su sitio diana. Para ello las evaluaciones *in vitro* (estudios de solubilidad y disolución) se consideran evidencia suficiente para demostrar que el cocrystal se disocia (FDA, 2018).

De manera empírica se toma en cuenta la regla de  $\Delta pK_a$  [ $pK_a$  (ácido conjugado de la base) -  $pK_a$  (ácido)] para la selección del coformador, donde si se obtienen valores  $<1$  no habrá transferencia completa de protón, por lo que el producto final muy probablemente será un cocrystal (Cruz-Cabeza, 2012).

### **2.4.4 Métodos de Generación de Cocristales farmacéuticos**

Los métodos tradicionales para la síntesis de cocristales incluyen evaporación lenta de disolvente, transformación de fase por Slurry (transformación sólido-sólido inducida por disolvente) y molienda mecanoquímica en estado sólido asistida o no con disolvente (Kuminec, et al 2016). Recientemente se han explorado nuevas rutas de síntesis como la molienda mecanoquímica asistida con polímeros, cristalización por ultrasonido ó con antisolvente, sonicación, sublimación, el uso de fluidos supercríticos (ejemplo  $sCO_2$ ), secado por pulverización (spray drying) y extrusión en caliente (hot melt extrusion) (Duggirala et al., 2016; Fucke et al., 2012; Vioglio et al., 2017). A continuación, se describirán aquellas rutas de síntesis tradicionales que son empleadas en el grupo de investigación.

#### **2.4.4.1 Molienda mecanoquímica**

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define a la reacción mecanoquímica *como una reacción que es inducida por la absorción directa de la energía mecanoquímica* (James et al., 2012). Es así como la molienda en estado sólido utiliza esta energía mecánica para crear nuevos conjuntos moleculares y supramoleculares. El proceso de molienda puede llevarse a cabo en un mortero de agata o en un molino de bolas, en el que se mezclan cantidades equimolares de compuestos sólidos. Existen dos variables de esta técnica, la primera que se lleva a cabo en seco, y la segunda es asistida por disolvente (SDG, por sus siglas en inglés). En esta última se requieren pequeñas cantidades de disolvente, el cual actúa únicamente como un catalizador y se agota durante el proceso de la cristalización (Vioglio et al., 2017). Se espera que se formen pequeñas semillas de cocrystal dentro del disolvente durante el proceso de molienda, de modo que se pueda aumentar la velocidad de cocrystalización hacia un mayor grado de cristalinidad. La elección del solvente debe ser uno que pueda disolver al menos a uno de los componentes originales (Shan, Toda, & Jones, 2002) antes de la formación temporal de la formación de fases eutécticas, que posteriormente sufren un proceso de nucleación para formar los cocrystalales sólidos (Ross, 2017).

#### **2.4.4.2 Transformación sólido-sólido inducida por disolvente (reacción de Slurry)**

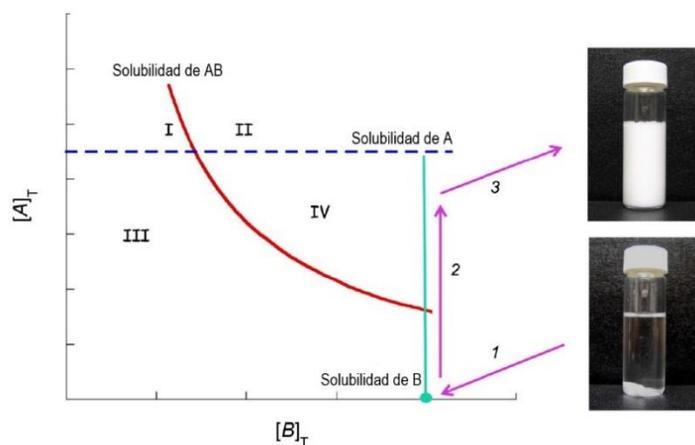
En esta técnica se emplean relaciones equimolares del IFA y del coformador en cuestión. A la mezcla se le adiciona una pequeña cantidad de disolvente, el cual produce una sobresaturación (en forma de pasta) con respecto al cocrystal. La transformación mediada por solución en el cocrystal ocurre de manera similar a la transformación entre polimorfos (Takata, Shiraki, Takano, Hayashi, & Terada, 2008). La mezcla se mantiene en agitación constante, y se sugiere que con ayuda del disolvente existe una competencia entre diversos agregados moleculares por la formación de enlaces de hidrógeno para alcanzar el tamaño crítico del núcleo que determinará la fase sólida final (Khamar, Zeglinski, Mealey, & Rasmuson, 2014).

Debido a la simpleza de la técnica, es utilizada durante la búsqueda de NFS, ya que permite evaluar varios sistemas a la vez (diferentes coformadores y disolventes). Así durante el proceso de screening se logra definir la forma más estable, además de que permite la búsqueda de formas polimórficas (Zhang Geoff, Henry Rodger, Borchardt Rhomas, 2007).

### 2.4.4.3 Reacción de cristalización

La reacción de cristalización es un método muy empleado para la generación de cocrisales farmacéuticos, ya que se asegura la obtención de fases cocrisalinias con alto grado de pureza. Usualmente se lleva a cabo bajo condiciones ambientales. Se inicia con una solución sobresaturada de uno de los componentes (coformador, **Figura 15** paso 1) y se mantiene en agitación; a dicha solución se van agregando en exceso cantidades del sólido del otro componente (usualmente el IFA, **Figura 15** paso 2) para alcanzar concentraciones no estequiométricas (Rodríguez-Hornedo et al., 2006). El producto final es visible a simple vista, en este paso la nucleación y la cristalización del complejo molecular da inicio en cuanto empieza a disminuir la solubilidad del cocrystal (**Figura 15** paso 3) (Khamar et al., 2014).

Para ello existe diagramas de fase donde se ejemplifican los diferentes componentes del sistema y se identifican las condiciones de preparación de los cocrisales en la solución (Rodríguez-Hornedo, et al., 2006). En la **Figura 15** se observa la solubilidad del IFA (A), la solubilidad del coformador (B) y la del cocrystal (AB). En la zona I se encuentra una solución sobresaturada de A, en la zona II se encuentra una alta concentración tanto de A como de B, en la zona III se observa una solución supersaturada de A y AB, y ambos pueden recrystalizarse. Finalmente, en la zona IV se observa una solución sobresaturada de AB y A puede convertirse también en el cocrystal (Kuminek, Cao, Bahia, & Oliveira, 2016).



**Figura 15** Diagrama de fase que indica la posible formación o disolución de un cocrystal ((Kuminek, Cao, Bahia, et al., 2016).

Se debe tener cuidado al momento de seleccionar el disolvente que se empleará en el sistema, ya que este tiene una gran influencia sobre el comportamiento de la nucleación

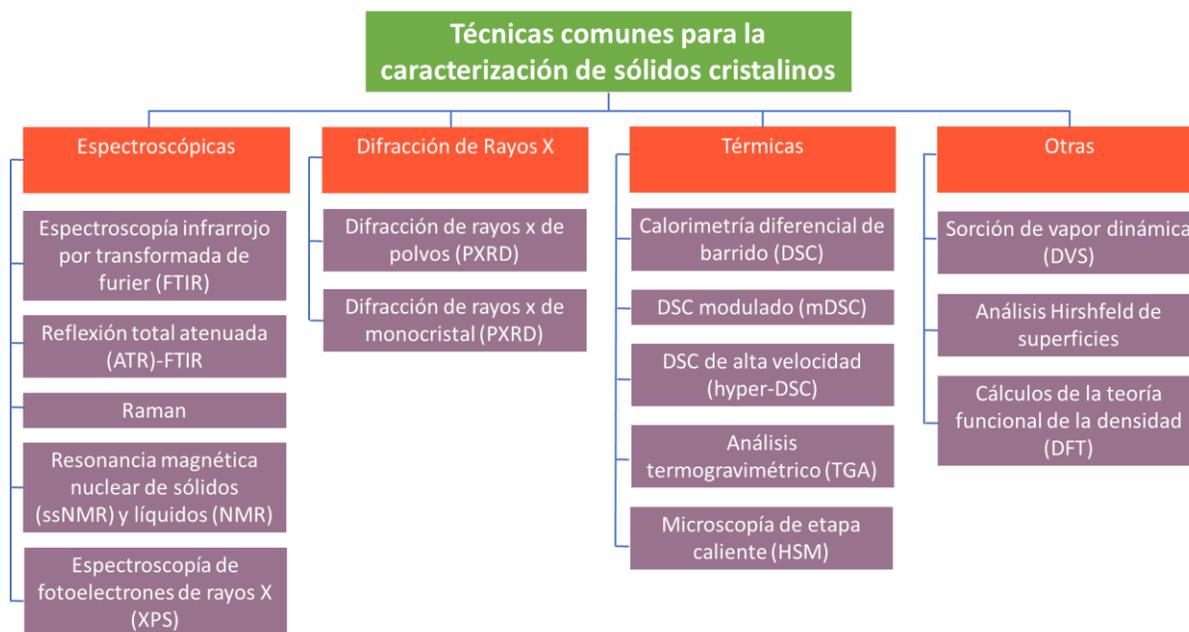
del cocrystal (Khamar et al., 2014). Un solvente ideal debe asegurar una solubilidad suficiente para el componente en sobresaturación; así como un buen gradiente de solubilidad bajo diferentes temperaturas; tiene que tener baja presión de vapor, baja toxicidad, baja inflamabilidad y baja viscosidad, además ser barato (Pritula & Sangwal, 2015).

En el presente trabajo se emplearon los métodos de molienda mecanoquímica asistida con gota de disolvente y la reacción de cristalización.

## 2.5 Métodos de Caracterización de Nuevas Fases Sólidas

### 2.5.1 Caracterización Física y Espectroscópica

Algunas de las técnicas ampliamente empleadas para la caracterización física y espectroscópica de NFS se muestran en la **Figura 16**. A continuación, se describen aquellas comúnmente usadas en el grupo de investigación.



**Figura 16** Ejemplo de técnicas físicas y espectroscópicas para la caracterización de NFS según Healy y colaboradores (Healy, Worku, Kumar, & Madi, 2017).

#### 2.5.1.1 Espectroscopía IR

Los análisis por espectroscopía IR brindan un espectro como huella dactilar de un compuesto específico. Se trata de un tipo de espectroscopía vibracional, la cual brinda

información acerca de los modos vibracionales específicos y característicos de los grupos funcionales presentes en un material. Para que una molécula muestre absorciones infrarrojas, el momento dipolar de esta debe cambiar durante la vibración; dicho fenómeno se ve influenciado a medida que el enlace se expande o se contrae. Las vibraciones pueden implicar un cambio ya sea en la longitud de enlace (estiramiento), o bien sobre el ángulo de este (flexión). A su vez algunos enlaces pueden presentar un estiramiento simétrico ó antisimétrico.

Un espectro de IR es obtenido cuando una muestra se irradia con radiación infrarroja y se determina qué fracción de esta luz incidente es absorbida con una energía en particular. La energía a la cual aparece una banda en el espectro de IR corresponde a la frecuencia de vibración de una parte de la molécula. La radiación infrarroja forma parte del espectro electromagnético, se encuentra entre las regiones de la luz visible y las microondas.

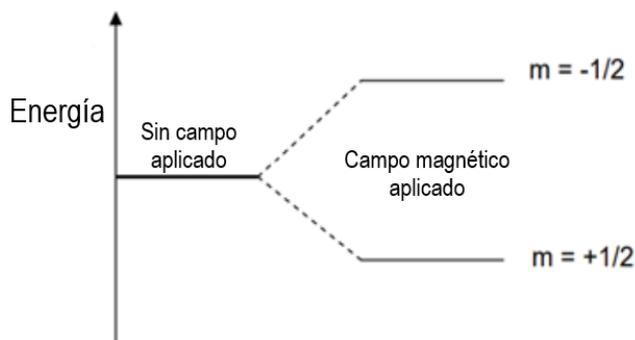
Los análisis de caracterización aplicables a moléculas orgánicas, entre ellas fármacos, se llevan a cabo en la región media de IR, entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$ . Dicha región se puede dividir a su vez en la región de estiramiento X-H (4000-2500  $\text{cm}^{-1}$ ), la región de los triples enlaces (2500-200  $\text{cm}^{-1}$ ), la región de los dobles enlaces (2000-1500  $\text{cm}^{-1}$ ) y la región de la huella dactilar (1500-600  $\text{cm}^{-1}$ ). Las vibraciones fundamentales debidas a estiramiento O-H, C-H y N-H aparecen entre 4000-2500  $\text{cm}^{-1}$ ; el estiramiento O-H produce bandas anchas entre 3700-3600  $\text{cm}^{-1}$ ; el estiramiento N-H usualmente se observa entre 3400-3300  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas principales entre 200-1500  $\text{cm}^{-1}$  son debidas al estiramiento C=C y C=O. Generalmente se reporta la intensidad de una banda de manera cualitativa como fuerte, media ó débil.

La espectroscopía IR ayuda a discernir entre un material cristalino y otro; dicha técnica se vuelve más importante si algunas bandas particulares son relativamente sensibles a una forma sólida particular. La frecuencia o el número de onda de absorción depende de la masa relativa de los átomos presentes, de las fuerzas constantes de los enlaces; así como de la geometría de los átomos en el material (Silverstein R., Webster F., 2005) (Stuart B., 2004) (Healy, Worku, Kumar, & Madi, 2017)

### **2.5.1.2 Espectroscopía por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

El fenómeno de resonancia ocurre cuando los núcleos alineados con un campo magnético aplicado son inducidos a absorber energía en el rango de las radiofrecuencias y cambiar su orientación de giro con respecto al campo aplicado; esta diferencia de energía es una

función de la fuerza del campo magnético aplicado ( $B_0$ ) (Lampman, Vyvyan, Pavia, & Kriz, 2001). Los núcleos de protón y carbono ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , respectivamente) son los más comunes para el estudio y elucidación de moléculas orgánicas, los cuales presentan un estado de espín ( $I = \frac{1}{2}$ ), donde el número de orientaciones está determinado por  $2I+1$ . A mayor campo magnético aplicado mayor será la diferencia en energía entre ambos estados de espín.



**Figura 17** Orientación del espín cuando se aplica un campo magnético (Laurella, 2017).

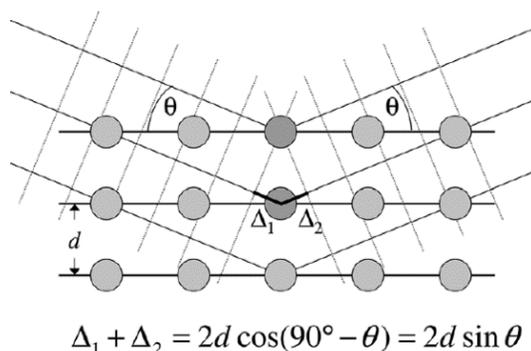
El análisis de un espectro se centra en los siguientes parámetros: los desplazamientos químicos ( $\delta$ ), las constantes de acoplamiento ( $J$ ) y las intensidades de las señales ( $I$ ) (Friebolin, 1993). En el análisis de  $^1\text{H}$  se distinguen diferentes tipos de protones en una molécula, en este caso el área bajo la curva en cada señal es proporcional al número de hidrógenos relativos; además de que existen desplazamientos químicos característicos de diagnóstico en ciertas zonas del espectro. El desplazamiento químico de un protón se ve influenciado por diversos factores, entre ellos destacan la electronegatividad de los elementos vecinos (Lampman et al., 2001).

La espectroscopía por RMN en estado sólido (RMN CP-MAS, cross-polarization with magic angle spinning o RMN con ángulo mágico de polarización cruzada de estado sólido) es una técnica no destructiva. Se trata de una técnica de doble resonancia con polarización transferida de núcleos abundantes ( $^1\text{H}$ ) a núcleos escasos ( $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ ), ello permite obtener mayor sensibilidad de estos últimos y optimizar el tiempo de adquisición de los datos. Esta técnica proporciona información relacionada con un entorno molecular local, como el número de moléculas independientes de simetría y sus valores característicos de desplazamiento químico relacionados con formas sólidas particulares. La RMN CP-MAS

analiza los entornos circundantes de los átomos en su forma sólida y puede emplearse para estudiar el polimorfismo de un cocrystal (Healy et al., 2017).

### 2.5.1.3 Difracción de rayos x de polvos/monocristal

La difracción de rayos x (DRX) implica la medición de la intensidad de los rayos X dispersados por los electrones unidos a los átomos. Las ondas dispersas por los átomos en diferentes posiciones llegan al detector con un cambio de fase relativo, lo que afecta su intensidad. Por lo tanto, las intensidades medidas proporcionan información sobre las posiciones atómicas relativas. Para recolectar los datos se incide un haz de rayos X sobre un conjunto de planos reticulares cristalográficos con distancias  $d_{hkl}$  en un ángulo  $\theta$ . La longitud de cada período es la longitud de onda  $\lambda$ , un cambio relativo de esta depende de la configuración de los átomos. Este cambio consta de dos contribuciones,  $\Delta_1$  y  $\Delta_2$ , donde la suma de estos es igual  $2d\sin\theta$  en cualquier ángulo  $\theta$  arbitrario (**Figura 18**). La difracción ocurre a ángulos que cumplen la ecuación de Bragg:  $n\lambda=2d\sin\theta$ , donde  $n$  es un número entero,  $\lambda$  es longitud de onda de la radiación usada,  $d$  es el espacio interplanar de su red cristalina y  $\theta$  es el ángulo entre los rayos x incidentes y el plano de difracción (Birkholz, 2006; Dinnebier Robert E., 2008). Este tipo de análisis son complementarios para la identificación de la naturaleza de un sólido, para conocer la pureza de una muestra, la morfología y la geometría de difracción de un cristal (monocristal, SCXRD) o para conocer el grado de cristalinidad de un sólido de interés (de polvos, DRXP).



**Figura 18** Representación de la ecuación de Bragg. La intensidad de dispersión máxima solo se observa cuando las diferencias de fase se suman a un múltiplo de la longitud de onda incidente  $\lambda$  (Birkholz, 2006).

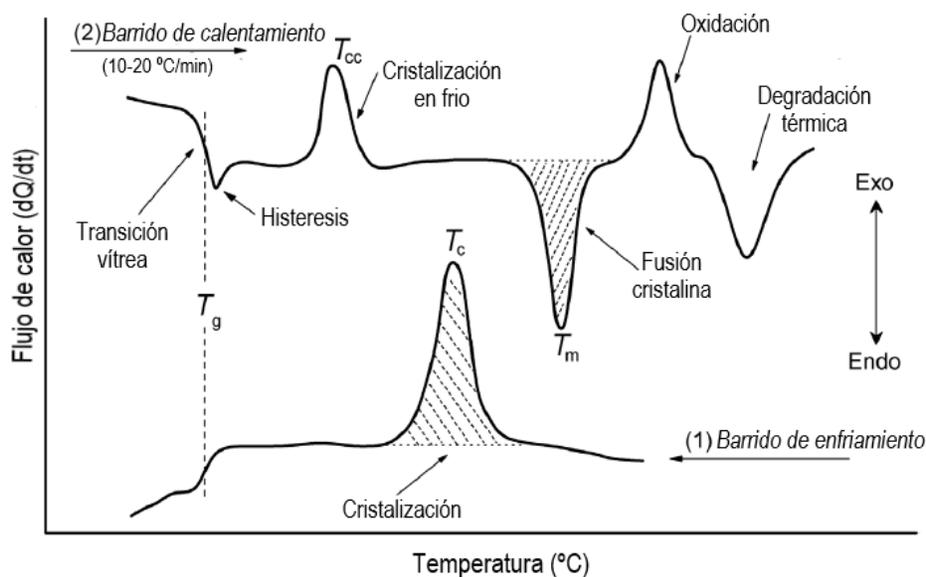
### 2.5.1.4 Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimétrico (TGA)

El análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) es uno de los métodos de análisis térmico más utilizado en el campo farmacéutico. Se trata de la medición de calor, la cual hace referencia a la cantidad de energía intercambiada dentro de un intervalo de tiempo

dado en forma de flujo de calor, entre una muestra y un material de referencia, el cual se puede medir en un rango amplio de temperatura (Sarge, S. M., Höhne, G. W., & Hemminger, 2014).

El enfoque generalmente implica la aparición de una señal lineal que representa al barrido del calentamiento de una muestra; así como la medición posterior de la temperatura y la energía asociadas con varios tipos de eventos térmicos que incluyen fusión, cristalización, transiciones vítreas y reacciones de descomposición (**Figura 19**) (Zheng et al., 2019). Así la calorimetría se basa en el hecho de que todos los cambios de estado físicos y las reacciones químicas implican un cambio de energía, generalmente acompañado de liberación de calor (evento exotérmico) o absorción de este (evento endotérmico) (Duncan Q & Reading, 2007).

Si se produce un cambio exotérmico en la muestra, se debe suministrar más calor a la referencia (que es equivalente a extraer energía de la muestra). Durante un proceso endotérmico, se debe suministrar una cantidad adicional de energía al calentador de muestra. La diferencia en el calor suministrado a la muestra y la referencia se registra en función de la temperatura. Esta señal es proporcional al calor específico de la muestra, que determina la cantidad de calor necesaria para cambiar la temperatura de la muestra en una cantidad determinada (Pindelska, Sokal, & Kolodziejski, 2017b).



**Figura 19** Representación esquemática de curvas de DSC del barrido por (1) enfriamiento y (2) calentamiento, mostrando diferentes eventos térmicos de un polímero típico (Kalogeris, 2016).

Frecuentemente el análisis por DSC se lleva a cabo simultáneamente con el análisis termogravimétrico (TGA), el cual mide el cambio de masa (pérdida ó ganancia) de un material en función del tiempo o de la temperatura bajo una atmósfera controlada (generalmente N<sub>2</sub>) (Pindelska et al., 2017b). Usualmente esta técnica se emplea para detectar reacciones de descomposición del sólido en cuestión, así como observar la presencia de agua/disolvente en la muestra y la cuantificación de esta pérdida de peso confirma la estequiometría (Healy et al., 2017).

En el sector farmacéutico, dichas técnicas son empleadas para determinar el punto de fusión y la entalpía de fusión; ambas propiedades ayudan a predecir la solubilidad y la estabilidad de las NFS en desarrollo. La pureza y la cristalinidad de la muestra se pueden evaluar a partir de la agudeza de la endoterma; la naturaleza de este evento también puede proporcionar información sobre los hidratos y solvatos en la estructura cristalina (Gupta et al., 2018).

## **2.5.2 Caracterización Biofarmacéutica**

### **2.5.2.1 Estabilidad Indicativa**

La FDA define a un IFA estable cuando es capaz de mantener sus propiedades fisicoquímicas, biológicas-terapéuticas y microbianas durante el tiempo de uso y almacenamiento. Existen diferentes factores que afectan esta estabilidad: la temperatura, la cual degrada al IFA; el pH, el cual puede conducir a la descomposición del fármaco y cambios en su solubilidad; la humedad, el agua cataliza reacciones químicas como oxidación, reducción e hidrólisis (Pindelska et al., 2017b). Entender estas ó algunas propiedades de un sólido cocrystalino es muy importante, ya que da un panorama sobre el diseño robusto de formulaciones con propiedades biofarmacéuticas deseables.

Por ello las fases cocrystalinas de interés se almacenan durante cierto tiempo, por ejemplo, un mes, en cámaras controladas bajo condiciones de estrés de temperatura y humedad relativa. Los estudios de estabilidad acelerada que dicta la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015 “Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios” se deben realizar durante tres meses (SSA, 2016); sin embargo, los resultados obtenidos de la prueba de estabilidad indicativa en el lapso de un mes pueden correlacionarse con los requeridos con la norma; y puede ayudar a predecir el comportamiento del material cocrystalino, ya que varios procesos de manufactura

generalmente se llevan a cabo en altas temperaturas o están en contacto con la humedad del ambiente.

### **2.5.2.2 Solubilidad**

La solubilidad es una propiedad termodinámica que se define como la actividad (ó concentración) de un soluto disuelto en un disolvente específico a una temperatura y presión, en la presencia de su fase sólida. Este equilibrio termodinámico de un soluto en dos fases (una fase sólida y una solución en fase líquida) se relaciona también con una solución saturada (Thakuria et al., 2013). La solubilidad acuosa de un IFA depende de su estructura química, de las interacciones que presenta con el agua (v.gr., interacciones soluto-disolvente) y de sus propiedades en el estado sólido. La solubilidad es uno de los factores cruciales que afectan directamente la biodisponibilidad oral de un IFA; ya que este tiene que disolverse en el TGI para ser absorbido en el torrente sanguíneo y por ende generar un efecto farmacológico sistémico; es así que la absorción puede estar limitada por esta propiedad y por su velocidad de disolución (Sherry Ku Mannching, 2010).

La solubilidad es también uno de los parámetros definidos en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico, SCB (Krishna, Rajesh Yu, 2008); bajo los estándares de este sistema, la solubilidad se cuantifica en base a las propiedades de solubilidad de la cantidad de sólido equivalente a la dosis más alta existente en un producto de liberación inmediata en el país en cuestión. Según el SCB un IFA se considera altamente soluble cuando la dosis más alta de este se solubiliza en 250 mL o menos de agua en un rango de pH de 1.0 a 7.5; de lo contrario, la sustancia farmacológica se considera poco soluble (Grandgirard, et al., 2002).

Para evaluar la solubilidad de un cocrystal, se realiza mediante la medición al equilibrio (también denominado shake-flask) que se basa en la cuantificación de la concentración de los componentes del cocrystal en una solución saturada; en el cual se asegura que el sistema se encuentra en equilibrio termodinámico y se verifica que el sólido al final del experimento corresponda a la fase sólida inicial. En este estudio es importante asegurar que se alcanza la concentración de equilibrio, por ello es conveniente medir la concentración de los componentes del cocrystal durante diferentes tiempos (v.gr., un perfil de disolución) hasta que la concentración se vuelve independiente del tiempo. Este estudio proporciona información sobre la escala de tiempo de los procesos dinámicos y las fluctuaciones de concentración durante la disolución del cocrystal (Pindelska, Sokal, & Kolodziejcki, 2017a).

### 2.5.2.3 Evaluación del perfil de disolución

Las pruebas de disolución se han vuelto indispensables para evaluar el desempeño y predecir la equivalencia farmacéutica de un producto. A menudo se han empleado para preveer bioexenciones a los IFAs que pertenecen a la clase I y III del SCB (alta solubilidad-alta permeabilidad y alta solubilidad-baja permeabilidad, respectivamente) (FDA, 2017b) (EMA, 2010). Los estudios de disolución para formulaciones generalmente se realizan empleando métodos farmacopeicos en el aparato I (canastillas) o II (paletas) de la USP en un rango de pH 1.2-6.8 (FEUM, 2008).

La evaluación del perfil de disolución en estado sólido para IFAs puros se realiza mediante la prueba de disolución intrínseca o bien mediante la disolución en polvos. Existen características diferentes sobre el uso de una u otra técnica (Aitipamula et al., 2012). Los procesos cinéticos de disolución de los sólidos farmacéuticos dependen de las interacciones presentes en la red cristalina, así como del medio de disolución.

#### ❖ Disolución intrínseca

La velocidad de disolución intrínseca (VDI) hace referencia a la velocidad de disolución de un IFA cuando se mantiene en condiciones *sink*. Éstas condiciones se logran cuando la capacidad del medio seleccionado para solubilizar la dosis es al menos tres veces la cantidad necesaria (Venkatramana, M. Rao. Ritesh, Sanghvi. Haijian, Jim, 2009). También es importante mantener el área superficial, la temperatura, la velocidad de agitación, el pH y la fuerza iónica del medio de disolución de manera constante. La velocidad de disolución es directamente proporcional a la solubilidad del IFA, la cual se describe con la ecuación de Noyes-Whitney (Venkatramana, et al., 2009):

$$\text{Velocidad de disolución} = \frac{dM}{dt} = \frac{DA}{h} (C_s - C_t)$$

Donde:  $dM / dt$  es la velocidad de transferencia de masa,  $D$  es el coeficiente de difusión ( $\text{cm}^2 / \text{s}$ ),  $A$  es el área superficial del IFA ( $\text{cm}^2$ ),  $h$  es el grosor de la capa acuosa estacionaria o estática ( $\text{cm}^2$ ),  $C_s$  es la solubilidad de saturación del IFA y  $C_t$  es la concentración del IFA a un tiempo  $t$ .

Para determinar la VDI se emplea el aparato de Wood. La USP recomienda dos sistemas: 1) el sistema de disco rotatorio: donde polvo del IFA es compactado en una matriz que se pone en contacto con el medio de disolución y se pone a girar a una velocidad determinada;

2) el sistema de disco estacionario, donde la matriz se mantiene en el fondo del vaso y la agitación se lleva a cabo mediante el uso del aparato I de la USP (canastillas) a una velocidad específica. En ambos casos se asume que durante la prueba de disolución se mantiene un área superficial constante.

El perfil de disolución se grafica generalmente comparando la cantidad disuelta acumulada del IFA con respecto al tiempo. Los datos se analizan por medio de una regresión lineal simple con el fin de determinar la linealidad de la cinética. La pendiente calculada corresponde a la velocidad de disolución. Si los datos contemplan el área de superficie proporcionada por el aparato de Wood, la pendiente corresponde a la VDI ( $k_{int}$ ), cuyas unidades generalmente son en  $mg/min \cdot cm^2$ .

Sin embargo, cabe señalar que un requisito relevante es que al término del experimento se determine la identidad del sólido. Si este se mantuvo constante, se puede asegurar que la VDI calculada corresponde a la del sólido de partida. En caso de que haya una transformación de fase mediada por el medio de disolución, los resultados corresponden a la  $k_{aparente}$ .

#### ❖ **Disolución de polvos**

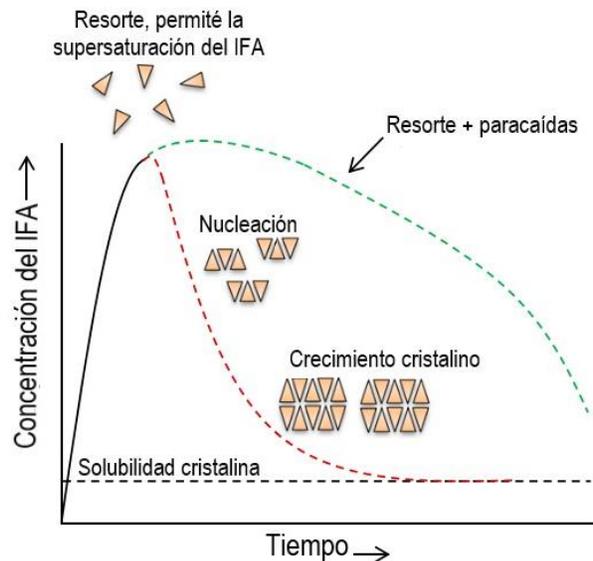
La disolución de polvos puede ayudar a predecir el comportamiento *in vivo* que sufrirá la entidad sólida que se esté evaluando. Esta evaluación biofarmacéutica se realiza estableciendo la solubilidad al equilibrio, en la cual se mantiene un sistema saturado -con un exceso del sólido a evaluar- en el medio de disolución (condiciones *no sink*) y bajo condiciones experimentales bien controladas. Se requiere un cierto número de puntos de muestreo y es fundamental observar una meseta en los datos de concentración como evidencia de que se alcanzó el equilibrio (Pindelska et al., 2017b). Existen diversos factores que pueden modificar dicho comportamiento como son el tipo y la concentración de excipientes (aditivos como polímeros o surfactantes), la cantidad del sólido de interés, así como el volumen y el tipo de medio de disolución (Childs, Kandi, & Lingireddy, 2013).

Debido a la saturación en el medio, es posible evaluar la estabilidad en solución del polvo cocrystalino, el cual se monitorea mediante DRXP y se puede identificar así la cinética de transformación de fase, en caso de que exista, del sólido de interés (Venkatramana, et al., 2009). El tamaño de la partícula tiene un gran impacto sobre esta técnica, si este es

uniforme y pequeño se asegura una mejor y mayor área de contacto de todas las partículas sólidas con el medio de disolución (Pindelska et al., 2017a).

### Inducción de la sobresaturación y modulación de la transformación de fase

La disolución de IFAs formulados como amorfos (sólidos de alta energía), así como algunas sales provenientes de ácidos o bases débiles generan estados de supersaturación del IFA disuelto en la solución con respecto a la solubilidad de la forma cristalina estable. A este comportamiento se le conoce como efecto “resorte”. Estas soluciones supersaturadas proporcionan una ventaja con respecto a la disolución del IFA neutro debido a un aumento en la concentración efectiva; sin embargo, son altamente inestables y tienden a precipitar en una forma más estable pero menos soluble. Esta velocidad de precipitación puede reducirse con aditivos que funcionen como inhibidores de la precipitación, principalmente inhibiendo la tasa de nucleación o provocando un crecimiento lento de los cristales. Siguiendo con la analogía del “resorte” (inducción de la supersaturación), la inhibición de la precipitación del IFA se ha denominado efecto “paracaídas”; por lo tanto, a la combinación de ambos efectos se le ha denominado efecto “resorte-paracaídas” (**Figura 20**) (Khamar et al., 2014; Warren, Bergström, Benameur, Porter, & Pouton, 2013; Williams et al., 2013b).



**Figura 20** Perfil de disolución de un IFA amorfo (de alta energía) con respecto al tiempo (Williams et al., 2013b).

El proceso de precipitación de una solución supersaturada se rige por dos pasos críticos: 1) la nucleación, y 2) el crecimiento cristalino (tal como se observa en la **Figura 20**); los cuales se ven influenciados por la estructura cristalina y la flexibilidad molecular, el solvente, la temperatura, la agitación y algunas otras impurezas o aditivos. Los enfoques de formulación mediante el uso de aditivos como polímeros, surfactantes y ciclodextrinas, modulan los dos pasos anteriores, aumentando la estabilidad de la solución supersaturada mediante la reducción de la tasa de precipitación y permitir la absorción (Zhang Geoff, Henry Rodger, Borchardt Rhomas, 2007).

Se ha observado que existen diferencias significativas a cerca de la naturaleza del polímero inhibidor de la precipitación que se emplee, ello conlleva a obtener diferencias importantes en la evaluación y la estabilización del IFA en supersaturación (Healy et al., 2017). Hasta el momento no se conocen los mecanismos exactos de cómo actúa un polímero para mantener el estado sobresaturado, pero se cree que existen los siguientes:

- Aumentan la solubilidad del IFA en la solución, en algunos casos existe una mejora directa sobre la solubilidad en equilibrio.
- Aumentan la viscosidad del medio (aún en concentraciones muy bajas, 0.05 – 1% (p/p)), de ahí que inhiben la precipitación tanto en estado sólido como en solución.
- Disminuyen la movilidad molecular (cambios en la viscosidad e interacciones moleculares entre IFA-coformador).
- Interactúan con el IFA en solución (a través de puentes de hidrógeno o por interacciones iónicas e hidrofóbicas), lo que provoca un cambio de la capa de adsorción en la interfaz, retardando así la nucleación.
- Alteran la energía superficial de alguna de las superficies del cristal y con ello se modifica el grado de solvatación.

Para la selección del polímero más adecuado en la preformulación farmacéutica, se emplea la técnica de cambio de disolvente o *solvent-shift*. Esta técnica se basa en agregar alícuotas de una solución del IFA disuelto generalmente en DMSO o DMF al medio con el que se realizarán las pruebas de disolución subsecuentes que contenga al polímero predisolto hasta alcanzar un estado de supersaturación (M. Sun et al., 2016).

La capacidad del polímero para inhibir o retrasar la precipitación se monitorea mediante la técnica de turbidimetría; la cual se basa en la medición de la intensidad de luz transmitida debido al efecto de dispersión de las partículas suspendidas en el medio. Dicho monitoreo se realiza mediante la cuantificación del espectro en la región UV-Vis en un rango de longitud de onda donde no haya absorción por parte del IFA evaluado (500-600 nm). En la

medida que existen más partículas en suspensión y que estas partículas son más grandes debido al incremento de la sobresaturación, se genera una mayor dispersión de los fotones del haz de luz y, por lo tanto, la intensidad de luz que llega al detector es menor. Esto, en el espectrofotómetro UV causa un levantamiento de la línea base en la longitud de onda en la que la luz no interactúa con la molécula del soluto (Warren et al., 2013).

### 3 JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades cerebrovasculares son una serie de complicaciones desencadenadas debido a una falta de regulación del sistema de coagulación. Según la Organización Mundial de la Salud, se encuentran dentro de las cuatro primeras enfermedades de mortalidad a nivel mundial, seguidas por enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, diabetes mellitus tipo 2 y trastornos neurológicos; siendo los países de ingresos medios y bajos, los más afectados. Este tipo de enfermedades no transmisibles representan altos índices de morbilidad a nivel nacional, con una incidencia de 8.36 por cada 100 000 habitantes (Secretaría de Salud México, 2017).

El tratamiento de estas patologías se centra en el uso de agentes anticoagulantes. En este sentido, durante décadas la warfarina y las heparinas fueron los pilares de la anticoagulación; sin embargo, este tipo de medicamentos presentan grandes complicaciones y múltiples interacciones con fármacos y alimentos. Además, se necesita un monitoreo constante sobre el grado de anticoagulación, por lo que generalmente este tipo de tratamientos se debía empezar hasta con una semana de antelación para alcanzar el efecto anticoagulante deseado.

Recientemente se ha avanzado en el desarrollo de nuevos agentes anticoagulantes, que actúen en sitios específicos en el sistema de coagulación y con una farmacocinética más predecible; lo cual permite un régimen de dosis fija en la mayoría de los pacientes sin la necesidad de un monitoreo de rutina sobre la capacidad anticoagulante. Es así como nace dabigatran etexilato (DE), el cual se comercializa como una sal de mesilato. La formulación comercial tiene alta solubilidad acuosa (1.8 mg/mL); sin embargo, es muy inestable cuando se almacena bajo diferentes condiciones de temperatura y humedad; además de que la sal de mesilato presenta un alto grado de polimorfismo. Algunas estrategias que se han abordado para la mejora de la solubilidad de DE es la obtención de Nuevas Fases Sólidas (NFS), en su mayoría sales; por lo que la obtención de un cocrystal farmacéutico sería novedoso ya que ayudaría a minimizar el efecto de polimorfismo y ayudaría a mejorar la estabilidad de la formulación.

## 4 HIPÓTESIS

Si se genera una nueva fase sólida multicomponente de dabigatrán etexilato bajo condiciones farmacéuticamente aceptables, se mejorarán las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de éste, permitiendo una mejor liberación y estabilidad de la formulación.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Generar y caracterizar una nueva fase sólida multicomponente de dabigatrán etexilato con propiedades biofarmacéuticas y farmacotécnicas mejoradas.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Implementar una metodología para la obtención y purificación de dabigatrán etexilato a partir de su sal comercial.
- ❖ Realizar estudios de caracterización física y espectroscópica para dabigatrán etexilato, tales como espectroscopía IR, RMN, calorimetría y DRXP.
- ❖ Emplear la herramienta *Full Interaction Maps* de la CSD para predecir la generación de nuevas fases sólidas (NFS), empleando dabigatrán etexilato y diversos coformadores farmacéuticamente aceptables.
- ❖ Generar la(s) posible(s) NFS resultante(s) mediante molienda mecánica asistida con gota de disolvente utilizando disolventes farmacéuticamente aceptables.
- ❖ Establecer las condiciones para el escalamiento a nivel de laboratorio de la(s) nueva(s) fase(s) sólida(s) seleccionada(s).
- ❖ Desarrollar y calificar un método de cuantificación para dabigatrán etexilato mediante una técnica espectroscópica (UV-Vis).
- ❖ Realizar estudios biofarmacéuticos de la(s) NFS resultante(s) tales como estabilidad de fase, estabilidad indicativa y disolución de polvos.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Reactivos y equipos

#### 6.1.1 Reactivos

- Sal mesilato de dabigatran etexilato (DEM), Laboratorios Senosiain S.A de C.V. Lote KKDIVPPG140004, fabricante Aurobindo Pharma LTD, India (lote 1411104709) proveedor ESIC.
- Ácido hipúrico (98%), Aldrich, CAS 495-69-2, Lote 06716TC
- Quercetina ( $\geq 95\%$ , HPLC), Aldrich, CAS 117-39-5, Lote SLBV2993
- Resorcinol (ReagentPlus, 99%), Sigma-Aldrich, CAS 108-46-3, Lote MKBC1290
- Ácido pimélico, Aldrich, CAS 111-16-0, Lote S68231V
- Ácido adípico ( $\geq 99.5\%$ , HPLC), Fluka, CAS 124-04-9, Lote 1386527
- Piridoxina ( $\geq 98\%$ ), Sigma, CAS 65-23-6, Lote STBC8995V
- Ácido subérico ( $\geq 98\%$ ), Aldrich, CAS 505-48-6, Lote MKAA0843
- Hidróxido de sodio (ACS Reagent,  $\geq 97\%$ ), Sigma Aldrich, CAS 1310-73-2, Lote MKBQ8944V
- Fosfato de potasio dibásico anhidro (ACS reagent,  $\geq 98\%$ ), Sigma-Aldrich, CAS 7758-11-4
- Fosfato de sodio monobásico anhidro (ACS reagent,  $\geq 99\%$ ), Sigma-Aldrich, CAS 7778-77-0
- Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), Viscosidad 80-120 cP, Sigma, CAS 9004-65-3, Lote MKBQ7868V
- Methocel A15
- Methocel 60HG (28-30 methoxyl basis), Sigma, CAS 9004-67-5, Lote E415924/1V
- Hydroxypropyl cellulose (HPC, 99%, Mw  $\sim 370,000$ ), Aldrich, CAS 9004-64-2, Lote MKBH7487V
- BIS-TRIS ( $\geq 98\%$ , titration), Sigma, CAS 6976-37-0, Lote SLBX0599
- Trietilamina ( $\geq 99.5\%$ ), Sigma-Aldrich, CAS 121-44-8, Lote SHBD5029V
- Metanol (99.96%, HPLC), J. T. Baker, CAS 67-56-1, Lote V01C13
- Ácido cítrico, J. T. Baker, CAS, Lote Y06C15

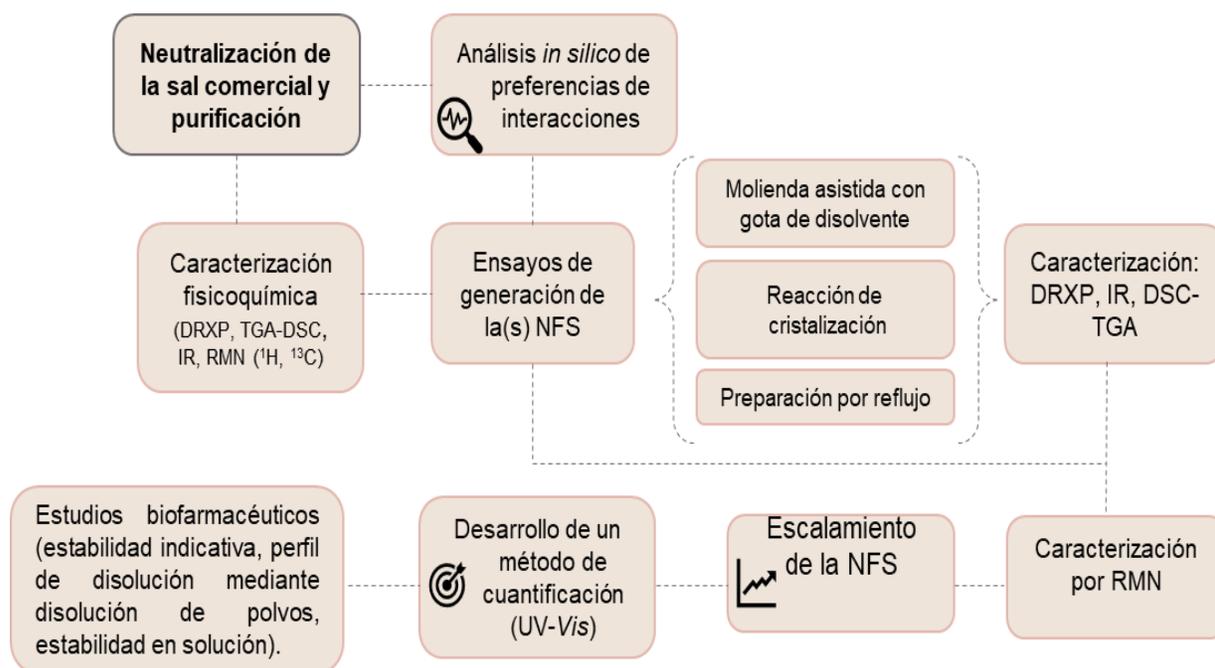
#### 6.1.2 Equipos

- Balanza analítica OHAUS Modelo Adventur Serie 10841225060407
- Molino Retsch® Modelo MM400 Serie 128210105
- Destilador y desionizador de agua Elga Purelab Modelo OptionR7BP Serie OR07D227538BP
- Difractómetro de rayos X de polvos Bruker D2 Phaser 2nd Gen con un detector de Lynx eye ( $\lambda_{\text{Cu-K}\alpha 1}$  1.54184 Å)
- Espectrofotómetro UV-Vis VARIAN Cary 50 Scan, Serie FL04043507
- Estación de reacción personalizada J-KEM® Scientific
- Potenciómetro Conductronic pH120, electrodo PG101C-BNC

- Varian Inova 400MHz (9.4 T) con sonda de detección inversa de dos canales de radiofrecuencia  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ - $^{31}\text{P}$  PFG (3mm).
- Espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier NICOLET 6700 con detector DTGS ATR
- Analizador simultáneo TGA-DSC TA Instrument SDT Q2000
- Cámaras ambientales Revco Incubator Chamber RI-23-1060-ABA, Rios Rocha Chamber E0-51 y Binder Climatic Chamber IP 20.

## 6.2 Métodos

Para el desarrollo de este proyecto se tomaron en cuenta las metodologías establecidas en el Grupo Interdisciplinario de Investigación en Química y Farmacia del Estado Sólido (CIQ-FF UAEM), tal como se muestra en el esquema de la **Figura 21**.

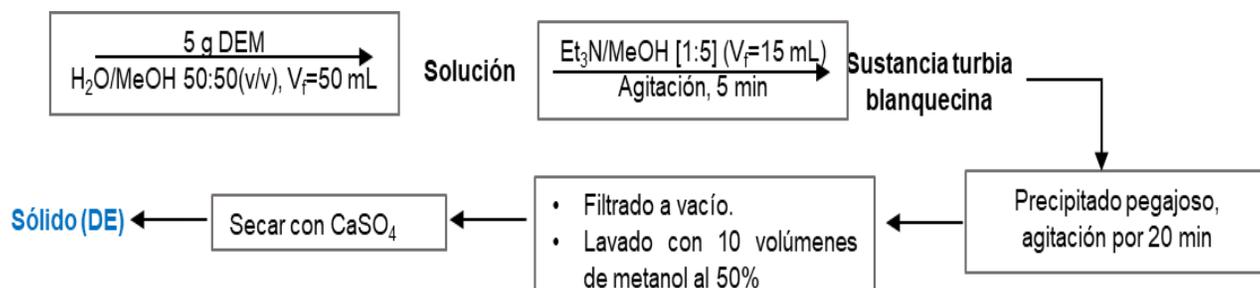


**Figura 21** Esquema general de las estrategias experimentales empleadas para el desarrollo y evaluación de la NFS del presente proyecto

### 6.2.1 Neutralización de la sal comercial mesilato de dabigatran etexilato (DEM, por sus siglas en inglés)

Se implementó una metodología para la obtención de la forma neutra de DE a partir de la sal comercial DEM. Se optó por emplear la forma neutra de DE ya que en estudios previos

se obtuvieron fases polimórficas, lo cual complicaba su desarrollo farmacéutico. La reacción de neutralización se llevó a cabo de acuerdo con la metodología de la **Figura 22**.



**Figura 22** Esquema de la neutralización de la sal comercial DEM a su base libre DE.

El sólido resultante de la reacción de neutralización se deja secar a temperatura ambiente en un frasco hermético con  $\text{CaSO}_4$  durante tres a cuatro días para su posterior caracterización.

Los sólidos de DEM y DE se caracterizaron mediante estudios físicos y espectroscópicos, tales como DRXP, espectroscopía IR, por análisis termogravimétricos; así como por RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$ . También se realizaron análisis espectroscópicos por RMN 2D (HSQC, HMBC, COSY y NOESY) para DE.

### 6.2.2 Rastreo *in silico* de la búsqueda de NFS a partir de DE

Se empleó la herramienta *Full Interaction Maps* de la base de datos cristalográficos de Cambridge (CSD) para realizar un rastreo de las preferencias de interacciones entre DE y diversos coformadores para la generación de una NFS. Tomando en cuenta la regla de la diferencia de  $\Delta\text{p}K_a$  entre el fármaco y el coformador ( $\Delta\text{p}K_a = \text{p}K_{a\text{BaseH}^+} - \text{p}K_{a\text{Ácido}}$ ) se puede establecer la preferencia en la formación de un cocrystal o una sal según estudios reportados por Cruz Cabeza (Cruz-Cabeza, 2012). Por ejemplo, si la diferencia de  $\Delta\text{p}K_a$  es  $\leq -1$  existe un 99% de probabilidad de formación de un cocrystal, mientras que si  $\Delta\text{p}K_a$  se encuentra entre -1 y 4, existe un 40% de probabilidad de formación de un cocrystal y un 60% de probabilidad de formación de una sal, tal como se muestra en la **Tabla 5**.

**Tabla 5** Número de estructuras cristalinas y porcentajes de AB (cocrystal) y A·B<sup>+</sup> (sal) dentro de las tres diferentes zonas de  $\Delta pK_a$  (Cruz-Cabeza, 2012)

Zona	$\Delta pK_a$	AB	A·B <sup>+</sup>
1	<-1	2076 (99.1%)	18 (0.9%)
2	[-1, 4]	495 (40.7%)	720 (59.3%)
3	>4	26 (0.8%)	3130 (99.2%)

### 6.2.3 Síntesis de la NFS DE-HA

De acuerdo con los resultados obtenidos del rastreo *in silico*, se realizaron ensayos de la síntesis para la obtención de una NFS mediante molienda mecanoquímica asistida con gota de disolvente (SDG). Se colocaron cantidades estequiométricas de DE y ácido hipúrico (HA) en contenedores de acero inoxidable del molino Retsch M400. Se colocó también una posta de acero inoxidable y se agregaron 15  $\mu$ L de acetona. La síntesis se realizó para obtener una cantidad final de 50 mg de mezcla física al transcurrir 15 minutos a una frecuencia de 20 Hz.

Se exploraron también otras rutas de síntesis para la obtención de una NFS con HA. Se emplearon métodos en solución, tales como reacción de cristalización (RxC) con acetonitrilo, obteniéndose una NFS pura diferente a la antes mencionada, a la cual se le corroboró su composición estequiométrica mediante RMN de <sup>1</sup>H. Esta NFS se caracterizó mediante DRXP, espectroscopia IR, DCS, TGA y RMN CP-MAS (<sup>13</sup>C), ver sección 7.1.

### 6.2.4 Escalamiento de la NFS DE-HA (1:1)

El escalamiento de la NFS se llevó a cabo mediante molienda mecanoquímica asistida con gota de disolvente (SDG). Se colocaron cantidades equimolares de DE y HA en contenedores de acero inoxidable del molino Retsch M400. La síntesis se realizó para obtener una cantidad final de 2 g (1 g en cada contenedor) de mezcla física (DE y HA) durante un tiempo total de reacción de 60 minutos, divididos en cuatro ciclos de 15 minutos y a una frecuencia de 25 Hz. Antes de iniciar la reacción de síntesis se colocó una posta de acero inoxidable (la cual fue retirada al finalizar dicha reacción) y se agregaron 150  $\mu$ L de acetona en los primeros tres ciclos. El sólido resultante se caracterizó mediante DRXP, espectroscopia IR, DCS, TGA, y RMN en solución (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C).

## **6.2.5 Caracterización física y espectroscópica de materias primas y de la NFS (DE:HA 1:1)**

### **6.2.5.1 Espectros de absorción por UV-Vis**

Los espectros de absorción UV-Vis fueron obtenidos en un espectrofotómetro marca VARIAN Cary 50 Scan en un rango de longitud de onda de 200 a 500 nm y a temperatura ambiente. Se empleó una celda de cuarzo con paso óptico de 10 mm. Los sólidos de interés se disolvieron en buffer de BIS-TRIS a pH 6.

### **6.2.5.2 Difracción de rayos x de polvos (DRXP)**

Las materias primas, así como la NFS obtenida por el escalamiento mediante SDG se caracterizaron mediante DRXP. Se utilizó un difractómetro Bruker D2 Phaser 2nd Gen con un detector LynxEye (1D mode, con un tubo de Cu  $\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$ ). Se colectaron los datos a temperatura ambiente en un rango de  $2\theta = 5-45^\circ$  con giro durante 15 minutos.

### **6.2.5.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Los análisis por DSC se llevaron a cabo en un equipo TA Instruments SDT Q2000 (Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana). Se emplearon aproximadamente 3 mg de muestra sólida, la cual se colocó en charolas de aluminio. El análisis se realizó en un intervalo de temperatura de 25 a 450°C, con una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Se empleó N<sub>2</sub> como gas inerte de purga en un flujo de 50 mL/min.

### **6.2.5.4 Análisis Termogravimétrico (TGA)**

Las mediciones se llevaron a cabo en un equipo TA Instruments TGA Q50 (Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana). Se usaron aproximadamente 3 mg de muestra sólida, la cual se colocó en charolas de aluminio. La muestra se analizó en un intervalo de temperatura de 25-450°C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Se empleó N<sub>2</sub> como gas inerte de purga en un flujo de 50 mL/min.

### **6.2.5.5 Espectroscopía de Infrarrojo (IR)**

Los espectros de IR de DEM, DE, HA y la NFS fueron obtenidos en un espectrofotómetro de infrarrojo FT-IR Nicolet 6700 Thermo Scientific en un intervalo de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup> empleando un accesorio de ATR con sonda de diamante.

#### **6.2.5.6 Espectroscopía por RMN 1D ( $^{13}\text{C}$ y $^1\text{H}$ ) y 2D (COSY, NOESY, HMBC y HSQC)**

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de DEM, DE, HA y la NFS se colectaron en un espectrómetro Varian Inova 400MHz (9.4 T) con sonda de detección inversa de dos canales de radiofrecuencia  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ - $^{31}\text{P}$  PFG (3mm). Para la caracterización por RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  se empleó una concentración de 0.1 M del sólido de interés disuelto en DMSO- $d_6$ . Los análisis se llevaron a cabo a 400 MHz para la RMN de  $^1\text{H}$  y a 100 MHz para la RMN de  $^{13}\text{C}$ . Se tomaron como referencia las señales del disolvente.

La asignación completa para DE se realizó mediante técnicas de correlación 2D como HSQC, HMBC, COSY y NOESY. Los datos recolectados se expresarán como desplazamientos químicos ( $\delta$ ) en ppm.

#### **6.2.5.7 Espectroscopía por RMN $^{13}\text{C}$ de sólidos ( $^{13}\text{C}$ CP-MAS)**

Los espectros de resonancia de sólidos fueron colectados en un espectrometro Bruker AVANCE III HD 500MHz (11.74T, 125 MHz para núcleos de  $^{13}\text{C}$ ) con sonda multinuclear  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ - $^{31}\text{P}$  CP-MAS para rotores de 4mm y una velocidad de rotación de muestra de máximo 15 kHz. Los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  CP-MAS fueron referenciados con los desplazamientos químicos del adamantano.

### **6.2.6 Preparación de soluciones**

#### **6.2.6.1 Solución de ácido clorhídrico (HCl) pH 1.2**

A 850 mL de agua desionizada se agregaron 6.2 mL de HCl (con un contenido de 37.25% de HCl), dicha solución se mantuvo en agitación a  $T_{\text{amb}}$ . Se ajustó el pH a 1.2 con un potenciómetro. Se usó NaOH [0.2M] como solución de ajuste. La solución se aforó a 1L con agua desionizada.

#### **6.2.6.2 Buffer de acetatos pH 4.5 [0.1M]**

En 850 mL de agua desionizada se disolvieron 2.578 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  anhidro y 32.001 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anhidro, dicha solución se mantuvo en agitación a  $T_{\text{amb}}$  hasta obtener una solución homogénea. El pH fue ajustado a 4.5 con NaOH [0.2M], posteriormente la solución se aforó a 1L con agua desionizada.

### **6.2.6.3 Buffer de fosfatos pH 6 [0.1M]**

En 850 mL de agua desionizada se disolvieron 2.578g de  $K_2HPO_4$  y 32.001g de  $KH_2PO_4$ , dicha solución se mantuvo en agitación a  $T_{amb}$  hasta obtener una solución homogénea. El pH fue ajustado a 6 con NaOH [0.2M]. Seguido de esto se aforó a 1L.

### **6.2.6.4 Buffer de BIS-TRIS pH 6 [0.074M]**

A 950 mL de agua desionizada se agregaron 15.53 g de BIS-TRIS, dicha solución se mantuvo en agitación a  $T_{amb}$ . Se ajustó el pH a 6 con HCl concentrado y la solución se aforó a 1L con agua desionizada.

## **6.2.7 Método para la cuantificación de DE por UV-Vis**

Se estableció en el laboratorio un método analítico confiable de cuantificación mediante espectroscopía UV-Vis que permitiera determinar a DE en solución de las muestras provenientes de los estudios de disolución. Se tomaron en cuenta los parámetros de desempeño establecidos en la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A. C. Se evaluaron los parámetros de linealidad, precisión, límite de detección y cuantificación; dichos parámetros también se encuentran establecidos en la NOM-177-SSA1-2013 (SSA, 2013) que hace referencia al establecimiento de un método analítico para cuantificar el o los fármacos disueltos.

Inicialmente se preparó una solución stock de 6.5 mg de DE que fueron disueltos en 5 mL de metanol y llevando al aforo a 10 mL con buffer de BIS-TRIS, seguido de esto se procedió a realizar la medición de los puntos de la curva de calibración.

Para evaluar la linealidad del sistema se preparó una curva de calibración con cinco niveles de concentración, los cuales fueron: 0.65, 1.3, 6.5, 13 y 26  $\mu\text{g/mL}$ . Con los resultados provenientes de la linealidad del sistema también se evaluaron los parámetros de precisión y exactitud, así como los límites de detección y de cuantificación.

La selectividad del método se demostró mediante un barrido de absorción por espectroscopía UV-Vis. Para ello se observó que el máximo de absorción molar para DE disuelto en BIS-TRIS se da a 336 nm.

## **6.2.8 Caracterización biofarmacéutica**

### **6.2.8.1 Estabilidad de fase en solución**

En viales de 4 mL se colocaron 45 mg de DEM, 35 mg de DE, 30 mg de HA y 25 mg de la NFS, a los cuales se le adicionaron 2 mL de medio (solución de HCl pH 1.2, buffer de acetatos pH 4.5 [0.1M] y buffer de fosfatos pH 6 [0.1M]). Se emplearon estas cantidades de sólido para asegurar la presencia en exceso de este para su posterior análisis por DRXP.

La estabilidad de fase se monitoreó en tres condiciones de pH, las cuales fueron solución de HCl pH 1.2 [0.063M], buffer de acetatos pH 4.5 [0.1M] y buffer de fosfatos pH 6 [0.1M]. A los 5 minutos y a las 24 h de agitación a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  se tomó una muestra que fue filtrada a través de un papel filtro Watman #3 en un porta filtro Swinex. El sólido recuperado se dejó secar a  $T_{\text{amb}}$  para su posterior análisis por DRXP.

### **6.2.8.2 Estabilidad indicativa**

Se pesaron 30 mg de las materias primas y la NFS por duplicado, y se colocaron en viales de 4 mL, los cuales fueron expuestos por un mes a diversas condiciones de almacenamiento en una incubadora con temperatura y humedad controlada en las instalaciones de Laboratorios Senosiain S.A. de C.V. Las condiciones evaluadas concuerdan con las recomendaciones de la NOM-073-SSA1-2015 (SSA, 2016), las cuales fueron:

- a)  $40^{\circ}\text{C}$  calor seco (0% HR) en cámara Revco Incubator Chamber RI-23-1060-ABA,
- b)  $50^{\circ}\text{C}$  calor seco (0% HR) en cámara Rios Rocha Chamber E0-51, y
- c)  $40^{\circ}\text{C}$  con 75% de humedad relativa en cámara Binder Climatic Chamber IP 20.

Las muestras se analizaron por DRXP para evaluar la estabilidad de fase. Aquellas que fueron inestables (DE y DE-HA) se analizaron además por RMN en solución ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) para evaluar su integridad química.

### **6.2.8.3 Selección de polímeros inhibidores de la precipitación mediante la técnica de *solvent shift***

Para seleccionar al mejor polímero candidato como inhibidor de la precipitación se emplearon ocho polímeros de uso farmacéutico (HPMC 10 000 - 15 000 g/mol, Methocel A15, Kollidon 30, Kollidon VA64, Kolliphor P188, Lutrol micro 127, Methocel 60HG y HPC

80 000) y un solubilizante (Gelucire 48/16), los cuales se pre disolvieron en medio BIS-TRIS pH 6 [0.074M] en una concentración de 0.5% p/v.

Se preparó una solución stock de 5.25 mg/mL, concentración de DE en DMSO. En una celda de cuarzo de paso óptico de 10 mm se colocaron 2.5 mL de medio BIS-TRIS pH 6 [0.074M] con y sin polímero; se fueron adicionando alícuotas de 10  $\mu$ L de la solución stock de DE antes mencionada. Entre la adición de cada alícuota, el contenido de la celda de mantuvo en agitación durante 5 minutos a 800 rpm, y se procedió a monitorear la absorbancia de cada muestra mediante espectroscopía UV-Vis a 500 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado, y este culmina cuando se observa cierto grado de turbidez en la solución de la celda y a su vez cuando se observa un levantamiento de la línea base del espectro UV. En la **Figura 23** se muestra un esquema general de la técnica de *solvent shift* (M. Sun et al., 2016).



**Figura 23.** Esquema general de la técnica de *solvent shift*, se empleó BIS-TRIS como medio con o sin polímero.

#### 6.2.8.4 Disolución de polvos

Las pruebas de disolución de polvos se llevaron a cabo por triplicado en el medio de disolución BIS-TRIS (con o sin polímero HPMC al 0.5 p/v) a pH 6 en un mini reactor personalizado *J-KEM Scientific*, a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  y  $\sim 90$  rpm. Para dicho experimento se utilizaron dos tubos de vidrio de 50 mL, en el primero se colocó un agitador magnético (12 mm x 7 mm) y se adicionaron 10 mL de buffer BIS-TRIS pH 6. El segundo tubo contenía 10 mL del buffer atemperado; que sirvió como medio de reposición. La prueba da inicio al agregar 200 mg del sólido de interés (DEM, DE, NFS o MF, previamente molido y tamizado, en un mortero de ágata y pasado por una malla N<sup>o</sup> 100 (180  $\mu$ m)) al primer tubo con medio en agitación. Posteriormente se tomaron muestras de 1 mL de una cánula (15 cm de largo

y calibre 14) a los 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 20, 30, 40, 50, 60 y 90 min; este volumen se reemplazó con 1 mL de medio fresco.

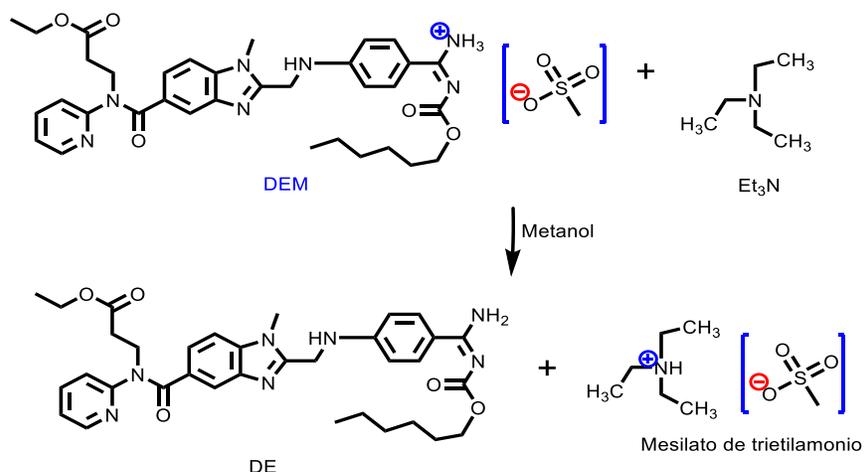
Cada muestra se filtró con ayuda de un porta filtro Swinnex con papel filtro Whatman grado 3. La concentración disuelta se cuantificó por espectroscopía UV-Vis a 336 nm; previo a la cuantificación, las muestras provenientes de la disolución de polvos del NFS se diluyeron con metanol: a 600  $\mu\text{L}$  de muestra se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de metanol. El sólido recuperado del filtrado se dejó secar a  $T_{\text{amb}}$  para analizar su estabilidad de fase mediante DRXP. De igual manera, las muestras provenientes de la disolución de polvos de DE y del NFS cuando se empleó polímero, se diluyeron con metanol (500  $\mu\text{L}$  de muestra en 2000  $\mu\text{L}$  de metanol).

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Síntesis y caracterización de Dabigatrán Etxilato (DE) a partir de la sal comercial Mesilato de Dabigatrán Etxilato (DEM)

En un estudio previo dentro de nuestro grupo de investigación, se exploró la formación de NFS a partir de la sal comercial de Mesilato de Dabigatrán Etxilato (DEM). En esa investigación se obtuvieron sólidos amorfos e higroscópicos, lo que dificultó su manejo y caracterización. En el presente trabajo optamos por investigar la formación de NFS a partir de la forma neutra de Dabigatrán Etxilato (DE), la cual presenta varios grupos funcionales aptos (tales como el grupo amino primario y secundario, ésteres, piridina, benzimidazol y carbonilo) para la posible formación de sólidos multicomponentes a través de enlaces de hidrógeno.

En la **Figura 24** se muestra la reacción química efectuada para la neutralización de la sal comercial DEM hacia la forma neutra DE. La sal DEM presenta una especie catiónica con un  $pK_a$  de 6.7, por lo que DEM (5 g, 6.9 mmoles) disuelto en una mezcla 1:1 (v/v) H<sub>2</sub>O:MeOH (50 mL) se hizo reaccionar con una solución metanólica de trietilamina (Et<sub>3</sub>N [5:1],  $pK_a$  10.7) para obtener a DE como un precipitado blanquecino, el cual se separa mediante filtración al vacío, que finalmente es lavado con 10 volúmenes de la mezcla hidroalcohólica inicial. El procedimiento se optimizó para obtener rendimientos superiores al 84% cuando por cada equivalente químico de sal comercial DEM se emplearon tres equivalentes químicos de trietilamina.



**Figura 24** Reacción de neutralización de la sal comercial DEM a DE, su base neutra.

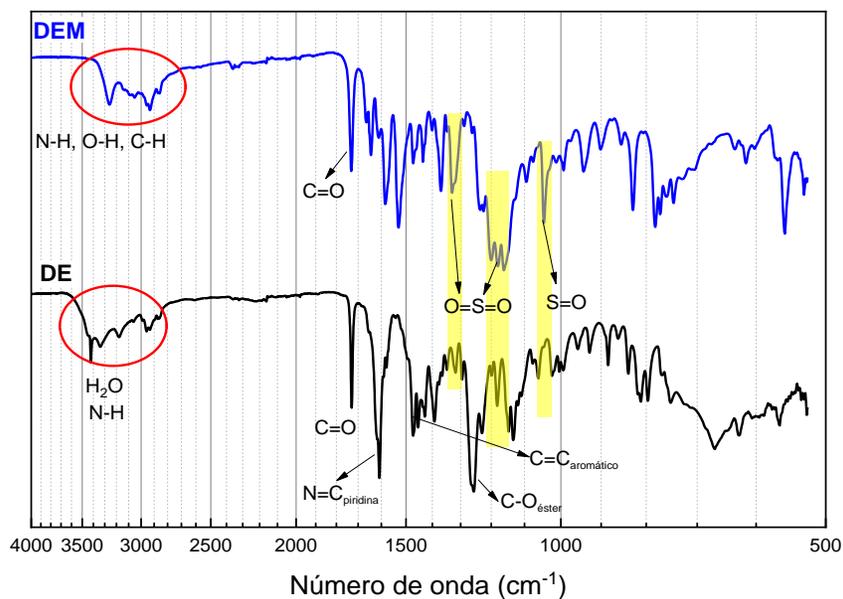
El sólido resultante de la neutralización de DEM se dejó secar en  $\text{CaSO}_4$ ; fue notable que entre cada uno de los lotes obtenidos el grado de hidratación del sólido no fue constante, como se describe en la caracterización física y espectroscópica (*vide infra*).

### 7.1.1 Caracterización por espectroscopía IR

La espectroscopía IR es una técnica ampliamente utilizada en la caracterización de sólidos, ya que ayuda a identificar grupos funcionales presentes en una molécula y permite identificar cambios en su ambiente químico debido a la incorporación de otros componentes en la estructura cristalina. Por lo tanto, ha mostrado ser útil para caracterizar a sales y cocristales (Shaikh, et al, 2018). En la **Figura 25** se muestran los espectros IR de los sólidos DEM y DE. En el espectro de DEM se muestran en amarillo las bandas correspondientes a los estiramientos simétricos y asimétricos del sulfóxido ( $1320\text{ cm}^{-1}$ , y  $1201\text{-}1152\text{ cm}^{-1}$ ; respectivamente), así como el estiramiento de  $\text{S}=\text{O}$  en  $1043\text{ cm}^{-1}$ . Estas bandas son debidas a la presencia del ión mesilato en la estructura de la sal (Cai et al., 2016). También en  $1730\text{ cm}^{-1}$  se observa el estiramiento característico del carbonilo, no se asocia con certeza a un carbonilo en específico, ya que DE cuenta con tres grupos diferentes de este.

Por su parte, el espectro de DE se observa significativamente diferente al de la sal. Por ejemplo, se observa una banda en  $3421\text{ cm}^{-1}$  atribuido a la vibración de  $\text{O-H}$  de las moléculas de agua incorporadas en la red cristalina. La banda de intensidad media en  $1726\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la vibración del ester del carbamato se observa en el espectro de DEM. Es evidente que las bandas correspondientes al mesilato en DEM se encuentran ausentes en la fase neutra. De igual manera en  $1260\text{ cm}^{-1}$  se observa otra banda muy pronunciada que corresponde a las vibraciones de estiramiento de  $\text{C-O}$  de ambos ésteres alifáticos en DE, la cual se encuentra ausente en DEM. En  $1603\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda muy marcada que corresponde al estiramiento del  $\text{C}=\text{N}$  de la piridina. En un rango de  $1474\text{-}1461\text{ cm}^{-1}$  se observan las vibraciones típicas del estiramiento de los esqueletos de los anillos aromáticos.

Este análisis indica que la neutralización se llevó a cabo de forma exitosa, y que este cambio se puede monitorear por IR.



**Figura 25** Espectros IR de DEM (superior) y DE (inferior). Se señalan las bandas de los grupos funcionales relevantes.

En la **Tabla 6** se muestran las bandas de los grupos funcionales relevantes en las estructuras de DEM y de DE.

**Tabla 6** Bandas relevantes en el espectro IR de DEM y DE (Cai et al., 2016; Solanki et al., 2018a)

Asignación	DEM (cm <sup>-1</sup> )	DE (cm <sup>-1</sup> )	Modo de vibración (Stuart B., 2004)
-O-H/N-H	3264-2925	3429-2947	Estiramiento
C=O	1730	1726	Estiramiento
-C=C Aromático	1523	1465	Estiramiento
-C-N Alifático	1091	1128	Estiramiento
-SO <sub>2</sub>	1320	-	Estiramiento asimétrico
-SO <sub>2</sub>	1201-1152	-	Estiramiento simétrico
S=O	1043	-	Estiramiento
C=C	1474-1461	1470-1440	Vibraciones de estiramiento del esqueleto del benceno
C=N Piridina	1579	1603	Estiramiento
-C-O Alifático	1234	1256	Estiramiento
C-H	781	793	Doblamiento fuera del plano
N-H	703	668	Flexión fuera del plano

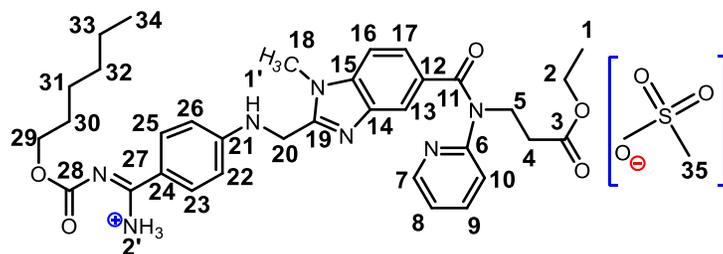
## 7.1.2 Caracterización por espectroscopía de RMN en solución

### ❖ RMN de $^1\text{H}$

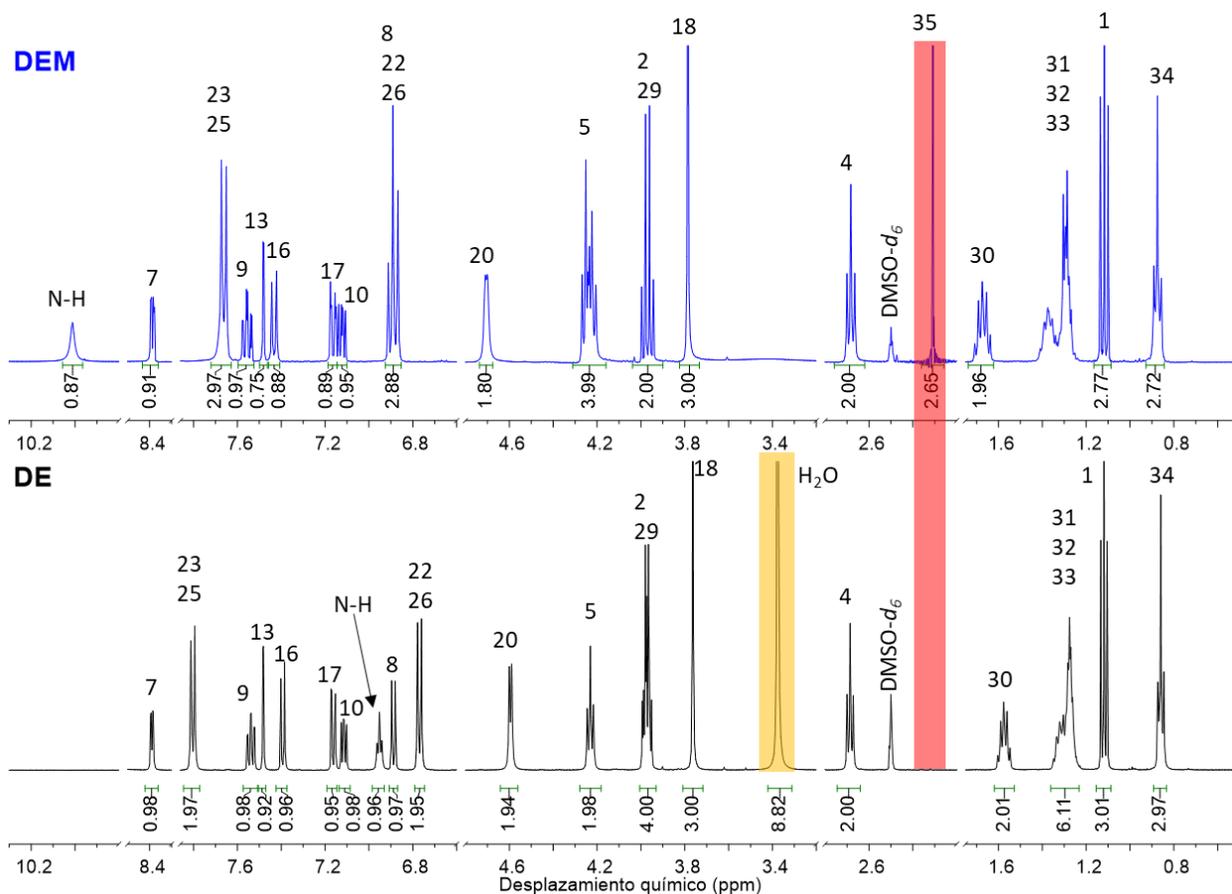
En la **Figura 27** se muestran los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  correspondientes a DEM y a DE en  $\text{DMSO-}d_6$ . La asignación para DEM se realizó considerando reportes previos en la literatura (Cai et al., 2016; Huel et al., 2002; Solanki et al., 2018b). La asignación de las señales se realizó de acuerdo con la numeración de los carbonos de la molécula de DEM que se ilustra en la **Figura 26**.

En ambas zonas (aromática y alifática) del espectro de protón se observan señales múltiples para la sal DEM y la fase neutra DE. En la zona alifática aparecen los protones de los sustituyentes del grupo etilo (1-2) y hexilo (29-34) del éster y el carbamato, respectivamente. También se observan los grupos metileno (4, 5 y 20) y el metilo unido al nitrógeno del anillo de bencimidazol (C18). En el espectro de la sal DEM, destaca una señal singulete en 2.30 ppm (sección en rojo de la **Figura 27**) que integra para cerca de 3 protones, y corresponde al grupo metilo del ion mesilato. La ausencia de esta señal en DE corrobora que la reacción de neutralización se realizó en forma completa. Por otro lado, en el espectro de DE se observa un singulete en 3.37 ppm (sección en amarillo de la **Figura 27**) el cual corresponde al agua presente en el producto de la neutralización, y que también se observó por TGA-DSC (ver sección 7.1.3).

Por otra parte, en la región de los protones aromáticos se observan las señales correspondientes al anillo de piridilo (7-10), de bencimidazol (13, 16 y 17) y del fenilo 1,4-disustituido (22, 23, 25 y 26). Cabe destacar que los desplazamientos químicos de los protones en los grupos piridilo y bencimidazol no presentan modificaciones debidas al cambio en el estado de carga de la molécula, mientras que los protones en el fenilo presentan corrimientos debido a que se encuentran más cerca del sitio de protonación (ver **Figura 27**). Una diferencia importante entre la sal DEM y la fase neutra DE es la aparición de una señal ancha a campo bajo ( $\delta$  10 ppm), que corresponde al grupo alquilamonio del residuo que se protona, y que seguramente en la forma neutra tiene un desplazamiento diferente.



**Figura 26** Numeración de los núcleos de carbono en DEM para su análisis por RMN  $^1\text{H}$ . Se toma en cuenta la misma numeración para la fase neutra DE.



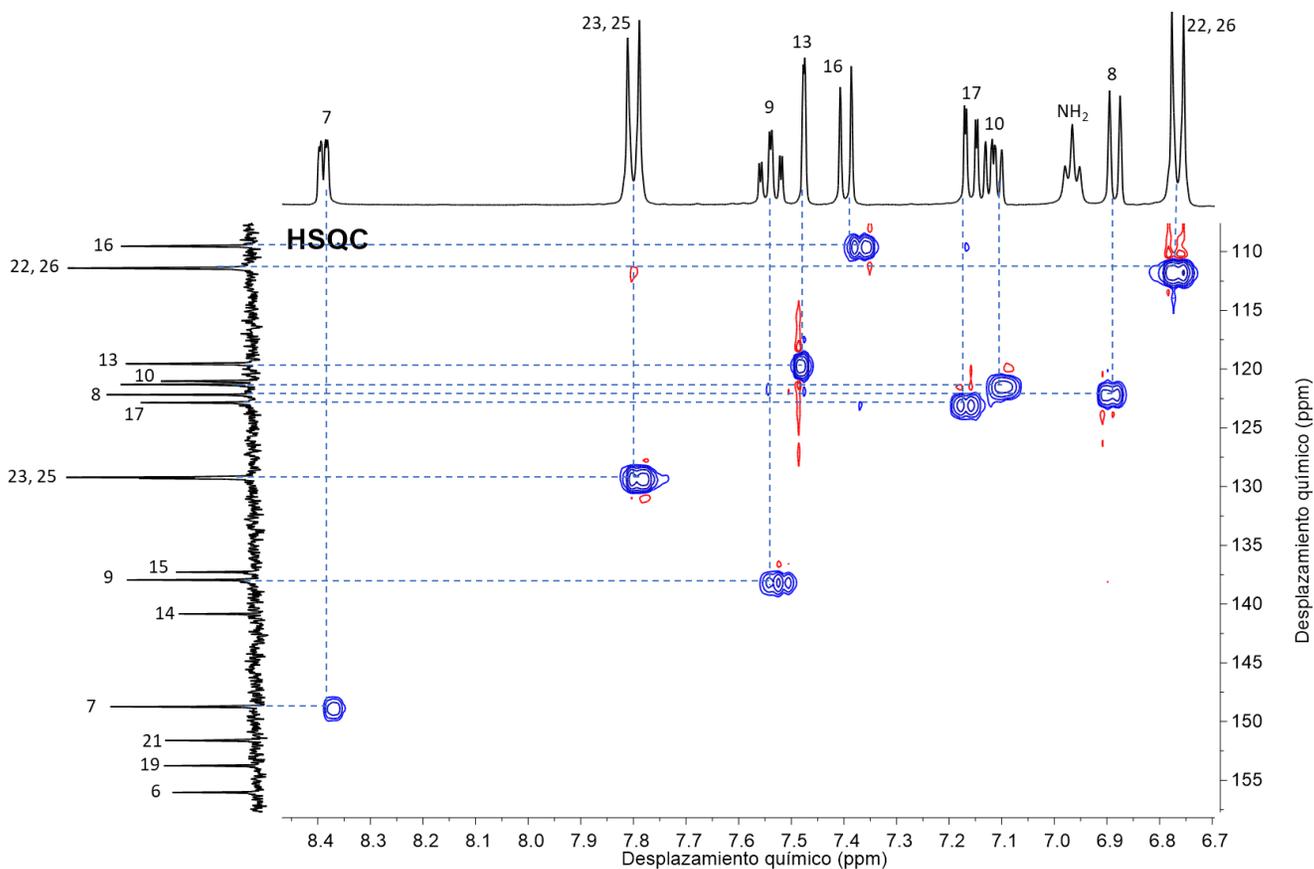
**Figura 27** Comparación de los espectros parciales de RMN- $^1\text{H}$  para DEM y DE en DMSO- $d_6$  a 400 MHz

### ❖ RMN $^{13}\text{C}$

Para realizar la asignación completa de las señales de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , para DE se recurrió al análisis bidimensional a través de las técnicas COSY, HSQC, HMBC y NOESY, las cuales

permiten establecer la correlación homo- y heteronuclear entre átomos vecinos a dos o tres enlaces a través del espacio. Los espectros bidimensionales aparecen en el **Anexo 2**.

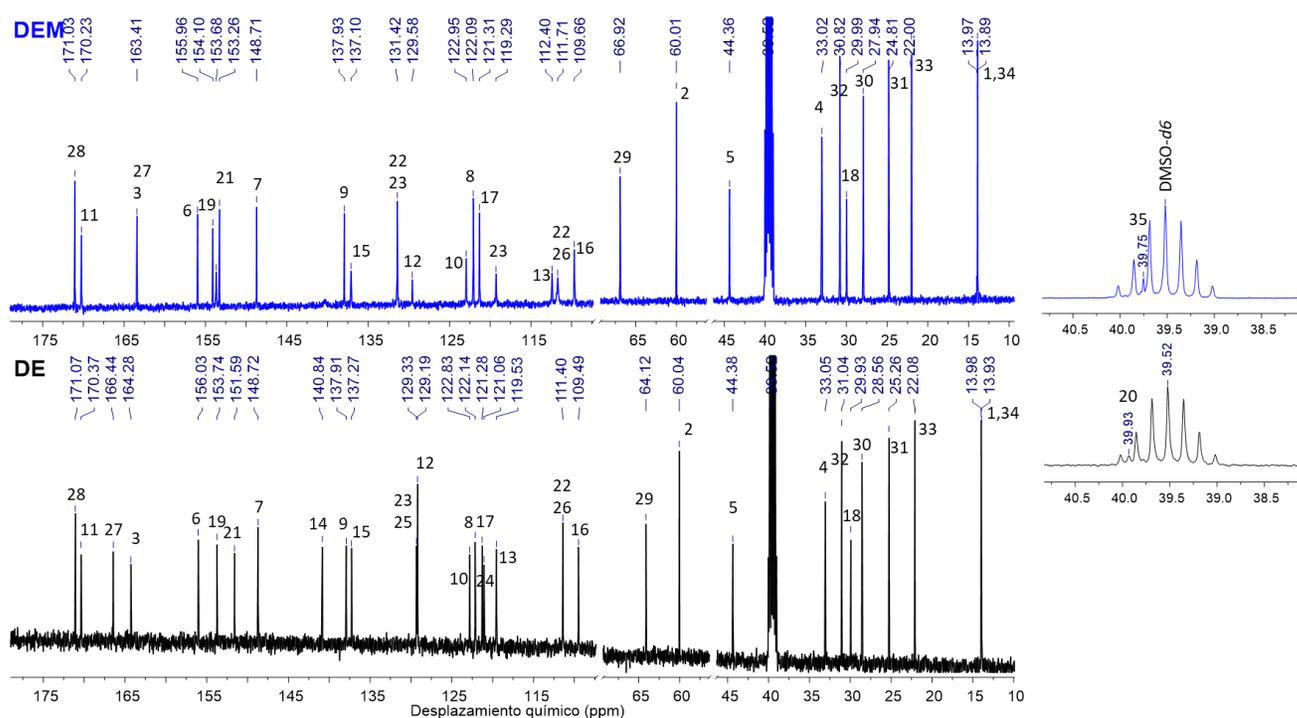
En esta sección se describirá el espectro parcial de correlación heteronuclear HSQC de la parte aromática de DE. Esta técnica se utiliza para correlacionar el desplazamiento químico de protones con el desplazamiento químico de RMN  $^{13}\text{C}$  que se encuentran unidos directamente a través del acoplamiento  $^1J_{\text{CH}}$  (Szakács & Sánta, 2015). En la **Figura 28** se muestra el espectro parcial de la zona de los núcleos aromáticos de la correlación heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Se logran distinguir las señales dobles características de los protones de un anillo aromático en 6.76 y 7.79 ppm, las cuales se acoplan a los carbonos 23 y 25 en 111.37 y 129.06 ppm del anillo aromático unido a amida del éster carbamato. Señales similares se observan en 6.89 y 7.39 ppm que acoplan con los carbonos 8 (del anillo de la piridina) y 16 (del anillo benzimidazol), respectivamente. Las señales de los carbonos 10 (122.09 ppm) y 17 (122.71 ppm) de los anillos aromáticos previamente descritos acoplan con los protones en 7.10 y 7.16 ppm, respectivamente. En 8.39 ppm se observa una señal doblete que corresponde al protón de carbono en 148.69 ppm. Dichos núcleos se observan desplazados hacia mayores ppm debido a su cercanía con el N de la piridina, que, al ser un núcleo electronegativo, desprotege a sus átomos vecinos, desplazándolos hacia campo bajo. Finalmente, en 6.97 ppm se observa un triplete que no acopla a ningún carbono, la cual corresponde a la amina secundaria unida al anillo aromático del éster carbamato.



**Figura 28** Espectro parcial en 2D de la zona aromática de la molécula DE, correlación heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )

Tomando en cuenta estos resultados obtenidos para DE, se realizó una correlación en la asignación de los núcleos para DEM. En la **Figura 29** se muestran los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  correspondientes a la sal DEM y a la fase neutra DE. En la región de los núcleos alifáticos se observa que los metilos de los carbonos 1 y 34 aparecen prácticamente con el mismo desplazamiento químico en 13.9 ppm. Los metilenos de los grupos etilo (2) y hexilo (29-33) del éster y el carbamato, respectivamente, aparecen de manera sucesiva con desplazamientos químicos a campo bajo dependiendo de su cercanía al heteroátomo. También se observan los grupos metileno (4, 5 y 20), así como el metilo (18) unido al nitrógeno del anillo de bencimidazol. Como se había indicado antes, en el espectro de protón se muestra una señal intensa como singulete en 3.36 ppm, y con la batería de técnicas de RMN en 2D se determinó que no acopla a ningún carbono, corroborando que dicha señal pertenece a los protones del agua presente en la molécula de DE. Con los resultados de 2D se determinó que el carbono 20 en DE aparece en 39.93 ppm, el cual no se logró determinar en DEM. En esa misma región y con la confirmación del dato en la

literatura se encontró que el carbono 35 del anión mesilato se observa en 39.75, el cual está ausente en DE (ver ampliación de la Figura 29). En 148.72, 122.14, 137.27, 122.95 y en 156.03 ppm se muestran los núcleos de carbono de la piridina (C7, C8, C9, C10 y C6, respectivamente). Se logra observar también la señal del C14 del bencimidazol en DE sale en 140.84 ppm; sin embargo, esta no se observa en el espectro de DEM. De igual manera, mientras que las señales del C3 y C27 en DE salen en 164.28 y 166.44 ppm, respectivamente, en DEM es evidente que las dos salen en 163.41 ppm. En general es fácil correlacionar las señales correspondientes a los carbonos de los extremos de la molécula entre ambos sólidos; sin embargo, la zona entre 110-160 ppm sufre diferentes desplazamientos en DEM, ya que es donde se da la protonación de DEM para formar la sal con ácido metansulfónico, lo cual dificulta su correcta asignación.



**Figura 29** Espectros parciales de RMN- $^{13}\text{C}$  para DEM y DE en DMSO- $d_6$  a 100 MHz

Con estas técnicas espectroscópicas se tiene evidencia que se obtuvo a DE en su forma neutra, y se muestra la integridad química de la molécula. La asignación completa por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para DE y la correlación para la asignación de DEM se resume en la **Tabla 7**.

**Tabla 7** Desplazamientos químicos ( $\delta$  ppm) para DEM y DE provenientes de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$

DEM				DE			
#C	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	Tipo de protón	$^1\text{H}$ $\delta$ ppm (J en Hz)	#C	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	Tipo de protón	$^1\text{H}$ $\delta$ ppm (J en Hz)
1	13.89	CH <sub>3</sub>	1.12 (t, 7.1)	1	13.97	CH <sub>3</sub>	1.12 (t, 7.1)
2	60.01	CH <sub>2</sub>	3.97 (q, 7.1)	2	60.04	CH <sub>2</sub>	3.97 (m)
3	163.41*	-	-	3	164.28	-	-
4	33.02	CH <sub>2</sub>	2.68 (t, 7.1)	4	33.05	CH <sub>2</sub>	2.68 (t, 7.1)
5	44.36	CH <sub>2</sub>	4.23 (t, 6.8)	5	44.38	CH <sub>2</sub>	4.23 (t, 7.1)
6	155.96	-	-	6	156.03	-	-
7	148.71	CH	8.39 (dd, 4.9, 1.9)	7	148.72	CH	8.39 (dd, 4.9, 1.4)
8	119.29	CH	6.89 (dd, 7.2, 5.1)	8	119.53	CH	6.89(dd, 7.0, 5.2)
9	131.42	CH	7.56 (td, 7.8, 2.0)	9	137.91	CH	7.54 (td, 7.8, 1.9)
10	122.95	CH	7.126.89 (t, 8.8)	10	122.83	CH	7.12 6.89 (d, 8.0)
11	170.23	-	-	11	170.37	-	-
12	129.58*	-	-	12	129.19*	-	-
13	119.29	CH	7.48 (d, 1.5)	13	119.53	CH	7.48 (d, 1.2)
14	N/D	-	-	14	140.84*	-	-
15	137.10	-	-	15	137.27	-	-
16	109.66	CH	7.43 (d, 8.5)	16	109.49	CH	7.40 (d, 8.4)
17	122.09	CH	7.16 (dd, 8.5, 1.5)	17	122.14	CH	7.16 (dd, 8.4, 1.5)
18	29.99	CH <sub>3</sub>	3.79 (s)	18	29.93	CH <sub>3</sub>	3.76 (s)
19	154.10	-	-	19	153.74	-	-
20	N/D	CH <sub>2</sub>	4.71 (d, 3.7)	20	39.93	CH <sub>2</sub>	4.59 (d, 5.5)
21	153.68*	-	-	21	151.59*	-	-
22	111.71	CH	6.89 (t, 8.8)	22	111.40	CH	6.77 (d, 8.9)
23	131.42	CH	7.66 (d, 9.0)	23	129.31	CH	7.80 (d, 8.8)
24	119.29*	-	-	24	121.06*	-	-
25	131.42	CH	7.66 (d, 9.0)	25	129.31	CH	7.80 (d, 8.8)
26	112.40	CH	6.89 (t, 8.8)	26	111.40	CH	6.77 (d, 8.9)
27	163.41*	-	-	27	166.44	-	-
28	171.02	-	-	28	171.07	-	-
29	66.92	CH <sub>2</sub>	3.97 (m)	29	64.12	CH <sub>2</sub>	3.97 (m)
30	27.94	CH <sub>2</sub>	1.67 (m)	30	28.56	CH <sub>2</sub>	1.57 (m)
31	24.81	CH <sub>2</sub>	1.33 (m)	31	25.26	CH <sub>2</sub>	1.28 (m)
32	30.82	CH <sub>2</sub>	1.33 (m)	32	31.04	CH <sub>2</sub>	1.28 (m)
33	22.00	CH <sub>2</sub>	1.33 (m)	33	22.08	CH <sub>2</sub>	1.28 (m)
34	13.97	CH <sub>3</sub>	0.88 (dd, 9.1, 4.6)	34	13.92	CH <sub>3</sub>	0.86 (t, 6.8)
35	39.75	CH <sub>3</sub>	2.30 (s)	N-H <sub>amida</sub>		-	6.97 (t, 5.5)
N-H		-	10.01 (s)	N/D: No determinado, *Señales intercambiables			

### 7.1.3 Caracterización térmica

Durante el desarrollo del proyecto se realizaron cinco ensayos de neutralización para obtener a DE a partir de DEM. Todas las reacciones se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita en la **Figura 22**, y se demostró por técnicas espectroscópicas que dicho procedimiento fue exitoso para remover al mesilato sin que esto conllevara a cambios en la estructura química de DE (*vide supra* análisis espectroscópico por IR y NMR). Un estudio de caracterización adicional para estos sólidos fue el análisis térmico DSC-TGA que se muestra en la **Figura 30**.

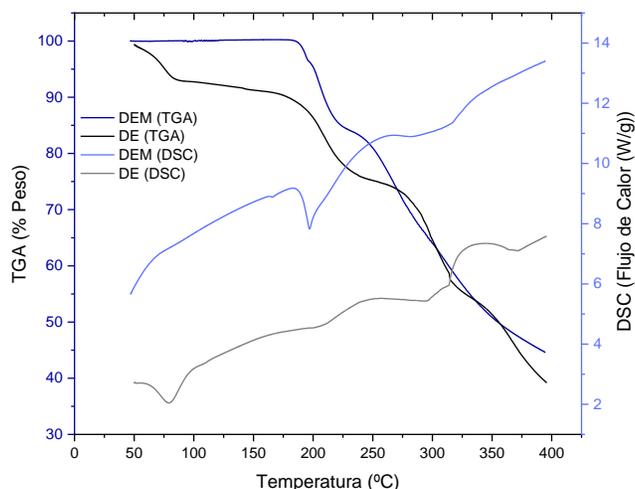
Realizando un análisis comparativo entre DEM y la fase neutra se obtuvo lo siguiente. La gráfica de TGA de **DEM (Figura 30 a)** muestra una pérdida de masa del 14% a  $T_{\text{onset}} = 177$  °C. El sólido remanente continúa perdiendo masa de forma gradual conforme la temperatura aumenta. En el DSC se observa un evento endotérmico a  $T_{\text{peak}} = 183$  °C ( $\Delta H = 103.2$  J/g), que se atribuye al inicio de la descomposición térmica de la muestra. Por su parte, la fase neutra (**Lote 1**) mostró una pérdida de masa inicial de 9.25% ( $T_{\text{onset}} = 79$  °C) que equivale a 3.5 equivalentes de agua. Posteriormente, se observa una pérdida de masa en  $T_{\text{onset}} = 193$  °C. El DSC de la misma muestra mostró un  $T_{\text{peak}}$  a 76 °C ( $\Delta H = 97.38$  J/g), el cual se podría asociar a la deshidratación de la muestra observada en el TGA, seguido de otro evento térmico  $T_{\text{peak}} = 200$  °C, atribuido a la descomposición de la muestra. Un análisis térmico adicional se realizó por medio de un fusiómetro (BUCHI Melting Point B-545). Este análisis permitió observar directamente que la fusión de la muestra de DE se da aproximadamente entre 80 – 84 °C. Esto indica que el pico endotérmico observado a 76 °C en el DSC corresponde a la deshidratación seguido de la fusión de la muestra. Este análisis corrobora que DEM y DE son muestras significativamente diferentes en cuanto a sus propiedades térmicas, siendo DE una muestra más termosensible.

Con respecto a los diferentes lotes de DE obtenidos, estos se comparan en la **Figura 30 b**. El TGA del **Lote 2** mostró una pérdida inicial de masa del 1.57% a  $T_{\text{onset}} = 40.85$  °C. Posteriormente, se observa que la muestra comienza a perder masa de forma continua a 191 °C. En el DSC se muestra un  $T_{\text{peak}}$  a 60.85 °C ( $\Delta H = 3.2$  J/g), y posteriormente otro evento a  $T_{\text{peak}} = 143.82$  ( $\Delta H = 7.69$  J/g). Estos resultados sugieren que la muestra se deshidrata a bajas temperaturas y posteriormente funde.

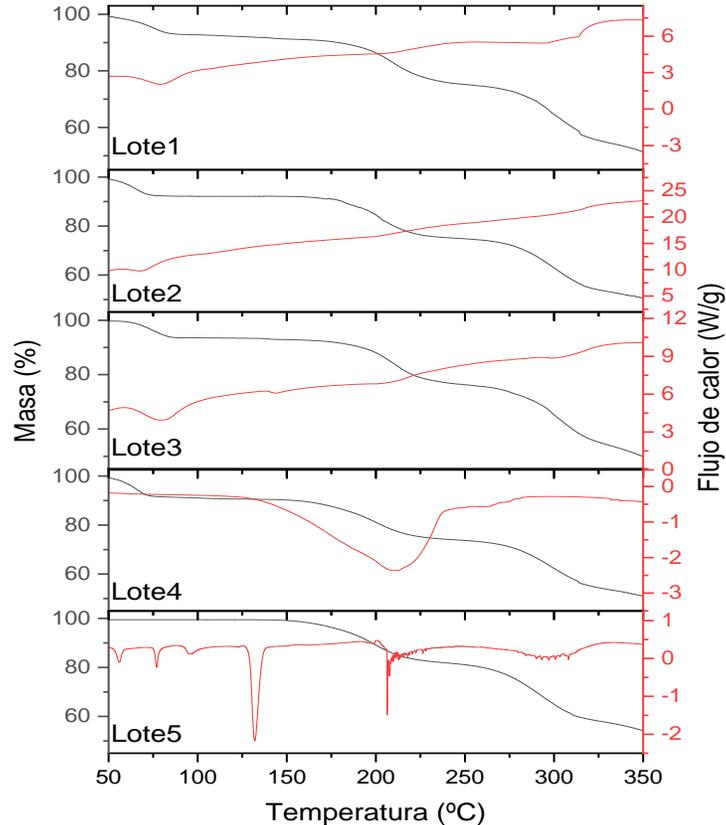
De forma similar, en el caso del **Lote 3**, el TGA muestra una pérdida de masa inicial de 6.34% ( $T_{\text{onset}} = 83.53$  °C) asociado a la deshidratación de dos moléculas de agua y a la fusión

de la muestra. Posteriormente se observa la descomposición a  $T_{\text{onset}} = 197\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Por su parte, el **Lote 4** mostró una pérdida de masa del 9.38 % ( $T_{\text{onset}} 48.22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), cálculos realizados dan evidencia que dicha pérdida se asocia a la remoción de 3.6 equivalentes de agua, valor que será tomado como 3.5 equivalentes de agua ya que el equipo no discierne entre moléculas enteras o fracciones de ella. Posteriormente se observa la descomposición de la muestra a  $169\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Por último, en el **Lote 5** solo se observó la descomposición térmica a  $176\text{ }^{\circ}\text{C}$ , lo que indica que la muestra se obtuvo en forma anhidra. El punto de fusión de los **Lotes 1, 3 y 4** se corroboró en un fusiómetro, observándose que las muestras funden entre  $80\text{-}84\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

El análisis comparativo entre los lotes permite observar que el grado de hidratación fue variable. Dichas diferencias se pueden atribuir a que el secado no fue homogéneo para todos los lotes. En general, los sólidos obtenidos después del proceso de neutralización se resguardaron en una atmosfera desecante generada por sulfato de calcio durante 3 - 4 días (Lotes 1, 3 y 4). Los Lotes 2 y 5 se almacenaron durante 7 días. Es importante resaltar que, aunque la masa de DE obtenida durante la neutralización fue similar en todos los lotes (4.2 - 4.6 g), la cantidad de agente desecante utilizada no lo fue, lo cual pudo afectar el grado de hidratación de las muestras. Esto demuestra que DE es un sólido susceptible a cambios en la masa debido a la cantidad de agua que presenta, lo cual complica sus condiciones de almacenamiento y desarrollo farmacéutico.



a)



b)

**Figura 30** Análisis térmicos para a) DEM y b) DE provenientes de los diferentes lotes de la reacción de neutralización

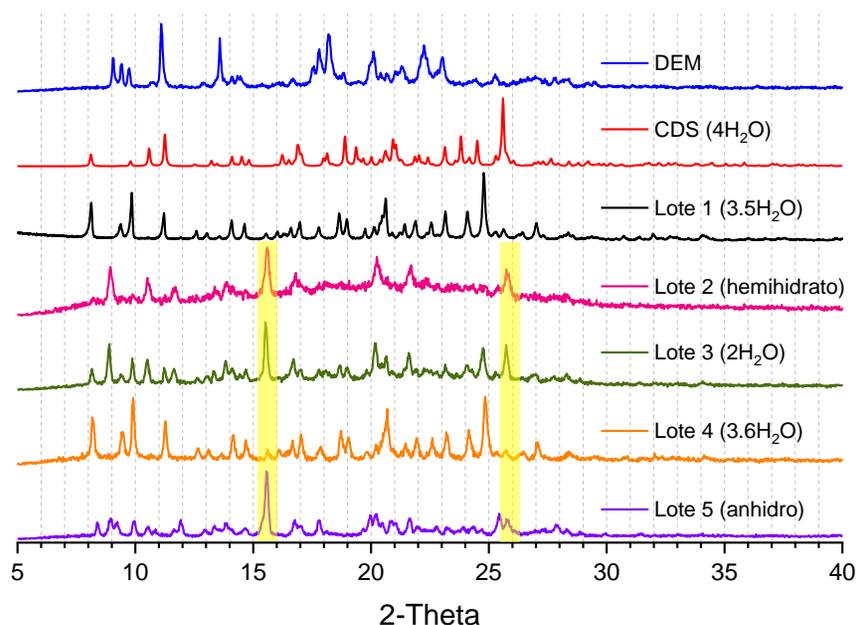
#### 7.1.4 DRXP

La técnica de DRXP ha sido ampliamente utilizada para corroborar la identidad y la cristalinidad de un sólido de interés. Se considera que cada sólido tiene un patrón de difracción de rayos X característico que lo identifica como su huella dactilar tomando en cuenta la intensidad y el ángulo de difracción 2-Theta. En la **Figura 31** se muestra el patrón de DRXP simulado del tetrahidrato de DE cuyos datos reportados de DRX de monocristal están en la CSD (refcode EFAXAM (Cai et al., 2016)), el patrón de DEM, y los patrones de difracción correspondientes a los diferentes lotes obtenidos de DE. El sólido DE tetrahidratado (CSD) presenta picos intensos en 11.2°, 18.8°, 23.8° y 25.6° 2-Theta. Por otro lado, el patrón de difracción de DEM fue significativamente diferente, con picos intensos

en  $11.1^\circ$ ,  $13.5^\circ$ ,  $18.1^\circ$ ,  $20^\circ$  y  $22.2^\circ$  2-Theta. El **Lote 1** presentó un patrón de difracción diferente a los dos anteriores, con picos característicos en  $8.0^\circ$ ,  $9.4^\circ$ ,  $9.8^\circ$ ,  $11.1^\circ$ ,  $12.5^\circ$ ,  $13.1^\circ$ ,  $14.1^\circ$ ,  $15.5^\circ$ ,  $17.5^\circ$ ,  $18.6^\circ$ ,  $20.6^\circ$ ,  $23.1^\circ$ ,  $24.1^\circ$ ,  $24.7^\circ$  y  $27^\circ$  2-Theta. El patrón del **Lote 2** fue diferente al del **Lote 1**, con picos intensos en  $8.9^\circ$ ,  $10.4^\circ$ ,  $15.5^\circ$ ,  $20.2^\circ$ ,  $21.7^\circ$  y  $25.7^\circ$  2-Theta. El patrón del **Lote 3** parece una combinación entre el Lote 1 y el Lote 2. Los picos intensos de este lote se encuentran en  $8.8^\circ$ ,  $15.5^\circ$ ,  $20.2^\circ$ ,  $24.7^\circ$  y  $25.7^\circ$  2-Theta.

Por su lado, el **Lote 4** presenta picos en  $8.1^\circ$ ,  $9.4^\circ$ ,  $9.9^\circ$ ,  $11.3^\circ$ ,  $12.5^\circ$ ,  $20.7^\circ$  y  $24.86^\circ$  2-Theta, parece igual al Lote 1. El **Lote 5** presentó picos característicos de difracción en  $8.3^\circ$  y  $11.9^\circ$  2-Theta; así como picos intensos en  $15.5^\circ$  y en  $25.4^\circ$  2-Theta.

Tal como se observa en la **Figura 31**, el patrón de difracción de RX de cada lote fue diferente, lo que sugiere que las moléculas de agua que se asignaron por DSC-TGA corresponden a moléculas de agua de hidratación (incluidos en la estructura cristalina). Sin embargo, cabe señalar que el patrón de difracción de los **lotes 2, 3 y 5** (los que presentan un menor grado de hidratación) muestran un pico intenso en común a  $15.65^\circ$ ; y otro en  $25.7^\circ$  2-theta (sección en amarillo de la **Figura 31**).



**Figura 31** Patrones de difracción de DRXP de la fase neutra tetrahidratada, la sal comercial (DEM) y de los lotes obtenidos de la neutralización con diferentes grados de hidratación.

En la **Tabla 8** se describen los picos de difracción y las intensidades más representativas de los patrones de difracción de los lotes obtenidos de DE. Tal como se observa en la Figura anterior, los **lotes 1 y 4** (con mayor grado de hidratación) mostraron picos de difracción muy

parecidos. Siendo los **Lotes 2 y 3** son una mezcla de fases, y el Lote 5 la fase anhidra. Toda esta evidencia sugiere que la incorporación de moléculas de agua en la red cristalina modifica el arreglo en el sólido.

**Tabla 8** Ángulos 2-Theta e intensidad relativa de los picos de difracción de DE tetrahidrato y de los lotes obtenidos de DE

DE Tetrahidrato		Lote 1		Lote 2		Lote 3		Lote 4		Lote 5	
2-Theta	Int. Rel.	2-Theta	Int. Rel.	2-Theta	Int. Rel.	2-Theta	Int. Rel.	2-Theta	Int. Rel.	2-Theta	Int. Rel.
8.11	0.17	8.13	0.56	9.50	0.26	8.17	0.27	8.21	0.65	8.39	0.24
9.78	0.07	9.38	0.24	10.51	0.55	9.86	0.46	9.42	0.47	8.93	0.30
10.55	0.26	9.84	0.70	11.70	0.42	10.51	0.44	9.90	0.98	11.92	0.28
11.31	0.46	11.21	0.40	14.00	0.42	11.22	0.32	11.26	0.59	13.36	0.20
14.10	0.14	14.08	0.30	15.60	1	11.64	0.31	14.16	0.43	13.80	0.23
14.57	0.14	14.63	0.25	16.81	0.62	13.82	0.42	14.69	0.36	15.56	1
16.88	0.31	16.98	0.27	20.24	0.86	15.52	1	17.01	0.43	16.77	0.28
18.88	0.19	18.65	0.40	21.71	0.70	16.71	0.45	18.73	0.5	17.82	0.27
21.03	0.39	20.61	0.62	25.73	0.68	20.16	0.69	20.68	0.82	19.98	0.35
23.14	0.28	21.89	0.29			21.59	0.54	21.94	0.38	20.24	0.37
23.79	0.44	23.15	0.43			24.78	0.59	23.19	0.47	20.89	0.27
24.46	0.37	24.09	0.43			25.73	0.66	24.14	0.51	21.63	0.30
25.58	1	24.78	1					24.84	1	25.83	0.28
		27.01	0.26					27.06	0.32		

## 7.2 Cribado *in silico* de NFS

La estructura molecular de DE (**Figura 32**) cuenta con diferentes grupos funcionales (piridina, amida, ester, imidazol, éster carbamida), los cuales pueden funcionar como potenciales aceptores de puentes de hidrógeno. A la vez, la estructura cuenta con un grupo amino primario y un amino secundario que pueden funcionar como donadores de puentes de hidrógeno. Desde un punto de vista de ingeniería de cristales, esto sugiere que mayormente moléculas con grupos funcionales con la capacidad de donar puentes de hidrógeno, tales como ácidos carboxílicos, alcoholes, etc., tienen una mayor probabilidad de funcionar como potenciales agentes cocrystalizantes.



El análisis del tetrahidrato de DE permite deducir que es posible generar nuevas fases sólidas con DE si se utilizan moléculas con grupos funcionales que sean buenos donadores de puentes de hidrógeno, buscando que éstos puedan sustituir las moléculas de agua. Dado el universo de moléculas que puedan funcionar como potenciales formadores de puentes de hidrógeno, se decidió recurrir a métodos *in silico* que permitieran delimitar el cribado en la búsqueda de NFS.

Esta estrategia permite acelerar la búsqueda de NFS mediante el empleo concreto de formadores de cocrystal y a su vez acelerar los estudios biofarmacéuticos en cuestión. Hasta el momento existen diversos estudios reportados sobre el empleo de este tipo de análisis *in silico* (Wood et al., 2013).

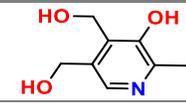
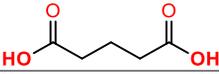
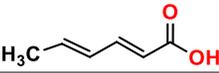
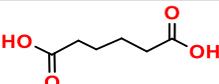
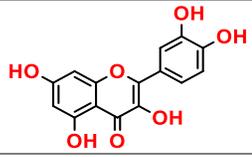
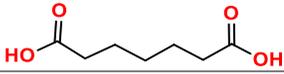
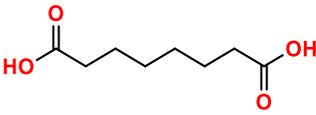
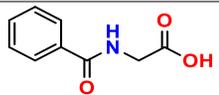
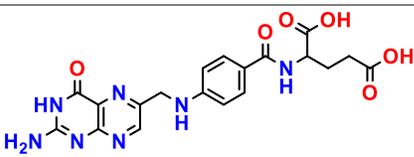
En los últimos años se han empleado herramientas computacionales para el diseño y la predicción sobre la generación de NFS (Desiraju, 2007). En el presente proyecto se realizó el estudio *in silico* mediante el uso de la herramienta *Full Interaction Maps* de la CSD (Wood et al., 2013).

Esta herramienta permite delimitar la búsqueda a aquellas moléculas que no tengan grupos ionogénicos (i.e., estructuras que no sean sales). Estas estructuras preseleccionadas son analizadas en cuanto a sus conformaciones para establecer las diferentes geometrías que pueden adoptar. Todas las conformaciones determinadas para estas moléculas son analizadas a la par de las diferentes conformaciones que puede adoptar DE (se delimitó a 500 confórmeros). El software utiliza los diferentes confórmeros generados (de DE y de los potenciales formadores de cocrystal) para buscar interacciones viables entre ellos. El programa considera diversos parámetros tales como la magnitud del momento del dipolo y la fracción de nitrógeno y oxígeno (MacRae et al., 2020). Al final, el software genera mapas de interacción con base en el número de confórmeros de DE que pueden interaccionar favorablemente con los confórmeros de cada uno de los potenciales formadores de cocrystal previamente seleccionados y en la configuración de ajuste del asistente de cribado de complementariedad molecular. Los resultados se resumen como una probabilidad de éxito para la generación de una NFS.

En la **Tabla 9** se muestran los resultados obtenidos del cribado *in silico* para la búsqueda de NFS con DE. Tal como se puede observar, las moléculas propuestas como formadores son diversas en tamaño, grupos funcionales y complejidad química (ácidos dicarboxílicos alifáticos, polioles, ácidos carboxílicos aromáticos, y una vitamina). Este resultado

claramente muestra que las moléculas que pueden funcionar como formadores de cocrystal no son obvias de predecir en ausencia de una herramienta *in silico*, ya que de manera rutinaria la selección de los coformadores está basado en un análisis de grupos funcionales que conduce a seleccionar formadores de cocrystal con características semejantes. Entre las desventajas de este tipo de análisis es que toma en cuenta solo las estructuras que se encuentran reportadas en la CSD. Además, se tuvo que delimitar el número de conformaciones de DE a 500 para optimizar recursos computacionales y tiempo de análisis (la búsqueda conformacional de DE tomó aproximadamente una semana), ya que el número de conformaciones posibles de DE es muy grande porque cuenta con diversos enlaces con libertad rotacional, además de que su tamaño molecular es grande.

**Tabla 9.** Formadores de cocrystal propuestos del cribado *in silico*, se muestra el Refcode de la CSD, % de éxito de generación de una NFS y estructura química.

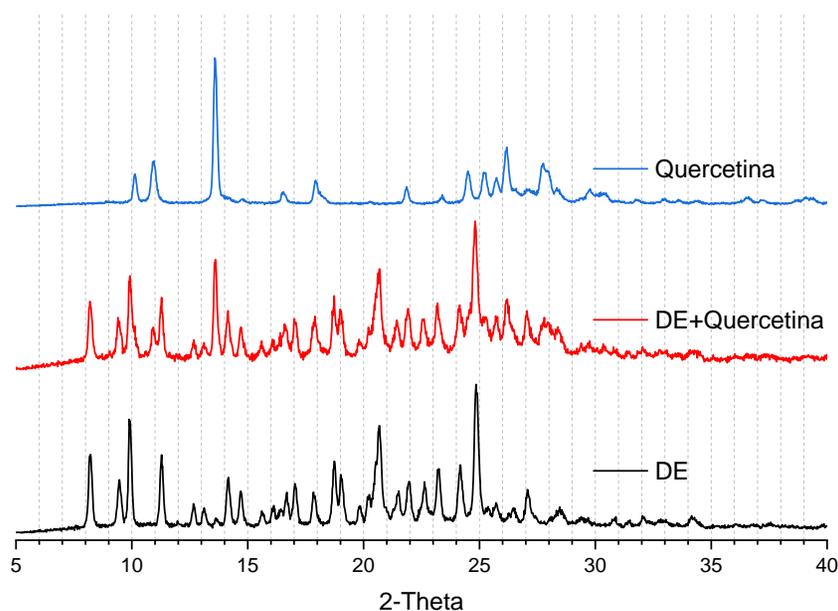
Refcode	Coformador	% de éxito	Estructura
BITZAF	Piridoxina	2	
AMIHAH	Ácido glutárico	4	
ZZZNWQ05	Ácido sórbico	5	
ADIPAC	Ácido adípico	10	
AKIJEK	Quercetina	10	
EVETAB	Ácido pimélico	15	
SUBRAC	Ácido subérico	19	
HIPPAC	Ácido hipúrico	20	
FOLCAH03	Ácido fólico	62	

Dichos formadores de cocrystal mostrados en la tabla anterior se usaron en la síntesis experimental para la generación de NFS con DE mediante SDG (**Anexo 3**).

### 7.3 Identificación de NFS

La búsqueda de NFS se realizó mediante molienda mecanoquímica asistida con gota de disolvente (SDG). El disolvente utilizado fue isopropanol debido a que es ampliamente utilizado por la industria farmacéutica, además que se enlista en la clase 3 de la guía para solventes residuales por la FDA (FDA, 2018). Los disolventes de esta clase se consideran de menor toxicidad y de menor riesgo para la salud. Los experimentos se llevaron a cabo a 20 Hz durante 20 minutos en una proporción molar 1:1 (DE:Coformador). Los compuestos probados como formadores de cocrystal son los descritos en la **Tabla 9**. Los productos obtenidos se analizaron por DRXP para verificar la generación de una NFS.

La **Figura 34** muestra los difractogramas de las materias primas y del producto obtenido de SDG entre DE y Quercetina. En el sólido de SDG se observan todos los picos correspondientes a DE y a Quercetina como una mezcla física, lo que indica que no se formó una NFS entre estos compuestos.



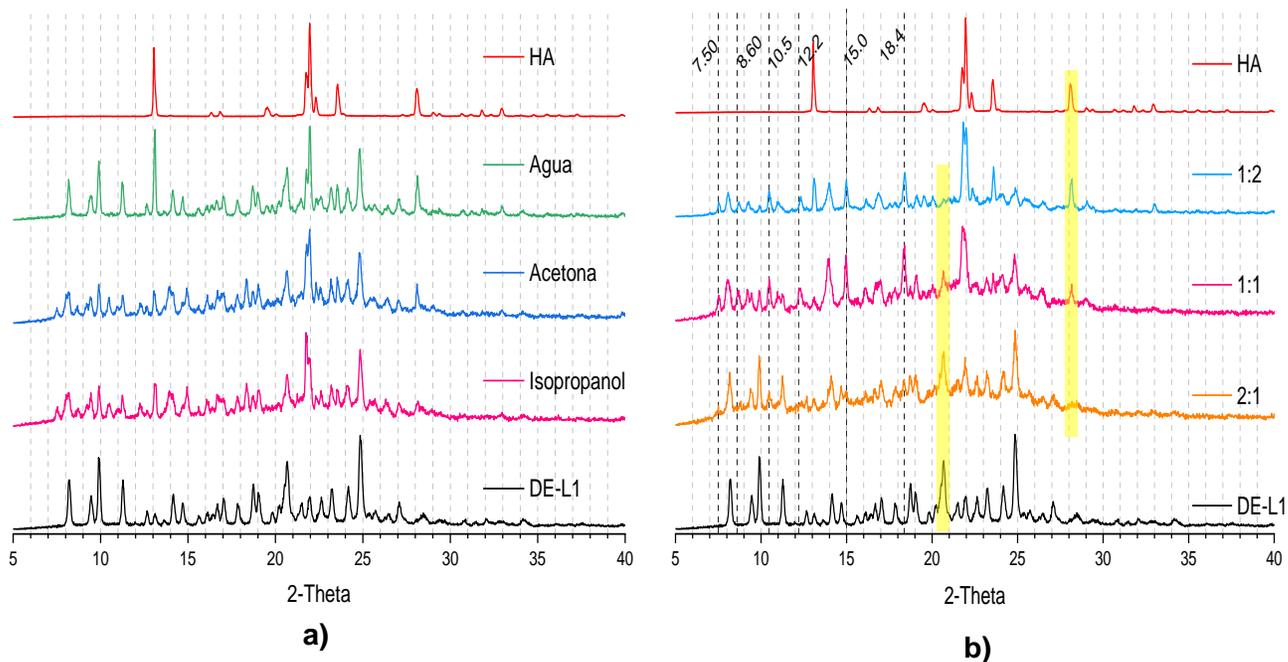
**Figura 34** Comparación de los difractogramas de las materias primas (DE y Quercetina) con el del producto obtenido entre DE y Quercetina mediante SDG

Estos resultados, donde el producto obtenido por SDG muestra solo picos de las materias primas también se observó con los demás coformadores (ver **Anexo 3**), excepto con el ácido hipúrico (ver Figura 35). Para la combinación de DE con ácido hipúrico (HA) se

realizaron experimentos adicionales de SDG con otros disolventes farmacéuticamente aceptables como agua y acetona, dichos resultados se muestran en la **Figura 35**.

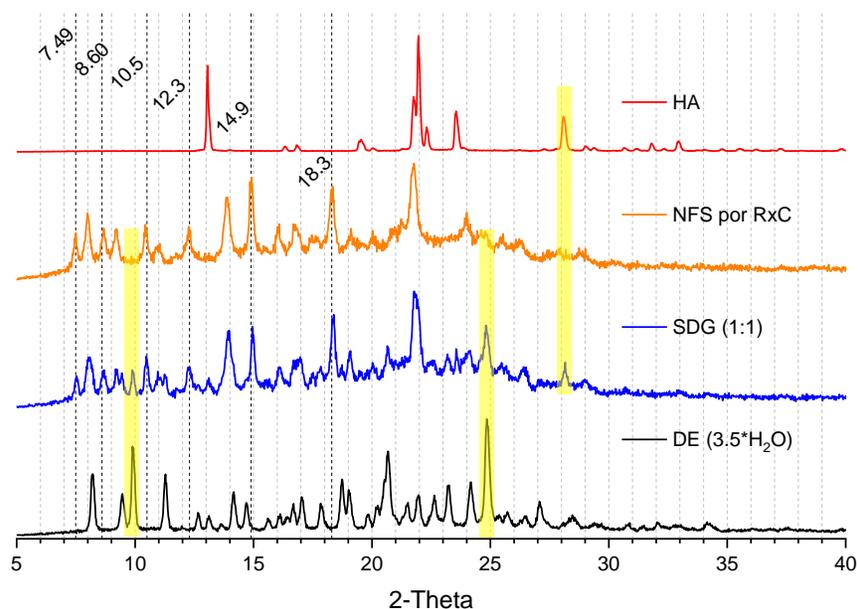
El sólido obtenido en la presencia de agua muestra solamente los picos correspondientes a las materias primas. Por otra parte, los difractogramas de los productos de síntesis obtenidos con acetona e isopropanol mostraron la presencia de nuevos picos en  $7.5^\circ$ ,  $8.6^\circ$ ,  $10.5^\circ$ ,  $13.2^\circ$ ,  $15.0^\circ$  y  $18.4^\circ$  2-Theta (marcados en líneas negras punteadas), además de remanentes de las materias primas (**Figura 35 a**). Cabe señalar que se realizaron experimentos control mediante SDG con DE y HA de manera independiente, bajo las condiciones de molienda mecanoquímica utilizadas anteriormente, observándose que estos sólidos se mantienen estables (**Anexo 4**). Esto indica que los nuevos picos observados podrían ser debido a la generación de una NFS.

Se realizaron experimentos adicionales variando la proporción molar entre DE y HA (2:1 y 1:2), esto con el objetivo de poder establecer la relación estequiométrica de los componentes en la NFS. Los experimentos se realizaron solo con acetona (**Figura 35 b**). Los resultados muestran que en las tres proporciones los sólidos presentan nuevos picos en  $7.5^\circ$ ,  $8.6^\circ$ ,  $10.5^\circ$ ,  $13.2^\circ$ ,  $15.0^\circ$  y  $18.4^\circ$  2-Theta (marcados en líneas negras punteadas). Sin embargo, los tres sólidos mostraron también picos correspondientes a DE ( $8.16^\circ$ ,  $20.69^\circ$  y  $24.90^\circ$  2-Theta) y a HA ( $13.02^\circ$ ,  $23.65^\circ$  y  $28.09^\circ$  2-Theta), lo que indica que los productos contienen todavía remanentes de ambas materias primas y que la formación de la NFS se llevó a cabo de manera incompleta. Con base en estos resultados no fue posible confirmar la estequiometría de la NFS.



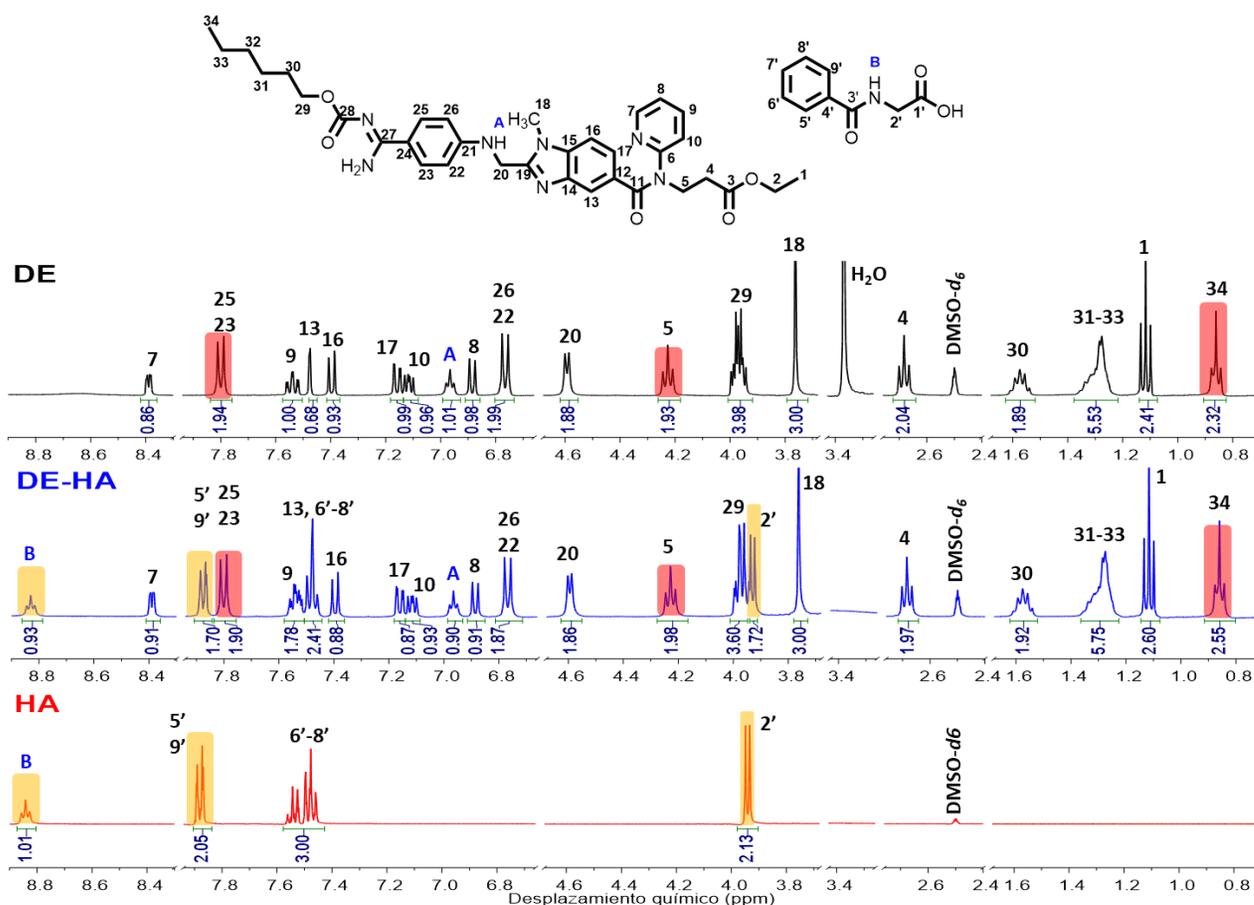
**Figura 35** Productos de síntesis entre DE-L1 y HA. En a) se muestran los difractogramas de los productos de síntesis empleando diferentes disolventes, en b) se muestran las diferentes estequiometrias ensayadas mediante métodos mecanoquímicos (50 mg de mezcla, 20 Hz durante 20 minutos y 15  $\mu$ L de acetona).

Tal como se muestra en los resultados anteriores, mediante molienda mecanoquímica no se logró establecer la relación estequiométrica de los componentes en la NFS, debido a ello se exploró la reacción cristalización (RxC) como una técnica de síntesis que permite la generación de un sólido cristalino a partir de los componentes disueltos (Rodríguez-Hornedo, et al., 2006). El método se realizó a  $T_{amb}$  con  $CH_3CN$ , ya que HA presenta buena solubilidad en este disolvente, mientras que DE es escasamente soluble en el mismo. El patrón de DRXP del producto obtenido por esta metodología se muestra en la **Figura 36**. Se puede observar que los nuevos picos de difracción en los productos de molienda anteriormente descritos (picos marcados con una línea punteada en negro en la Figura 35b) también se observan en el producto de RxC, con la diferencia de que en este último no se observan picos de materias primas (mostrados en amarillo en el producto por SDG). Esto indica que se obtuvo la NFS en una forma más pura.



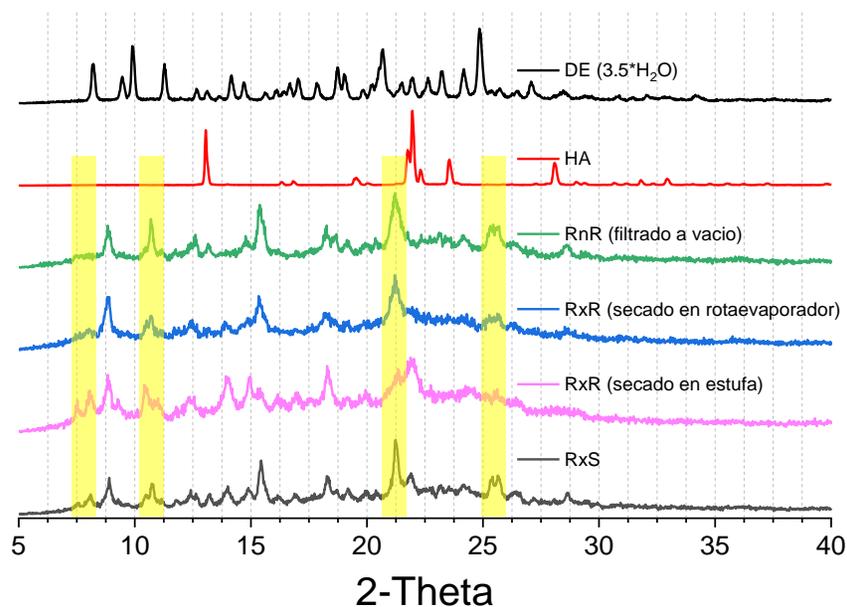
**Figura 36** Patrón de PXRD de materias primas y el producto obtenido por RxC

El sólido obtenido mediante la RxC se analizó por RMN  $^1\text{H}$  en solución. En la **Figura 37** se muestran los espectros de las materias primas (DE y HA), así como el de la NFS (DE-HA) disuelto en  $\text{DMSO-}d_6$ . En este último espectro se observan las señales correspondientes a los dos componentes. De manera específica es posible identificar el doblete en 3.93 ppm que integra para los dos protones del metileno de HA (protones correspondientes a 2' en el diagrama molecular mostrado dentro de la figura 37). También se puede apreciar en 8.83 ppm un triplete que integra para un protón que corresponde al protón de la amina de HA (marcado como B). Por otro lado, en 7.79 ppm se observa un doblete que integra para dos protones que corresponden a los del anillo aromático unido al carbamato de la molécula de DE (posiciones 23 y 25. Los valores de integración de las señales específicas para ambos constituyentes de la NFS permite establecer que la relación estequiométrica DE-HA de la NFS es 1:1.



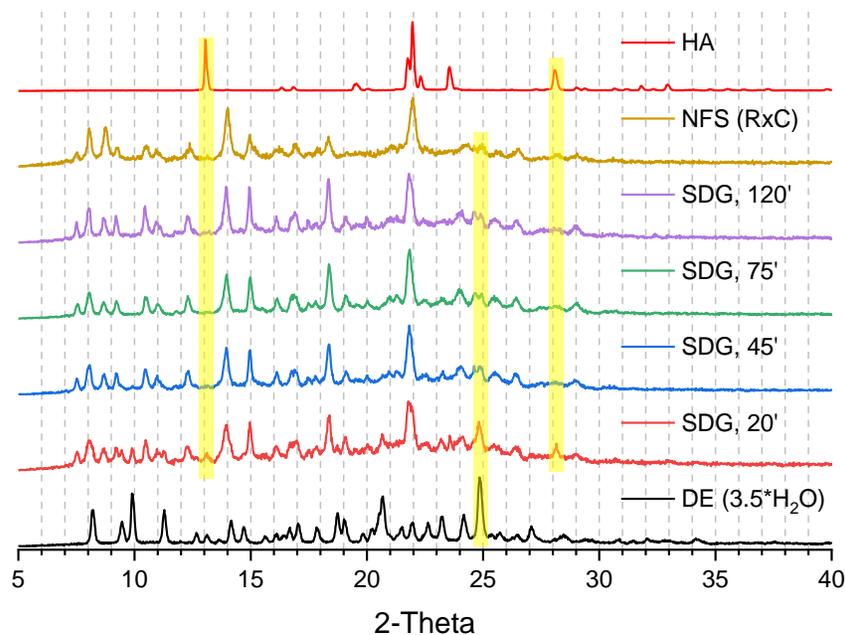
**Figura 37** Determinación de la estequiometría de la NFS DE-HA mediante RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 400 MHz). En las secciones en amarillo se destacan algunas señales correspondientes a HA, mientras que en rojo se destacan aquellas correspondientes a DE.

Una complicación asociada al producto obtenido por RxC es que el rendimiento fue muy bajo (~15%). Debido a esto, se ensayaron otros métodos de síntesis en solución, i.e., reacción en solución (RxS) a  $T_{\text{amb}}$  con  $\text{CH}_3\text{CN}$ , y reacción en reflujo (RxR) con acetato de etilo. En la **Figura 38** se muestran los difractogramas de estos productos de síntesis, donde se observa el patrón de DRXP típico de la NFS. Sin embargo, dependiendo el proceso de secado del sólido resultante, se obtuvieron picos adicionales y diferentes entre ellos (picos resaltados en amarillo), lo que indica que dichos métodos de síntesis no son reproducibles. Además, otra desventaja fue el bajo rendimiento obtenido (~15%).



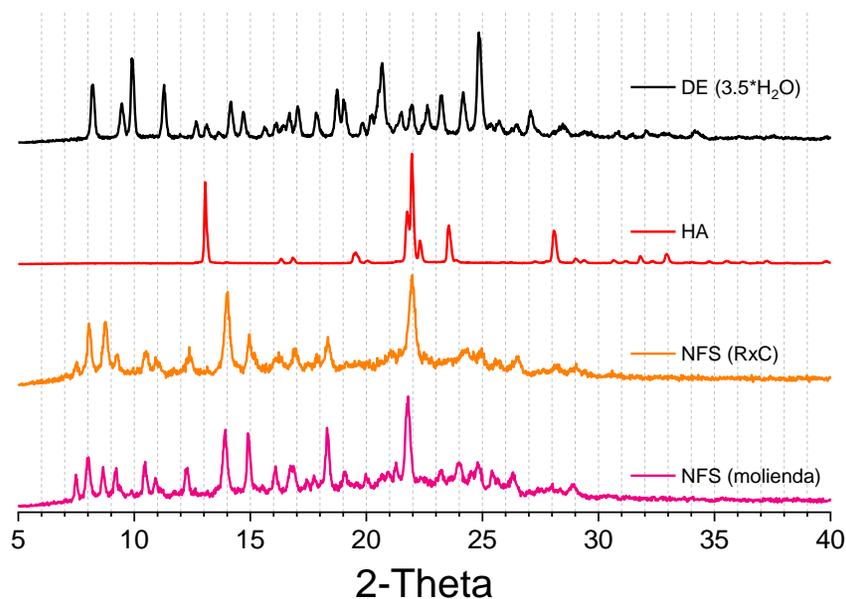
**Figura 38** Difractogramas de los productos de síntesis de la NFS DE-HA mediante RxS y RxR en estequiometría 1:1.

Dada la variabilidad obtenida en los sólidos provenientes de los métodos en solución, se buscó optimizar las condiciones de SDG con acetona para generar a DE-HA de forma pura y con mayores rendimientos de síntesis. Por ello, se monitoreó la cinética de formación de la NFS. En la **Figura 39** se muestran los patrones de DRXP de las materias primas, de la NFS identificada por RxC y del producto de SDG a diferentes tiempos. Se puede observar en el patrón de difracción del producto de SDG a 20 minutos que muestra picos de la NFS (RxC) y de las materias primas (secciones en amarillo). Sin embargo, los productos obtenidos después de 45 minutos solo muestran los picos de la NFS (RxC).



**Figura 39** Patrones de DRXP de las materias primas (DE y HA), así como de los productos de síntesis de la NFS de DE-HA (1:1) mediante RxC y molienda mecanoquímica con acetona variando el tiempo de molienda.

Los experimentos de SDG utilizados para el screening y optimización del método se realizaron con 50 mg totales de mezcla, para ello se empleó el Lote 1. Para realizar la caracterización fisicoquímica y biofarmacéutica de la NFS sintetizada a partir de un solo lote, se aumentó la cantidad de los reactivos sólidos (DE y HA) por un factor de 20, con el objetivo de obtener en un solo procedimiento por SDG 2 g de la NFS. El tiempo de molienda se estableció a 60 minutos, con el fin de asegurar que la reacción fuera completa. La molienda se realizó por ciclos de 15 minutos hasta completar los 60 minutos totales. A cada contenedor se adicionaron 450  $\mu$ L de acetona en cada uno de los primeros tres ciclos. El patrón de PXRd del sólido obtenido se muestra en la **Figura 40**. Tal como se puede observar, dicho patrón es igual al del sólido obtenido por RxC, lo que indica que se obtuvo la NFS DE-HA 1:1 de forma pura.



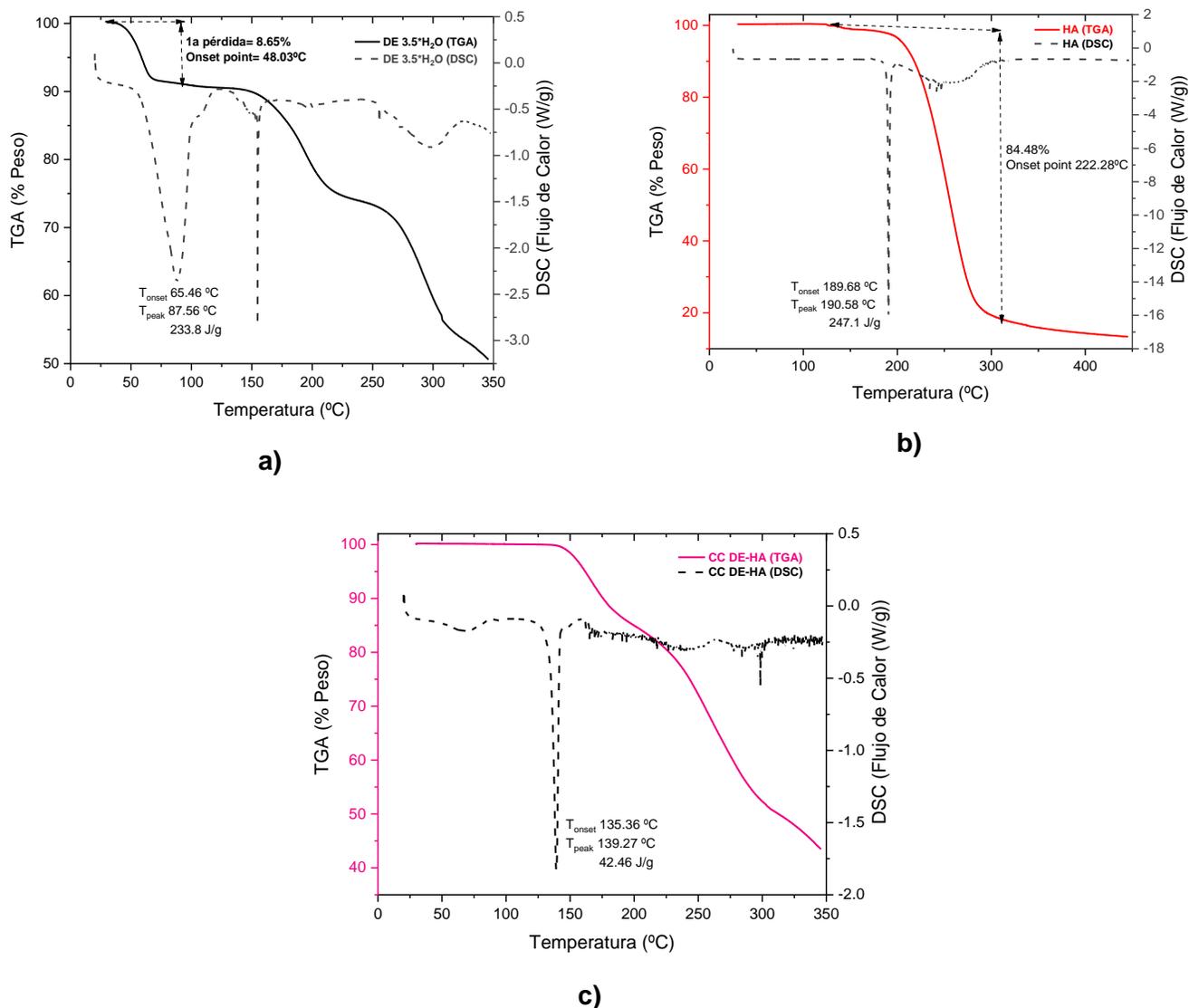
**Figura 40** Patrón de DRXP de materias primas y sólidos obtenidos por RxC y SDG con acetona en escala de 2 g. Para la síntesis por SDG se empleó el Lote 1 de DE (3.5\*H<sub>2</sub>O)

#### 7.4 Caracterización Termogravimétrica y Espectroscópica de la NFS DE-HA

En la **Figura 41** se muestran los termogramas de TGA y las gráficas de DSC de las materias primas y la NFS DE-HA. En el inciso **a)** se muestra que DE (Lote 1) presenta una pérdida inicial del 8.65 % a 48.03 °C, la cual corresponde a una deshidratación de la molécula (~3.5 H<sub>2</sub>O). Seguido de esto el compuesto remanente sufre una serie de descomposiciones conforme se aumenta la temperatura. En el DSC se muestra que DE (Lote 1) presenta un evento térmico a  $T_{\text{onset}}$  65.46 °C ( $T_{\text{peak}}$  87.56 °C). Dicho evento se puede asociar a la deshidratación de la muestra. Sin embargo, el análisis visual en un fusiómetro (BUCHI Melting Point B-545) permitió corroborar directamente que dicho evento también incluye la fusión de la muestra.

En el inciso **b)** se muestra que HA se encuentra anhidro y presenta una sola pérdida de peso del 84.5% a 222 °C; este evento corresponde a su descomposición. En el DSC se muestra un sólo evento endotérmico  $T_{\text{onset}}$  189.7 °C ( $T_{\text{peak}}$  190.6 °C), el cual corresponde a la fusión de la muestra debido a que en el TGA no se observa una pérdida de masa. Esto indica que la muestra funde y posteriormente descompone. Finalmente, en el inciso **c)** se muestra que la NFS DE-HA tiene propiedades térmicas diferentes a las de las materias primas. Este sólido funde a  $T_{\text{onset}}$  135.4 °C ( $T_{\text{peak}}$  139.3 °C,  $\Delta H = 42.4$  J/g). Posteriormente,

a partir de  $T_{\text{onset}}$  150.6 °C la muestra sufre una pérdida de peso en varias etapas que puede corresponder a la pérdida de HA.



**Figura 41** Caracterización termogravimétrica de a) DE, b) HA y c) la NFS (DE-HA).

Se llevó a cabo la caracterización de la NFS DE-HA mediante espectroscopía IR, incluyendo la comparación con sus materias primas y la sal de hipurato de sodio. En la **Figura 42** se observan los espectros de IR característicos de los cuatro sólidos. Para DE (**Lote 1**) se observan las bandas características de los grupos carbonilo, uno en 1727  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde al carbonilo del éster y el otro en 1602  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la amida del

carbamato. También en  $1251\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda intensa correspondiente al estiramiento C-O del éster. Finalmente, en  $3425\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda pequeña que corresponde al enlace sencillo entre N-H y los estiramientos de los hidrógenos de las moléculas de agua presentes en DE.

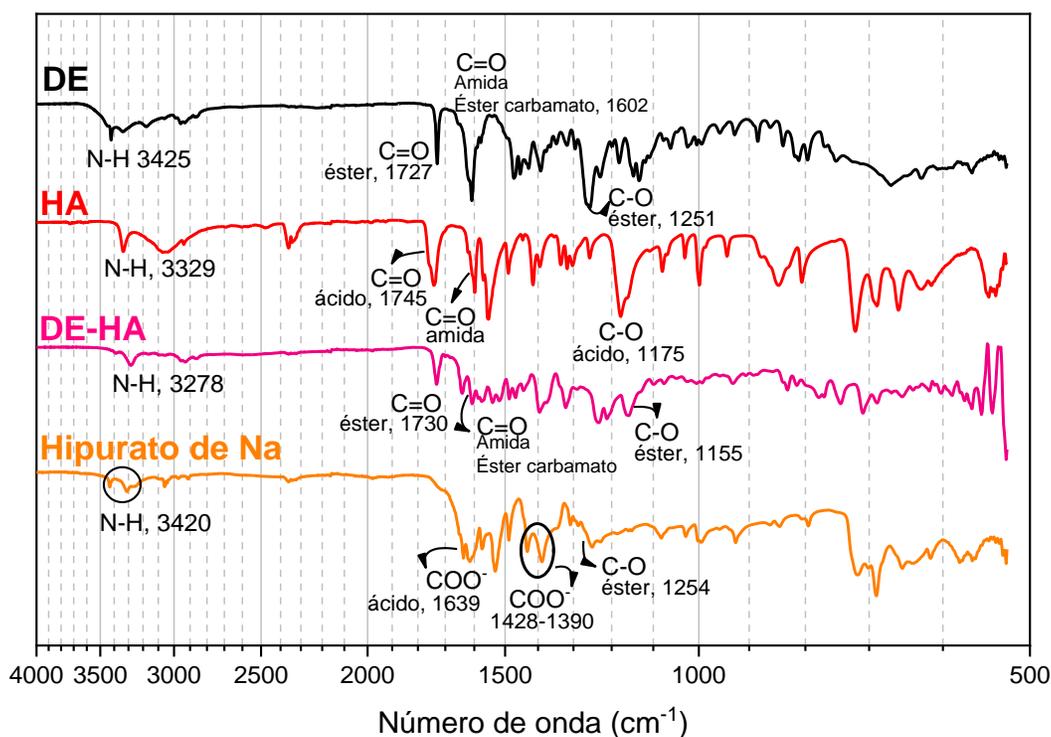
Para el coformador HA también se observan bandas representativas como la de  $3329\text{ cm}^{-1}$  que indica el enlace sencillo N-H. En  $1745\text{ cm}^{-1}$  se observa el estiramiento del carbonilo del ácido carboxílico, y en  $1602\text{ cm}^{-1}$  se observa el estiramiento del carbonilo de la amida. También en  $1175\text{ cm}^{-1}$  se observa el estiramiento del enlace sencillo C-O del ácido carboxílico.

En cuanto al espectro IR de la NFS DE-HA en general se observa que no es la suma simple de los espectros de las materias primas. Hay un corrimiento hacia menor número de onda de la banda correspondiente al enlace N-H para DE de  $3425\text{ cm}^{-1}$  a  $3278\text{ cm}^{-1}$ . En  $1730\text{ cm}^{-1}$  se observa una única banda, con características semejantes al carbonilo del éster de DE en la NFS, pero también en una región esperable para el ácido carboxílico de HA. En la región entre  $1650\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$  se encuentran varias bandas de los grupos carbonilos presentes en los componentes de la NFS, cuya asignación no es posible hacer de forma inequívoca. En  $1155\text{ cm}^{-1}$  se observa la banda del enlace C-O del éster de DE.

Diversos estudios se han realizado resaltando la utilidad de la espectroscopía de IR para determinar si un sólido multicomponente se presenta como una sal o un cocrystal (H G Brittain, 2009; Harry G Brittain, 2009, 2012). Este análisis es particularmente útil cuando los sólidos multicomponentes cuentan con ácidos carboxílicos y aminas. Cuando un ácido carboxílico cambia su estado de ionización hacia carboxilato, su banda característica en  $1720\text{ cm}^{-1}$  es reemplazada por dos vibraciones correspondientes al estiramiento antisimétrico de  $\text{COO}^-$  entre  $1600\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$  y otra correspondiente al estiramiento simétrico del mismo anión entre  $1350\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ . Si la banda del carbonilo se encuentra solamente desplazada ligeramente, se asocia a la formación de un cocrystal. Adicionalmente, la banda de estiramiento de la amina secundaria ( $3123\text{ cm}^{-1}$ ) desaparecería en el caso de la formación de sal, y podría observarse una nueva banda de absorción del grupo amonio entre  $2000$  y  $2200\text{ cm}^{-1}$  (Harry G Brittain, 2009, 2012; F. Fischer et al., 2016). Un análisis en este sentido sobre DE-HA es particularmente útil ya que el  $\Delta pK_a$  ( $pK_{a\text{BaseH}^+} - pK_{a\text{Ácido}}$ ) entre DE y HA es de 3.08. Este valor se encuentra en el punto intermedio entre sal y cocrystal, de acuerdo con el modelo de predicción descrito por Cruz-Cabeza que menciona que diferencias de  $\Delta pK_a$  menores a 0 tienen una muy alta probabilidad de que sean

cocristales, y valores de  $\Delta pK_a$  mayores a 4 tienen una muy alta probabilidad de ser sales. (Cruz-Cabeza, 2012)

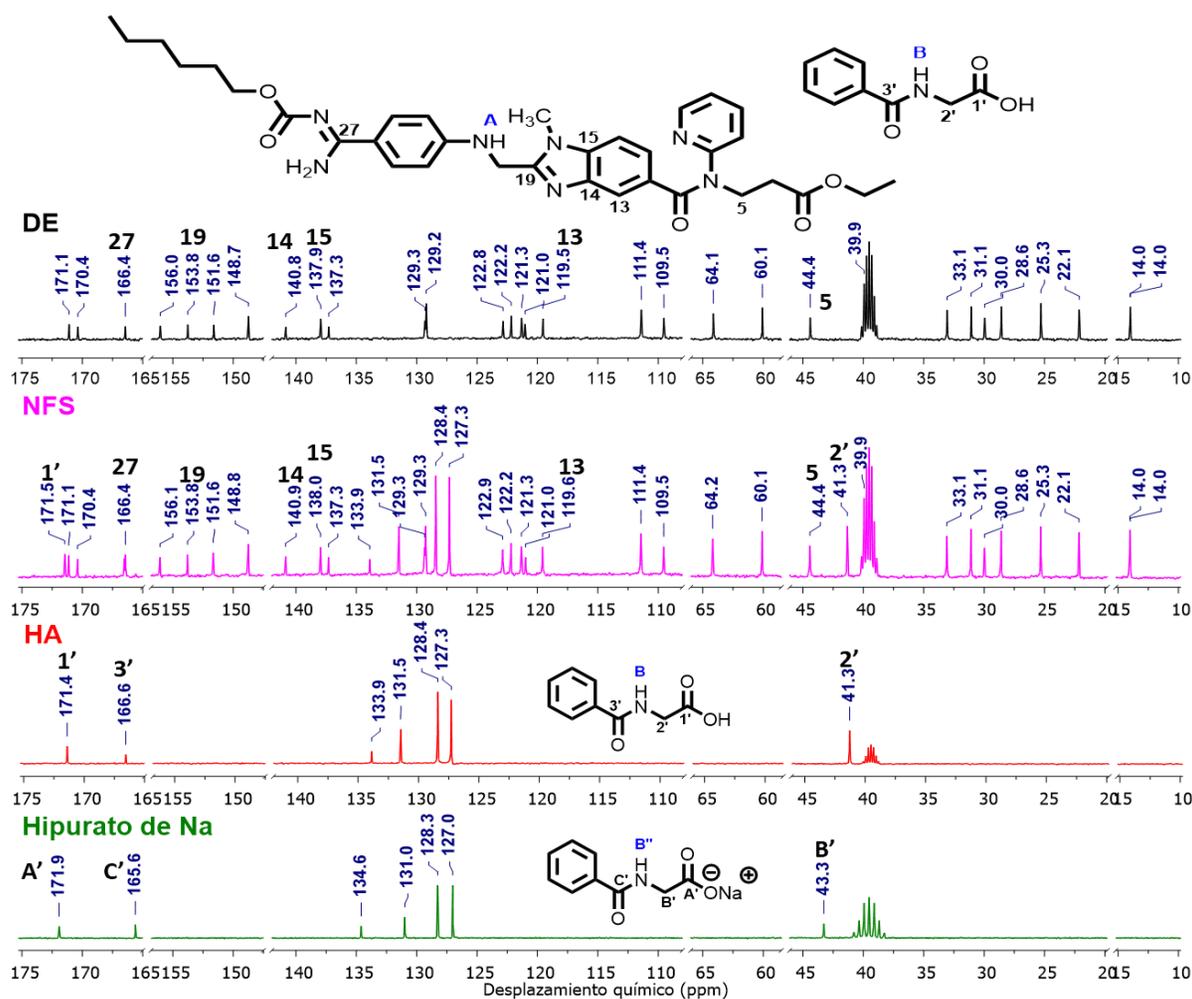
Con el objetivo de realizar una comparación directa con una sal del ácido hipúrico (en donde se encuentra la forma ionizada del ácido,  $\text{COO}^-$ ), se sintetizó el hipurato de sodio (**Anexo 5**). En el espectro de IR de este sólido, el grupo carboxilato presenta una primera banda a  $1639\text{ cm}^{-1}$ , en comparación al carbonilo del ácido neutro a  $1745\text{ cm}^{-1}$ . A su vez, también se observa la banda característica de la vibración simétrica del anión carboxilato entre  $1428\text{-}1390\text{ cm}^{-1}$ . Estas bandas del ion carboxilato no son obvias de distinguir en el espectro de la NFS DE-HA, por lo que con la información disponible no es posible establecer si la NFS es una sal o un cocristal.



**Figura 42** Espectroscopía IR para DE, HA, la NFS (DE-HA) y la sal hipurato de sodio

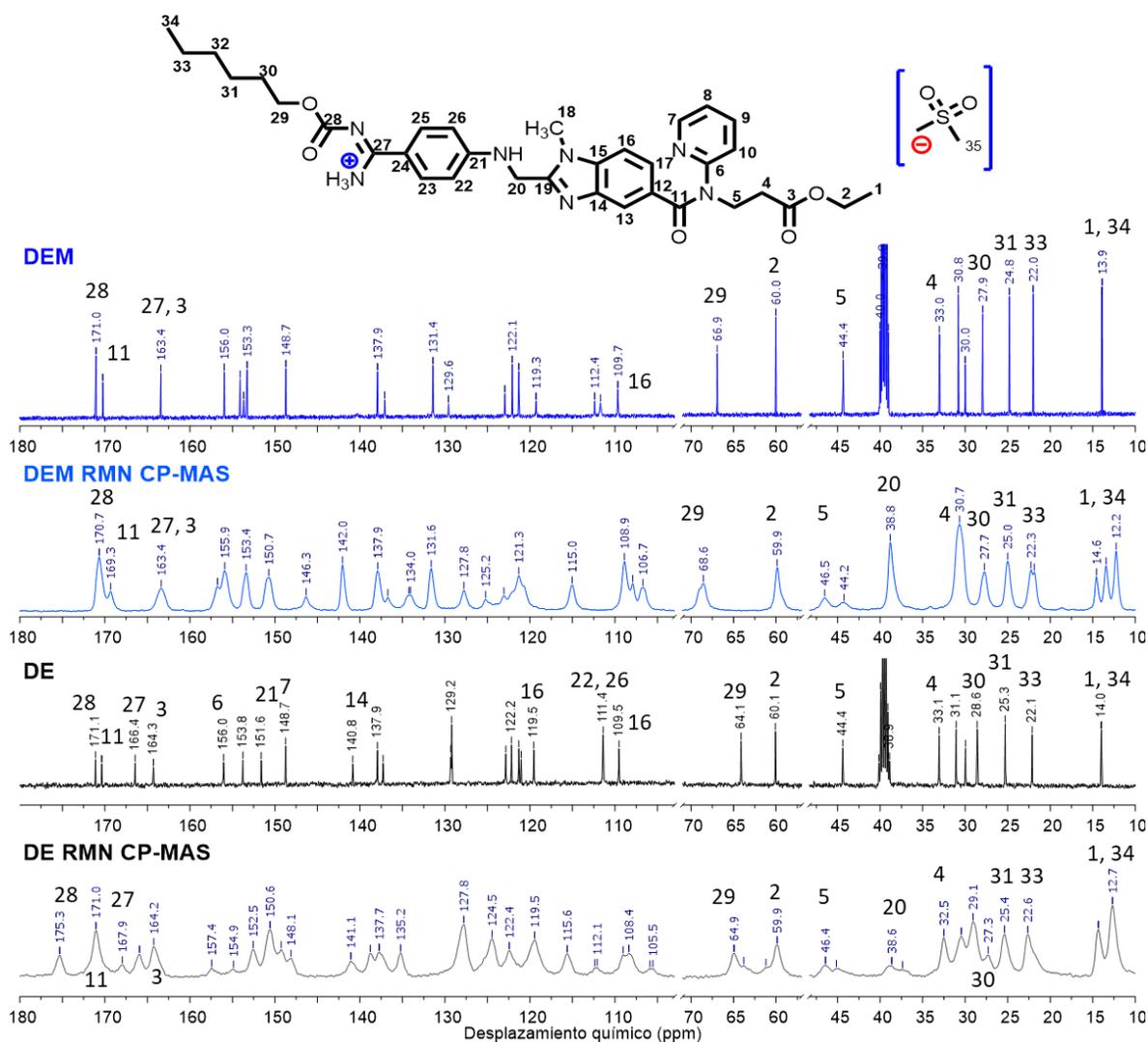
Otros estudios de caracterización de la NFS DE-HA se realizaron por RMN de  $^{13}\text{C}$  en solución y en estado sólido. El espectro de  $^{13}\text{C}$  en  $\text{DMSO-}d_6$  de las materias primas (DE y HA), del hipurato de sodio y de la NFS DE-HA se muestran en la **Figura 43**. El espectro de la NFS DE-HA [0.1 M] muestra todas las señales características de ambas materias primas, sin cambios significativos en los desplazamientos químicos. El contraste más relevante se centra entre el HA y la sal de hipurato de sodio, al comparar los núcleos de carbono

susceptibles de sufrir modificaciones en su ambiente químico por la ionización del ácido carboxílico. De forma particular, el metileno del carbono 2' aparece en 41.3 ppm en HA y en 43.3 ppm en el hipurato de sodio (B',  $\Delta\delta = + 2\text{ppm}$ ). A su vez, el carbono del ácido carboxílico (carbono 1') está desplazado desde 171.4 ppm en HA hacia 171.9 ppm en el hipurato de sodio (A',  $\Delta\delta = + 0.5\text{ppm}$ ). De estos resultados es notable que los componentes en solución provenientes de la NFS DE-HA no se encuentran ionizados, a pesar de la alta polaridad del disolvente que estabilizaría a las especies iónicas. Si la transferencia de protón en el HA y DE no se lleva a cabo en solución, como lo indican los desplazamientos químicos observados, se podría sugerir que la NFS DE-HA debe ser un cocrystal más que una sal en el estado sólido.



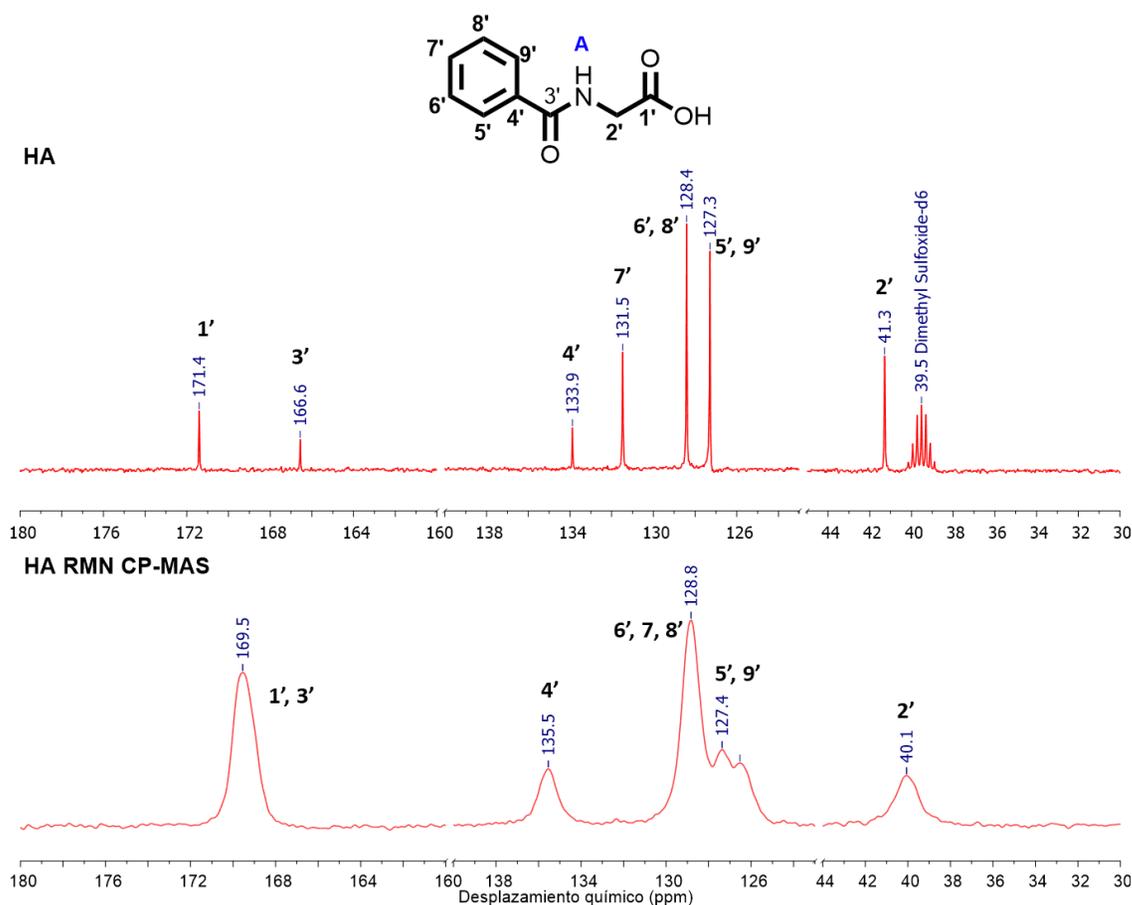
**Figura 43** Espectro parcial de RMN-<sup>13</sup>C correspondiente a DE, la NFS, el coformador HA, y la sal de hipurato de sodio (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz). En amarillo se resaltan las señales correspondientes al grupo metileno y al ácido carboxílico del ácido hipúrico.

El análisis por RMN de  $^{13}\text{C}$  también se realizó directamente en el estado sólido. Los espectros de la sal de mesilato de DE (DEM) y de la fase neutra DE se muestran en la **Figura 46**. Los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  en estado sólido son generalmente más complejos de asignar y analizar debido al ensanchamiento de las señales, así como los efectos del empacamiento cristalino que están ausentes cuando la molécula se encuentra en solución. Como se observa en la **Figura 44**, se pueden establecer similitudes principalmente en las señales de los extremos de ambos espectros. Sin embargo, las asignaciones de todos los núcleos de DEM y DE no son directas con respecto a las señales observadas en RMN en estado líquido, principalmente para aquellos núcleos aromáticos.



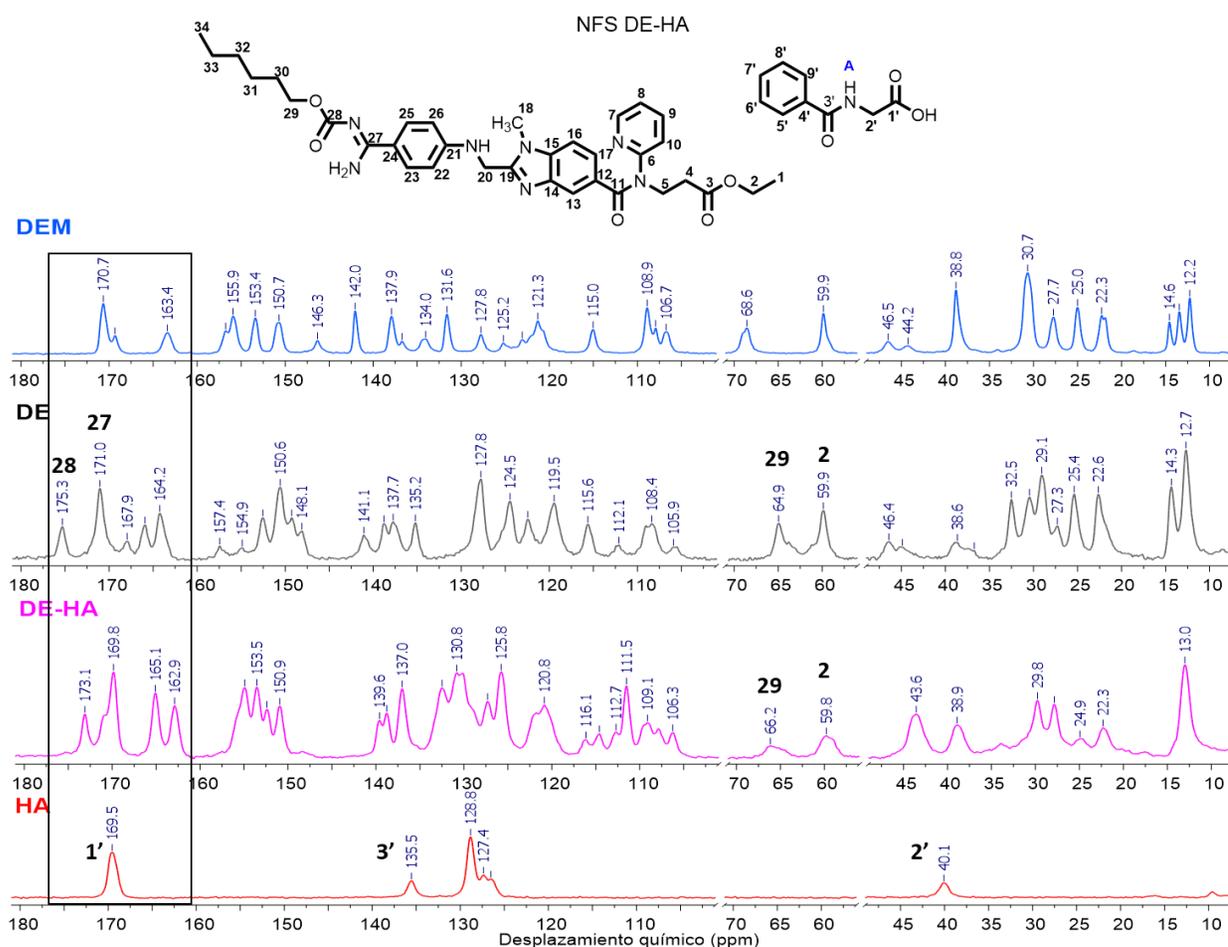
**Figura 44** Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  en líquidos y sólidos (RMN CP-MAS) de DEM y DE. La adquisición para ambos casos se realizó a 125 MHz. Se empleó DMSO- $d_6$  como disolvente en la RMN en solución, y en estado sólido se emplearon las señales del adamantano como referencia.

En la **Figura 45** se muestran los espectros de  $^{13}\text{C}$  en solución y sólido correspondientes a HA. En este caso debido a la simplicidad de la molécula es más sencillo realizar una correlación entre los desplazamientos de los núcleos de carbono en ambos espectros. Claramente en el espectro del sólido la señal del carbono del ácido carboxílico (en 1') y la del carbono de la amida aromática (en 3') aparecen como una sola en 169.5 ppm, esto debido a una posible agregación supramolecular en estado sólido. El desplazamiento químico observado para el metileno (2') alfa al ácido carboxílico en solución se encuentra en 41.3 ppm, mientras que en el espectro del sólido en 40.1 ppm. La señal para el carbono aromático unido a la amida (4') se observa en 133.9 y 135.5 ppm en solución y en estado sólido, respectivamente. Los carbonos del anillo aromático (5' – 9') en la RMN de sólidos se conjuntan en una sola señal ancha (~126.4-128.8 ppm).



**Figura 45** Comparación de los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  en solución y en estado sólido de HA. La adquisición para ambos casos se realizó a 125 MHz. Se empleó DMSO- $d_6$  como disolvente en la RMN en solución, y en estado sólido se emplearon las señales del adamantano como referencia.

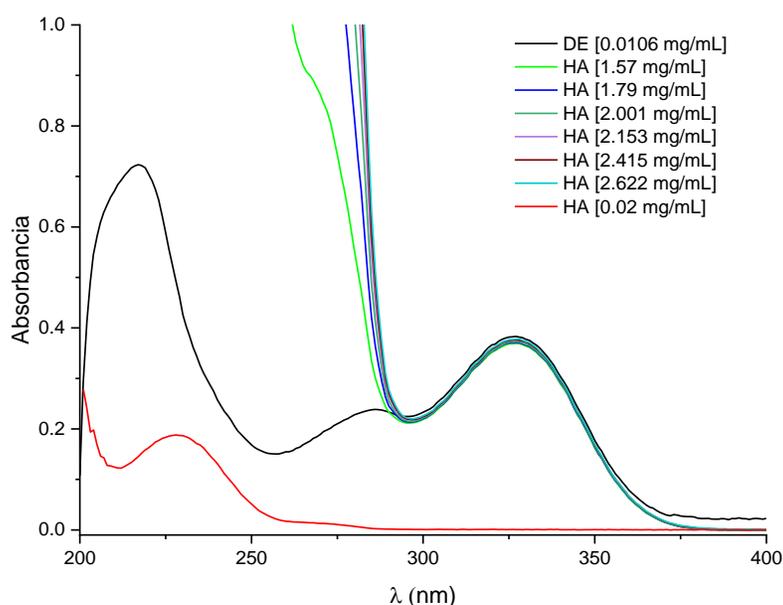
Finalmente, en la **Figura 46** se muestran los espectros en estado sólido de DEM, las materias primas (DE y HA) y de la NFS (DE-HA). No es concluyente el análisis comparativo en esta figura. Por ejemplo, la señal del carbono C27 que es el sitio de protonación en **DE**, no se puede distinguir inequívocamente si presenta corrimientos. Tampoco es claro si el C1' en la molécula HA sufre modificaciones, ya que aparece con un mismo desplazamiento químico que la señal del C27 de DE (señales en rectángulo en negro). Por otro lado, un indicativo de que el sólido de DE en la NFS se encuentra neutro podrían ser las señales de los carbonos C2 y C29 que se encuentran aisladas y son más fáciles de asignar. La señal del C2 en DE y DE-HA se mantiene en 59 ppm, mientras que la señal del C29 se desplaza de 65 ppm en DE a 68.6 ppm en DEM. Este último carbono se encuentra cerca del sitio de protonación (C27) en DEM es por ello por lo que se modifica; sin embargo, en la NFS DE-HA el C29 presenta un desplazamiento químico similar al de DE.



**Figura 46** Espectros de  $^{13}\text{C}$  CP-MAS de HA, DEM, DE-L2 y DE-HA. La adquisición se realizó a 125 MHz a temperatura ambiente, se emplearon las señales del adamantano como referencia.

## 7.5 Método para la cuantificación de DE por UV-Vis

Los estudios descritos al momento se han enfocado en la caracterización física y espectroscópica de la NFS DE-HA. Sin embargo, dado que se requiere evaluar el impacto biofarmacéutico de este sólido (DE-HA) en comparación con sus materias primas y la sal comercial (DEM), se estableció un método de cuantificación de DE en solución por medio de espectroscopía UV-Vis para las muestras provenientes de los estudios de solubilidad y disolución. En estudios previos se ha reportado que DE presenta máximos de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) en 225 nm (Arous & Al-mardini, 2019) y 325 nm (Hepsebah & Kumar, 2018) en medios acuosos. Por otra parte, HA se ha reportado con un  $\epsilon$  a  $\lambda_{\text{máx}} = 225$  nm (Ogata & Taguchi, 1986), pero también absorbe a 271 nm debido al grupo fenilo. El espectro de absorción UV-vis de DE y de DE en combinación con diferentes concentraciones relativas de HA se determinaron en un medio de BIS-TRIS pH 6. En la **Figura 47** se muestran los espectros de absorción UV-Vis de DE (en negro), de HA (en rojo) y de DE [0.0106 mg/mL] con diferentes alícuotas de HA. Se observa que DE solo presenta máximos de absorción en 292 nm y 336 nm. En la misma figura se observa que el máximo de absorción de HA se da a 225 nm. DE en la presencia de diferentes concentraciones de HA en solución, presenta una banda de absorción intensa a longitudes de onda < a 300 nm y la banda en 336 nm de DE no se ve afectada. Se estableció que las muestras para la realización de la curva de calibración y las subsecuentes de los estudios de disolución se cuantificarán a 336 nm.



**Figura 47** Espectros de absorción de DE en BIS-TRIS pH 6

A partir de una solución stock de DE [0.65 mg/mL] en buffer de BIS-TRIS pH 6 [0.074M], se realizaron curvas de calibración por duplicado con las concentraciones descritas en la **Tabla 10**.

**Tabla 10** Curva de calibración para la cuantificación de DE por UV-Vis a 336 nm en BIS-TRIS pH 6

Volumen tomado de la solución stock ( $\mu\text{L}$ )	Volumen de aforo (mL)	Concentración de DE [ $\mu\text{g/mL}$ ]
10	10	0.65
10	5	1.3
100	10	6.5
100	5	13
200	5	26

Para la calificación del método, se tomó como referencia la NOM-177-SSA1-2013(SSA, 2013), que estipula la evaluación de la linealidad, precisión, límite de detección y de cuantificación; así en la **Tabla 11** se muestran los resultados obtenidos. Según la norma, el coeficiente de correlación lineal debe ser  $\geq 0.999$ , mientras que el %SD debe ser  $\leq 3\%$  para métodos espectroscópicos (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2002). Se determinó el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) tomando en cuenta el promedio de las pendientes y la desviación estándar de los interceptos con cada curva de calibración. Para la determinación de ambos límites se emplearon las siguientes fórmulas:  $LD = 3.3(DE_b/\bar{m})$  y  $LC = 10(DE_b/\bar{m})$ , resultando valores de 0.065  $\mu\text{g/mL}$  y 0.198  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, donde  $DE_b = 0.0009$  y  $\bar{m} = 0.0330$ .

Los resultados obtenidos (**Tabla 11**) muestran que el método desarrollado cumple con los parámetros establecidos, por lo que es confiable para la cuantificación de DE de muestras provenientes de las pruebas biofarmacéuticas.

**Tabla 11** Calificación de la curva de calibración para cuantificar a DE. Curvas de calibración realizadas en buffer BIS-TRIS pH 6 [0.074M]

LINEALIDAD					PRECISIÓN		
[ $\mu\text{g/mL}$ ]	Abs 1	Abs 2	Promedio	SD	%CV	FR1	FR2
0.268	0.0087	0.0082	0.0085	0.0003	4.0228	0.0325	0.0307
0.67	0.0226	0.0225	0.0226	0.0001	0.2465	0.0337	0.0336
1.34	0.0429	0.0433	0.0431	0.0003	0.6836	0.0320	0.0323
6.7	0.2266	0.2203	0.2234	0.0044	1.9791	0.0338	0.0329
13.4	0.4477	0.4497	0.4487	0.0014	0.3135	0.0334	0.0336
26.8	0.8835	0.8824	0.8829	0.0008	0.0919	0.0330	0.0329
m	0.0330	0.0330	0.0330			$\bar{x}$	0.0329
b	0.0014	0.0004	0.0009			SD	0.0009
R	0.99996	0.99995	0.99996			%CV	2.7068
R <sup>2</sup>	0.99992	0.99990	0.99992				
$\bar{m}$	0.0330						
SD <sub>b</sub>	0.0007						
LD [ $\mu\text{g/mL}$ ]	0.0654						
LC [ $\mu\text{g/mL}$ ]	0.1980						

## 7.6 Caracterización Biofarmacéutica de la NFS DE-HA

### 7.6.1 Estudio de la Estabilidad de la NFS en Solución

El estudio de la estabilidad de una fase sólida en solución es ampliamente utilizada para la búsqueda de la forma más estable y para la búsqueda de polimorfos durante las etapas tempranas del desarrollo farmacéutico (Greco & Bogner, 2012).

Por ello se evaluó la estabilidad de fase de las materias primas (DE y HA) y de la NFS DE-HA en tres condiciones de pH fisiológicamente relevantes (solución de HCl pH 1.2 [0.063M], buffer de acetatos pH 4.5 [0.1M] y buffer de fosfatos pH 6 [0.1M]). Para ello entre 25 y 45 mg de cada sólido se combinaron con 2 mL de los medios anteriores (37°C y 100 rpm), se tomaron muestras a los 5 minutos y a las 24 horas. Bajo estas condiciones quedó sólido remanente que fué filtrado y se dejó secar a  $T_{\text{amb}}$  para su posterior análisis por DRXP.

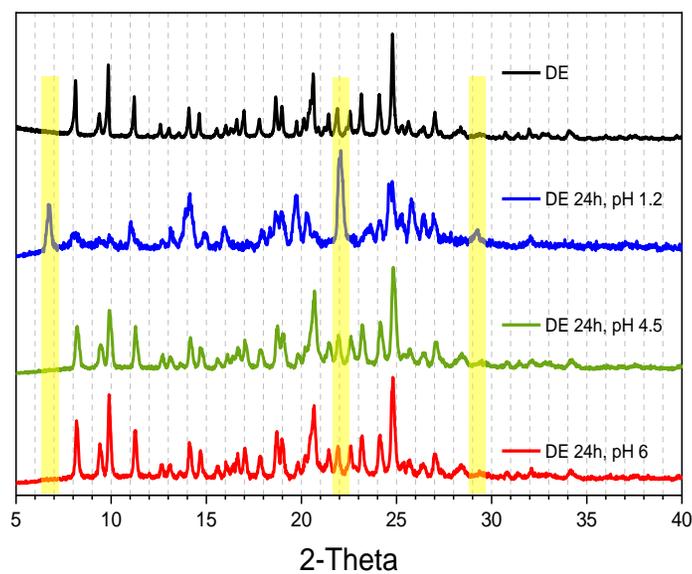
En la

**Figura 48** se muestran los patrones de DRX de los resultados obtenidos de los estudios de estabilidad de fase en solución bajo la influencia de los medios antes mencionados. En el inciso **a)** se muestran los patrones de DRXP correspondientes a DE. En las secciones en amarillo (6.72, 22.06 y 29.25° 2-Theta) se destacan aquellos picos nuevos que aparecen después de 24 h a pH 1.2. Es posible que a este pH se esté formando la sal clorhidrato de

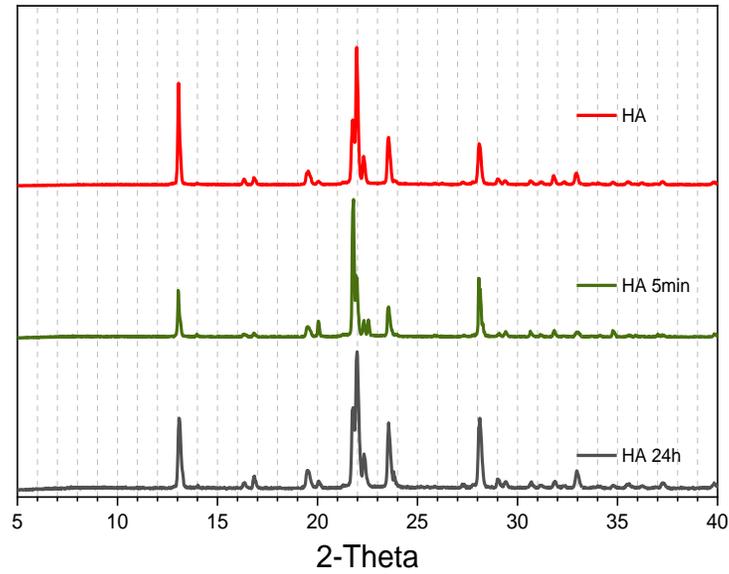
DE, ya que a pH ácido DE se encuentra doblemente protonado y se ha observado la generación de sales. Por el contrario, los patrones de DRXP de DE a pH 4.5 y pH 6, respectivamente, se mantienen similares al del IFA neutro, lo que indica que no presentan transformación de fase.

En el inciso **b)** se muestran los resultados de la estabilidad del coformador HA en buffer de fosfatos pH 6 [0.1M]. Se muestra que HA no se transforma a este pH, pues los patrones de difracción son similares al de la materia prima.

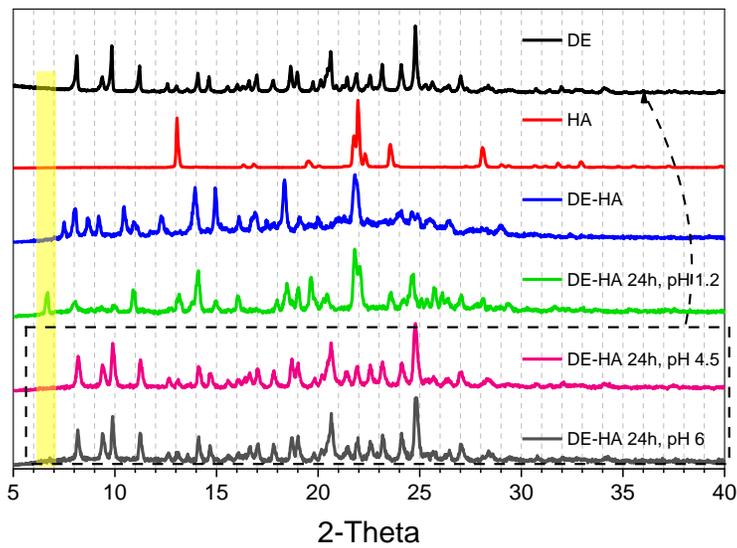
En el inciso **c)** se muestran los patrones de difracción de DE-HA a las 24 h en los medios antes mencionados. Se observa que DE-HA sufre transformación de fase a pH 1.2, ya que el sólido resultante muestra un patrón de difracción similar al del experimento con DE (inciso **a)**) en donde se observan picos de las materias primas como una mezcla física, así como un nuevo pico en 6.63 2-Theta (resaltado en amarillo). En los otros medios explorados (a pH 4.5 y 6) el patrón de difracción de la muestra sólida DE-HA tampoco se conserva después de 24 h. El sólido remanente presenta el patrón de difracción de DE. Lo anterior parece indicar que el componente más soluble (HA) pasa al medio acuoso, quedando DE como sólido remanente. Sin embargo, más adelante en los estudios de disolución se demostrará que también hay una solubilización parcial de DE en el medio acuoso a pH 6 (ver 7.7.3.3).



a)



b)



c)

**Figura 48** Comparación de los patrones de DRXP de a) DE, b) HA y en c) DE-HA después del estudio de estabilidad de fase en diferentes medios farmacéuticamente relevantes (a 37 °C y 100 rpm). En las secciones en amarillo (en a y c) se muestran los picos nuevos debido a que los sólidos sufren una transformación de fase en solución. En el recuadro punteado en c se muestran aquellos picos provenientes de DE-HA que sufren transformación de fase a DE a pH 4.5 y 6

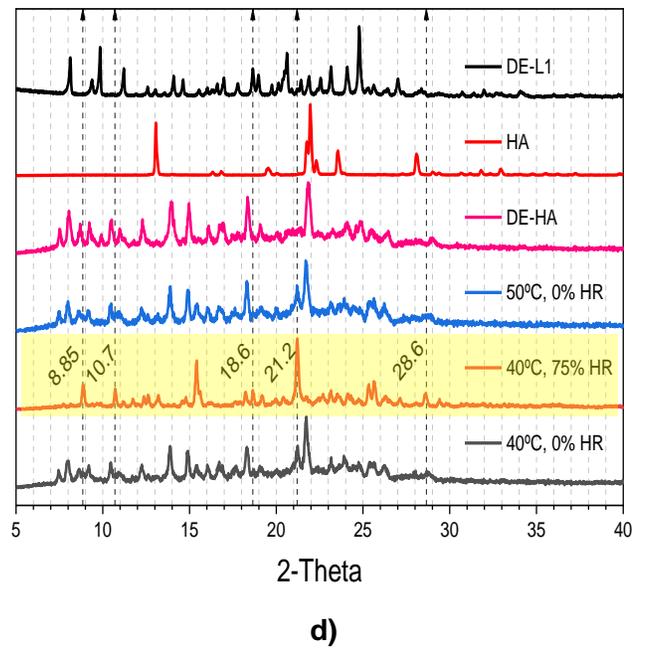
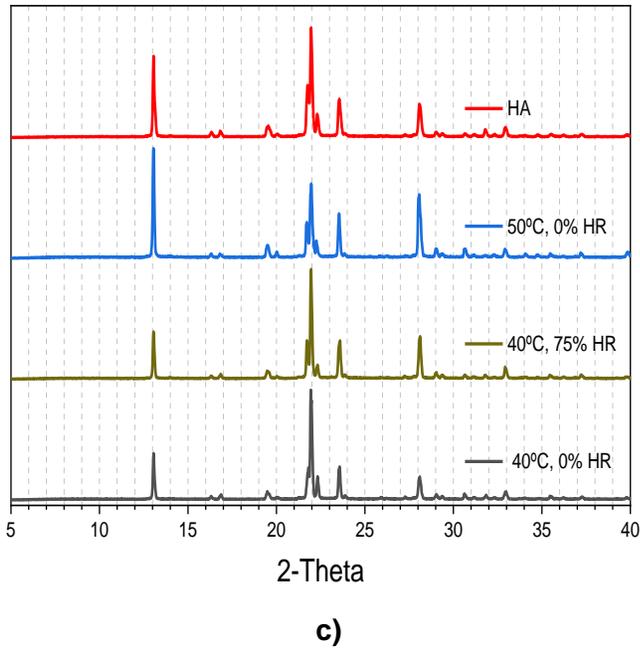
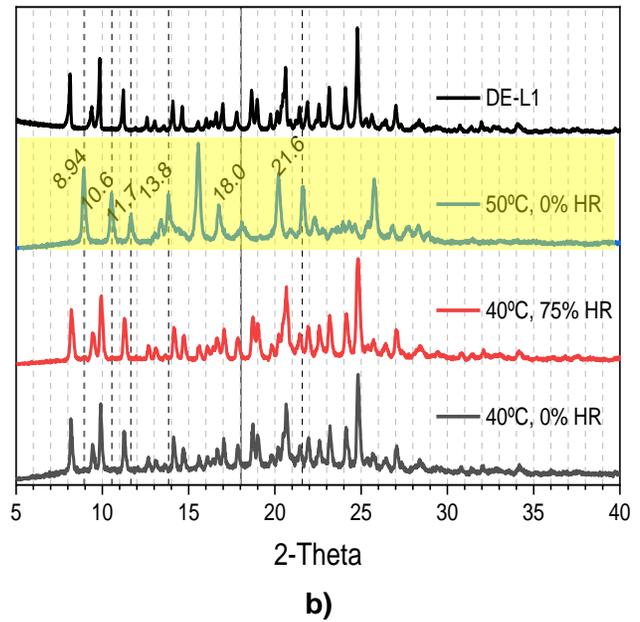
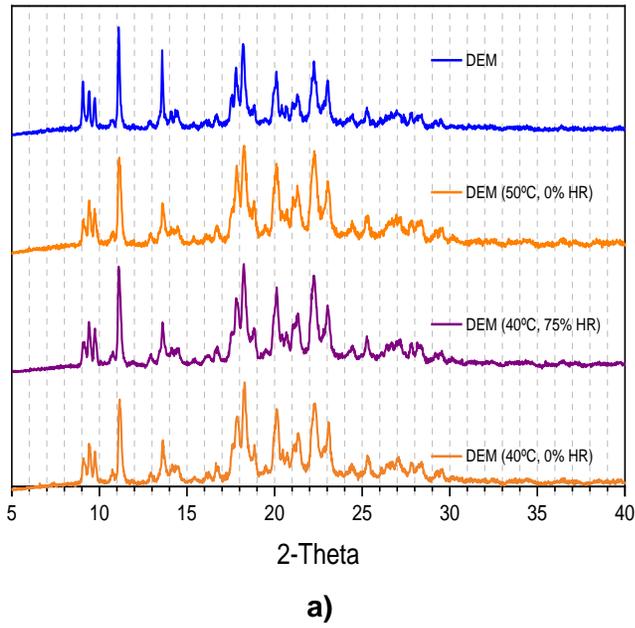
En lo sucesivo las pruebas biofarmacéuticas se realizarán a pH 6, ya que DE se encuentra en su forma neutra a este pH. En un principio se utilizó buffer de fosfatos a pH 6; sin

embargo, estudios piloto de disolución mostraron que este medio tiene poca capacidad buffer con este fármaco y no logra mantener el pH constante, incluso utilizando una concentración mayor a 0.1 M. Debido a esto, se decidió trabajar con un buffer de BIS-TRIS, el cual es una amina terciaria con un  $pK_a$  asociado de 6.46, lo cual lo hace adecuado para trabajar en un rango de pH de 5.8 and 7.2.

## 7.6.2 Estabilidad indicativa

El estudio de estabilidad indicativa se realizó a la sal comercial (DEM), a las materias primas (DE-L1 y HA) y a la NFS (DE-HA). Para dicho experimento se almacenan a los sólidos de interés (30 mg) durante un mes bajo condiciones de estrés de temperatura y humedad controlada (40°C calor seco, 50°C calor seco y 40°C con 75% de HR). Finalmente, dichos sólidos se analizan por DRXP para evaluar su estabilidad de fase. En la **Figura 49** se muestran los análisis de las muestras mediante DRXP. En el inciso **a)** se muestran los difractogramas de RX correspondientes a DEM, los cuales no presentaron cambios durante su almacenamiento bajo las tres diferentes condiciones de estrés ambiental. En el inciso **b)** se muestran los difractogramas correspondientes a DE. Se muestra que cuando el IFA se almacena a 40 °C, ya sea en calor seco o en calor húmedo, éste es estable. Por otro lado, cuando se almacena a 50 °C y 0% HR DE sufre una transformación de fase. Con los resultados obtenidos bajo estas condiciones de almacenamiento se muestra como el factor humedad no es relevante para que exista una transformación de fase en el IFA; sin embargo, cuando se aumenta la temperatura de 40°C a 50°C, DE pierde estabilidad y se transforma a una entidad sólida diferente al sólido de partida, observándose nuevos picos marcados en las secciones en amarillo (8.88, 10.55, 11.69, 13.83, 18.08, 20.11 y 21.59° 2-Theta).

En cuanto al monitoreo de la estabilidad de fase del coformador **c)** se muestra que éste no sufre transformación alguna bajo las condiciones de temperatura y humedad relativa a las que se almacenó. Finalmente, en **d)** se muestran los difractogramas de DE-HA. Esta NFS mantuvo su identidad al estar almacenada a 40 °C (calor seco) y a 50 °C (calor seco); sin embargo, sufre transformación de fase cuando se almacena a altas concentraciones de humedad relativa (40 °C y 75% HR). Así en el difractograma del recuadro en naranja se muestran los nuevos picos (8.85, 10.7, 18.6, 21.2 y 28.6° 2-Theta) correspondientes al sólido que se transformó. En la **Tabla 12** se resumen los resultados de este estudio, los cuales son de relevancia para el desarrollo farmacéutico futuro.



**Figura 49** Difractogramas de la estabilidad indicativa de a) DEM, b) DE-L1, b) HA y c) DE-HA almacenados durante un mes bajo diferentes condiciones de estrés de temperatura y humedad

**Tabla 12** Resultados de los estudios de la estabilidad indicativa para DEM, DE, HA y DE-HA

Muestra	50 °C calor seco	40 °C calor seco	40°C y 75% humedad relativa
DEM	✓	✓	✓
DE-L1	✗	✓	✓
HA	✓	✓	✓
DE-HA (1:1)	✓	✓	✗

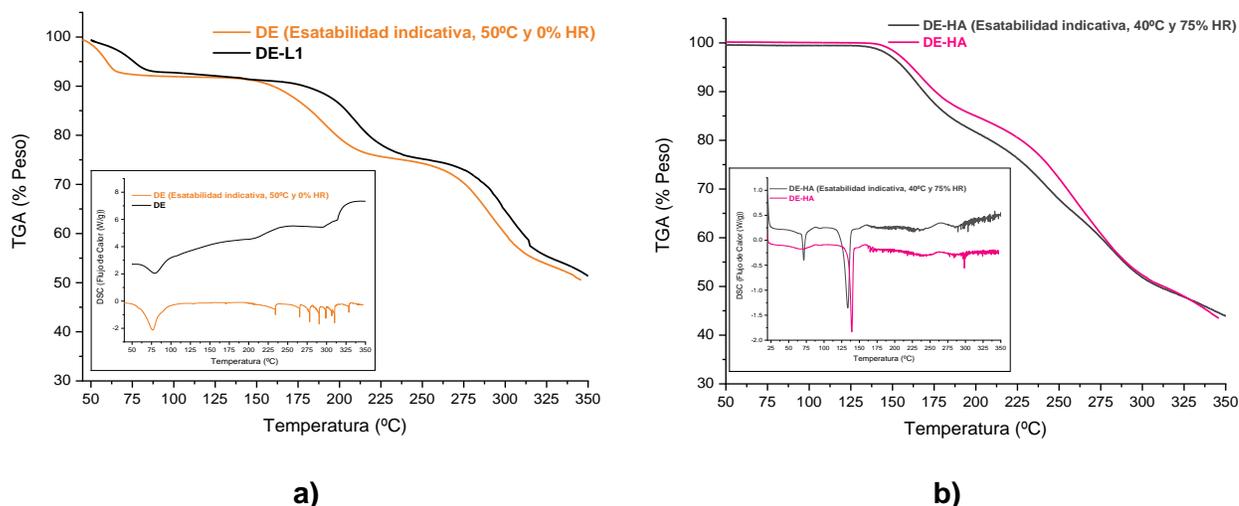
✓ La fase se mantuvo estable bajo las condiciones de análisis

✗ Se observó un cambio en el patrón de DRXP

Las muestras que sufrieron transformación de fase en los estudios de estabilidad indicativa se analizaron mediante análisis térmico (DSC-TGA) y espectroscopia RMN en solución ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) para establecer la identidad de los sólidos resultantes. A continuación, en la **Figura 50** se muestran los análisis térmicos correspondientes a DE (50°C, calor seco) y a DE-HA (40°C y 75% HR). En **a)** se muestran los eventos térmicos típicos de DE-L1 como materia prima, en el TGA se observa una pérdida de masa inicial de 7.7% ( $T_{\text{onset}}$  71 °C). Este evento se ve reflejado en el DSC a un  $T_{\text{peak}}$  a 76°C ( $\Delta H = 87.68 \text{ J/g}$ ). Por su parte, DE-L1 después de haber sido almacenado a 50°C y 0% HR muestra eventos térmicos similares a los antes mencionados; con una pérdida de masa inicial (7.7%,  $T_{\text{onset}}$  47 °C), seguido de una serie de descomposiciones típicas del IFA conforme aumenta la temperatura. En el DSC se muestra que dicho producto del almacenamiento funde a  $T_{\text{peak}} = 76.72^\circ\text{C}$  ( $\Delta H = 209.5 \text{ J/g}$ ). Estos resultados indican que DE-L1 mantiene su grado de hidratación pero sufre una transformación de fase debido a que el sólido resultante presenta una distinta estabilidad térmica, y podría corresponder a otra fase polimórfica de DE; o que durante el proceso de almacenamiento DE-L1 sufre deshidratación y posterior al mismo vuelve a absorber agua del ambiente

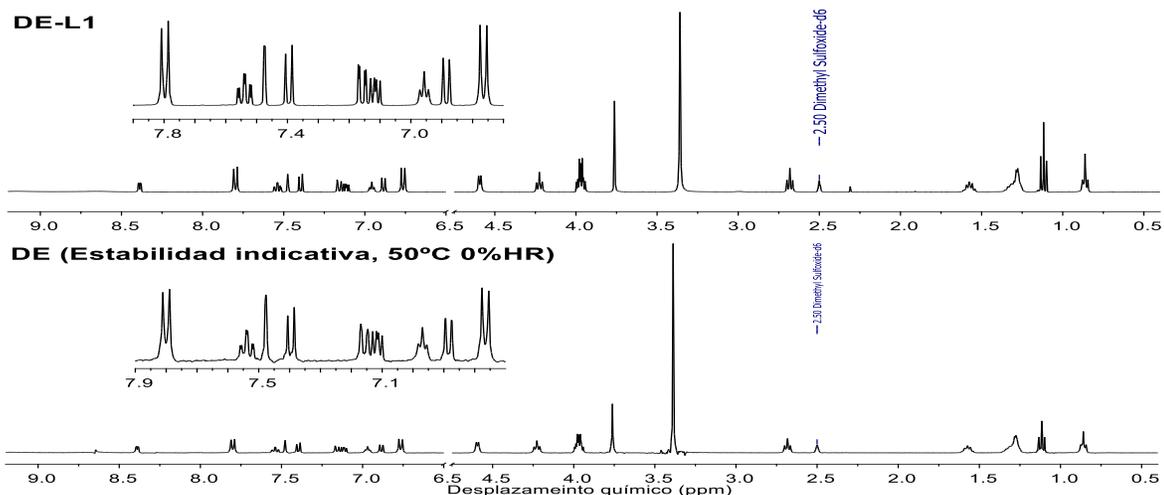
En **b)** se muestran los termogramas correspondientes a la NFS DE-HA antes y después del almacenamiento (40°C, 75% HR). En el TGA se observa que ambos son sólidos anhidros ya que no hay pérdida de masa desde 50 °C hasta 135 °C, en donde sufren una serie de degradaciones en etapas. En el DSC de la NFS DE-HA se observa un evento endotérmico a  $T_{\text{peak}} = 139.2 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\Delta H = 42.9 \text{ J/g}$ ) que podría corresponder a su punto de fusión. Por otra

parte, en el DSC de DE-HA después del almacenamiento (40°C, 75% HR) presenta dos eventos endotérmicos, el primero a  $T_{\text{peak}} = 71.3 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\Delta H = 9.9 \text{ J/g}$ ) y el segundo evento endotérmico a  $T_{\text{peak}} = 133.5 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\Delta H = 68.8 \text{ J/g}$ ) puede corresponder a la fusión del sólido. Estos datos térmicos indican que la NFS DE-HA sufre transformación de fase durante el tratamiento térmico en presencia de humedad.

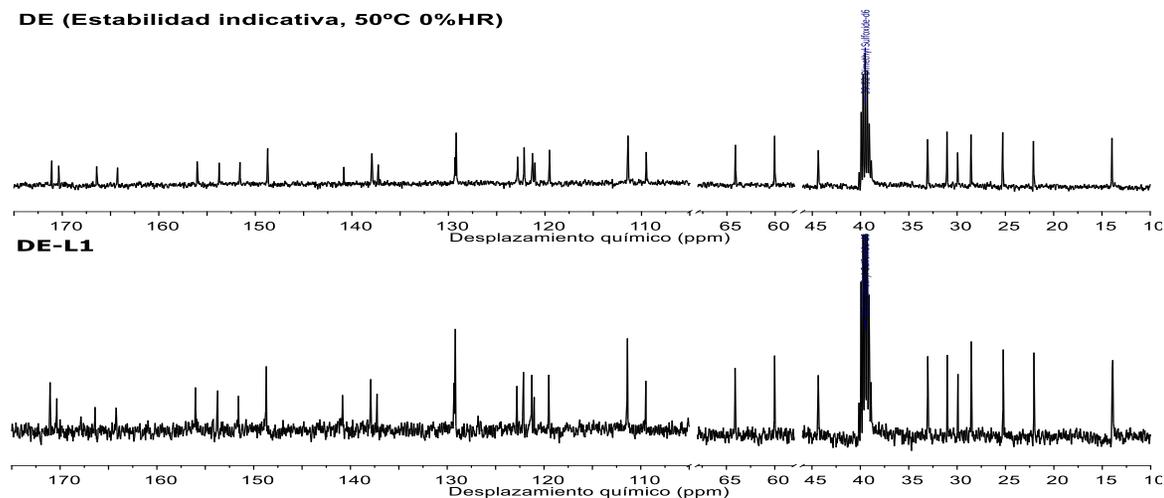


**Figura 50** Análisis térmicos de a) DE y del sólido resultante de la estabilidad indicativa; así como en b) la NFS DE-HA y el sólido resultante de la estabilidad indicativa.

Con el fin de establecer la estabilidad química de la molécula de DE-L1 en los sólidos que sufrieron transformación de fase en la prueba de estabilidad indicativa, se realizó su análisis por medio RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en solución. En la **Figura 51** se muestran los espectros de protón (en  $\text{DMSO-}d_6$ ) para DE-L1 en su fase inicial y después de haber sido almacenado a 50°C y 0% HR (inciso a), así como los espectros de carbono de ambos sólidos (en el inciso b). En estos espectros se observan el mismo número y tipo de señales correspondientes a DE (ver sección 7.5), lo que indica que se mantuvo su integridad química en el curso del tratamiento térmico. En conjunto con los resultados del análisis térmico se puede inferir que DE a 50 °C sufre una transformación de fase hacia otro polimorfo con el patrón de difracción de RX que se ilustró anteriormente en la Figura 49 (b).



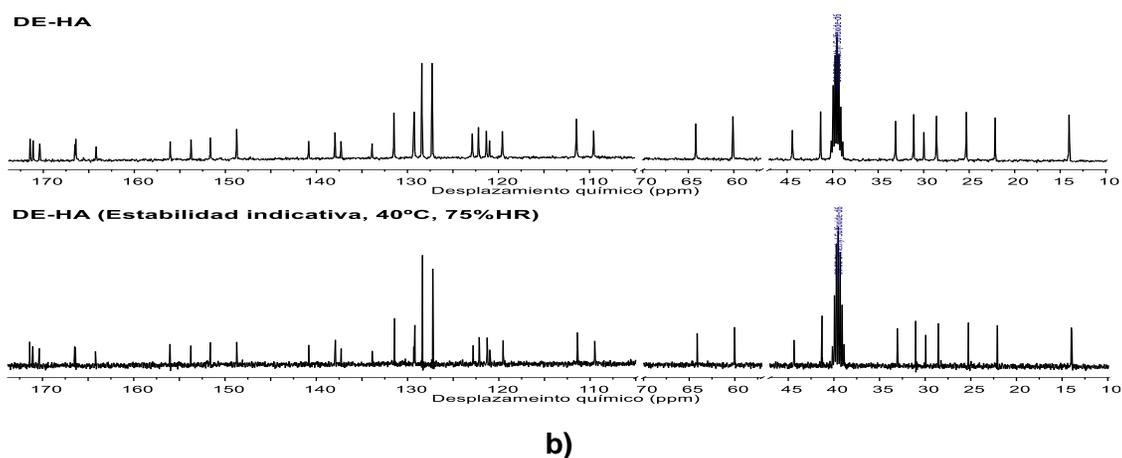
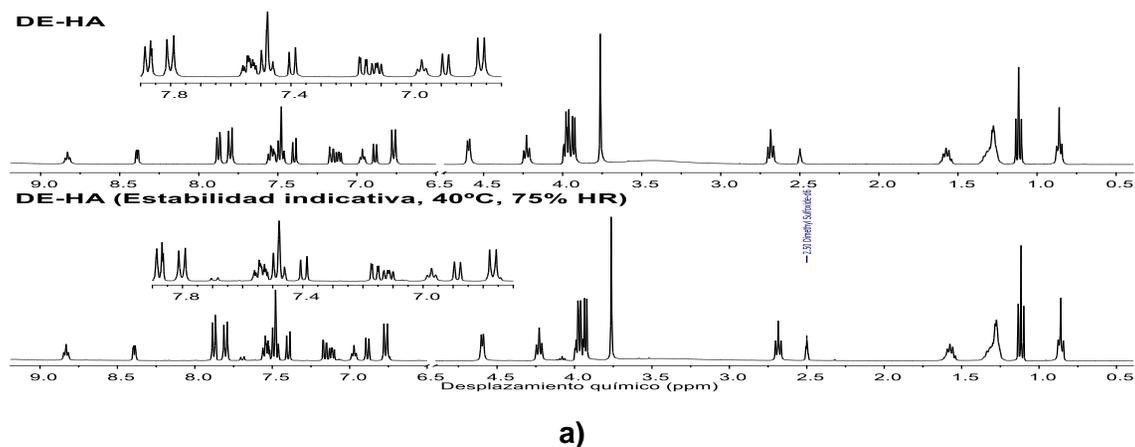
a)



b)

**Figura 51** Monitoreo de la estabilidad de DE-L1 y del producto que sufrió transformación de fase a 50 °C y 0% HR mediante RMN, en a)  $^1\text{H}$  y b)  $^{13}\text{C}$ . Experimentos realizados a 400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ , en  $\text{DMSO-d}_6$ .

El mismo análisis de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en solución se realizó para el producto de la NFS DE-HA proveniente de la prueba de estabilidad indicativa a 40°C, 75% HR. Dichos resultados se muestran en la **Figura 52**. En este caso también se observan el mismo número y tipo de señales en ambas muestras. Con esta información se concluye que la NFS DE-HA se conserva sin degradación química; sin embargo, bajo las condiciones de estrés en las que fue expuesta pudo haber generado alguna transición polimórfica que es evidente por difracción de rayos X de polvos (ver Figura 49d).



**Figura 52** Monitoreo de la estabilidad de la NFS DE-HA y de su producto que sufre transformación de fase (40°C y 75% HR) mediante RMN, en a)  $^1\text{H}$  y en b)  $^{13}\text{C}$ . Experimentos realizados a 400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ , en  $\text{DMSO-d}_6$ .

## 7.6.3 Evaluación del perfil de disolución mediante disolución de polvos

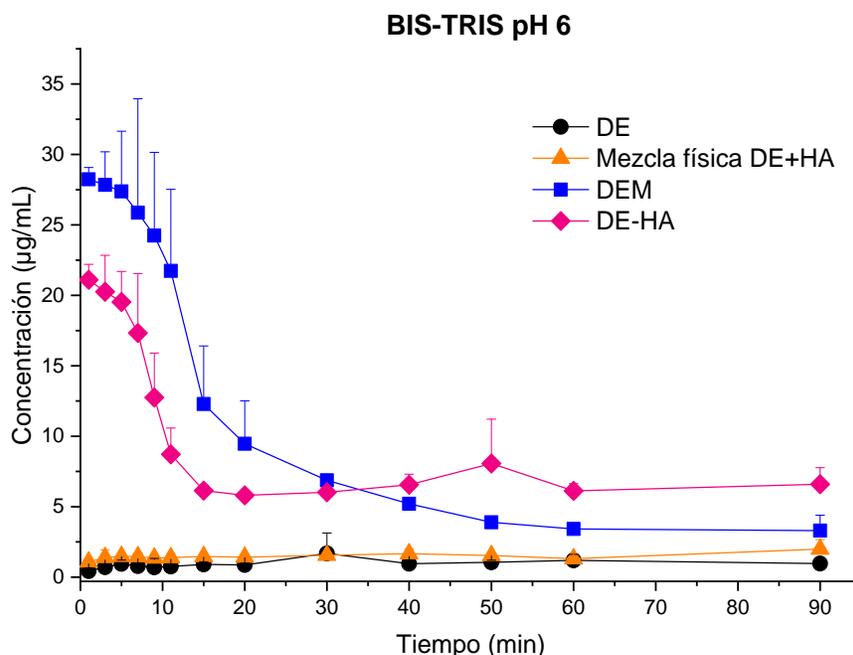
### 7.6.3.1 Disolución de polvos

Los experimentos de disolución de polvos se llevaron a cabo bajo condiciones *no sink* a  $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$  y 90 rpm en medio de disolución BIS-TRIS pH 6. Cada prueba de disolución se realizó por triplicado. Se emplearon 10 mL del medio antes mencionado, al cual se agregaron 200 mg del sólido de interés ((DEM, DE-L2, NFS DE-HA o mezcla física). Se tomaron alícuotas de 1 mL en tiempos definidos con reposición de medio, las cuales fueron filtradas y el sólido remanente se resguardó para su posterior análisis por DRXP. La

concentración del IFA disuelto se determinó a partir de la solución filtrada. En la **Figura 53** se muestran los perfiles de disolución de los diferentes sólidos evaluados (DEM, DE-L2, Mezcla física DE-HA, y NFS DE-HA). En negro se muestra el perfil de disolución de DE. Se observa que la concentración de éste se mantuvo constante durante todo el experimento, lo que indica que la solubilidad intrínseca de DE se alcanza rápidamente ( $S_0 = 1.6 \mu\text{g/mL}$ ). En otro experimento se evaluó la disolución de la mezcla física de DE con HA en proporción molar 1:1. Con el perfil de disolución de la mezcla física se alcanzaron concentraciones disueltas de DE como las observadas anteriormente (DE-L2), por lo que no se aprecia un cambio significativo por la presencia de HA. El perfil de disolución de la NFS DE-HA muestra en los minutos iniciales un aumento significativo de las concentraciones del IFA ( $22 \mu\text{g/ml}$ ). La supersaturación de DE disminuye conforme avanza el experimento hasta un nivel constante de  $\approx 7 \mu\text{g/mL}$  en tiempos mayores a 30 minutos.

En la **Figura 53** también se incluye el perfil de disolución de la sal comercial DEM, para comparar en condiciones semejantes con el comportamiento de la NFS DE-HA. El perfil de la sal DEM muestra en los primeros minutos concentraciones mayores de fármaco disuelto ( $\approx 28 \mu\text{g/mL}$ ) en comparación con DE. La supersaturación de DEM disminuye gradualmente con el paso del tiempo, obteniéndose valores constantes a partir de los 50 minutos ( $\approx 4 \mu\text{g/mL}$ ). Es notable que los perfiles de disolución de la NFS DE-HA y de la sal DEM muestran un comportamiento similar, alcanzando soluciones supersaturadas durante los primeros tiempos del ensayo, que disminuye conforme avanza el experimento.

El análisis de PXRD de los sólidos aislados mostró que DE fue estable durante el experimento, lo que indica que la solubilidad determinada corresponde con certeza a la de DE. Por su parte, el estudio de DEM sólido mostró que éste se transforma hacia DE posterior a los 5 minutos de iniciado el experimento. Dicha transformación de fase correlaciona con el perfil de disolución observado, donde a tiempos cortos se alcanza una alta concentración de fármaco disuelto debido a la disolución de DEM, y a tiempos posteriores se observa una baja concentración en solución que es un poco mayor a la solubilidad de DE. Este mismo fenómeno se observó en la NFS DE-HA, donde a tiempos cortos se observa una alta concentración debido a la disolución del sólido de partida, y posteriormente se observan bajas concentraciones que son similares a la solubilidad de DE. Las concentraciones obtenidas sobre las cantidades disueltas de DE fueron corregidas por el factor atribuido a la extracción de DE en cada toma de muestra, y la reposición con medio libre de DE.



**Figura 53** Perfiles de disolución de polvos en condiciones no-sink para DE-L2, DE+HA (mezcla física 1:1), DEM y DE-HA en BIS-TRIS pH 6, 37 °C n=3 +DE.

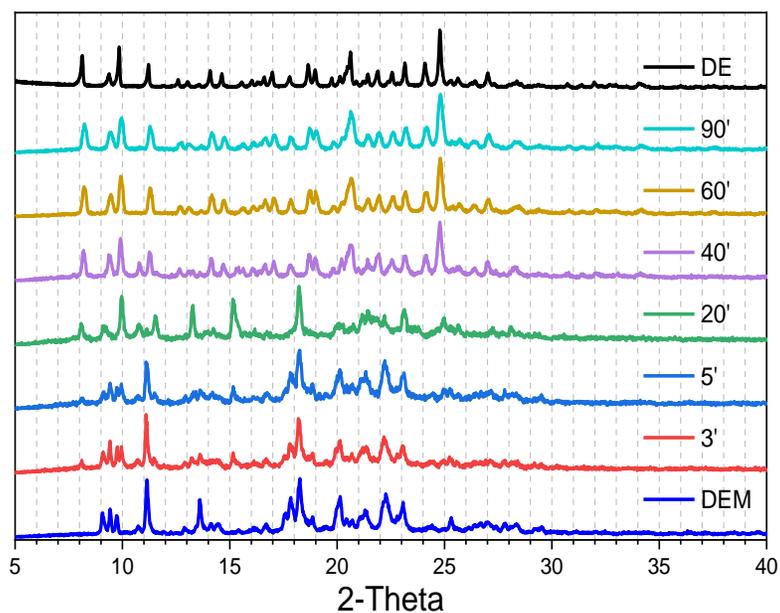
### 7.6.3.2 Estabilidad de fase

El monitoreo de la estabilidad de fase en experimentos de disolución de polvos es importante ya que se demuestra la capacidad de un sólido de interés farmacéutico de mantener sus propiedades físicas bajo ciertas condiciones de procesamiento durante un tiempo específico. Con ello se determina si los sólidos obtenidos de las pruebas de disolución y/o solubilidad permanecen en la misma fase cristalina que el sólido de partida.

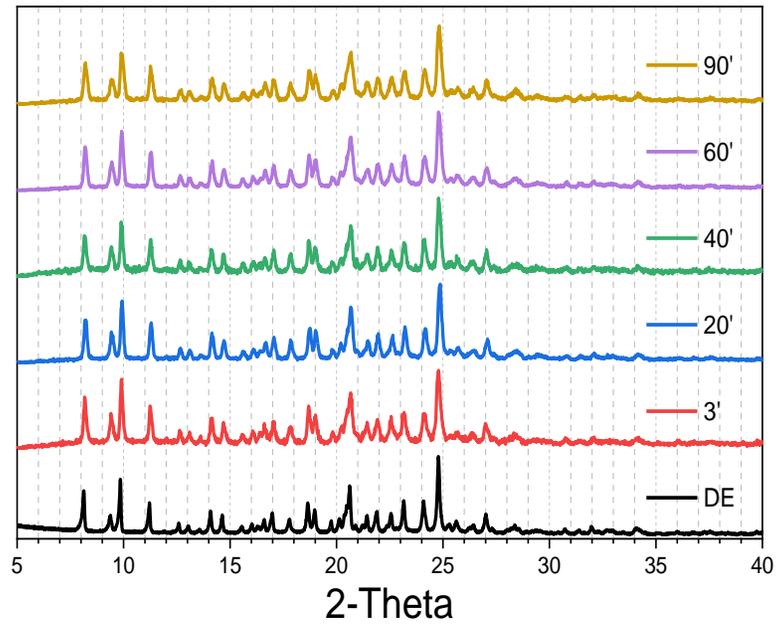
Los sólidos aislados en el transcurso de las pruebas de disolución de polvos que se llevaron a cabo en medio BIS-TRIS a pH 6 se analizaron por DRXP. El análisis se realizó con los sólidos aislados hasta los 90 minutos. En la **Figura 54 a** se comparan los patrones de DRXP de los sólidos aislados de la prueba de disolución de DEM. Este se mantuvo estable durante los primeros cinco minutos. En el análisis del difractograma correspondiente al minuto 20 se observan picos de difracción de DEM y algunos otros que no se observan en la materia prima de partida. Los patrones de difracción correspondientes a los minutos 40, 60 y 90 son completamente diferentes al de la materia prima de DEM. Esto indica que DEM sufre transformación de fase mediada por el medio de disolución hacia DE. Se observa que a partir de los 40 minutos ya se transformó completamente en DE-L1.

Los patrones de difracción del ensayo correspondientes a DE (**Figura 54 b**) muestran que el IFA se mantiene estable en el buffer de BIS-TRIS pH 6 durante todo el experimento (mismo patrón de PXRD), lo cual tiene sentido ya que DE es una base con un  $pK_a$  de 4, por lo que a pH de 6 la especie que predomina es la forma neutra.

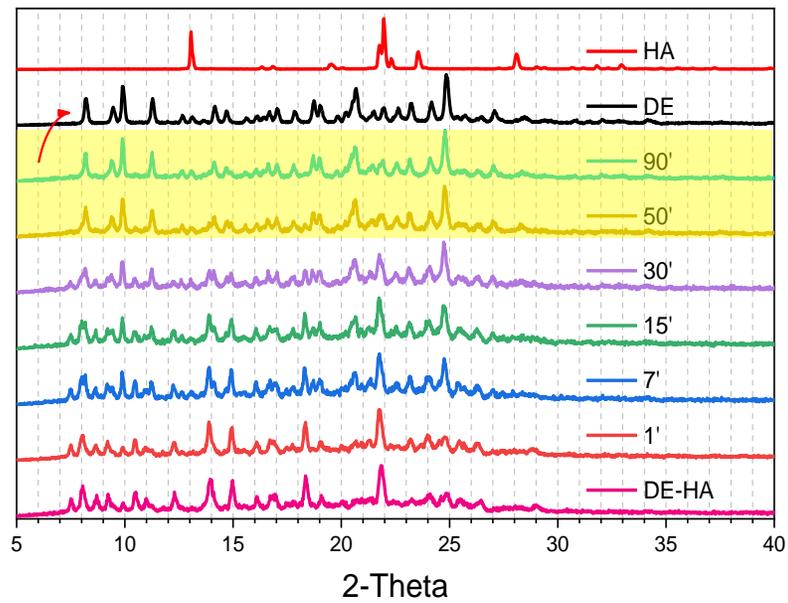
En cuanto a la estabilidad de fase de DE-HA (**Figura 54 c**), se observa que mantiene su identidad durante los primeros minutos; sin embargo, desde el minuto 7 hasta el 30 se ve un patrón de DRX que concuerda con el de una mezcla de fases entre DE-HA y DE, lo que sugiere que en dicho rango de tiempo se tiene una mezcla de ambas fases sólidas. Esto indica que DE-HA sufre transformación de fase mediada por el medio de disolución, y que durante dicho tiempo de análisis se observa una transformación parcial del sólido. Los sólidos recuperados a tiempos posteriores ( $t > 30$  min) muestran solo el patrón de PXRD de DE-L1, lo que indica que todo el sólido de DE-HA se ha transformado en DE (difractogramas resaltados en amarillo).



a)



b)



c)

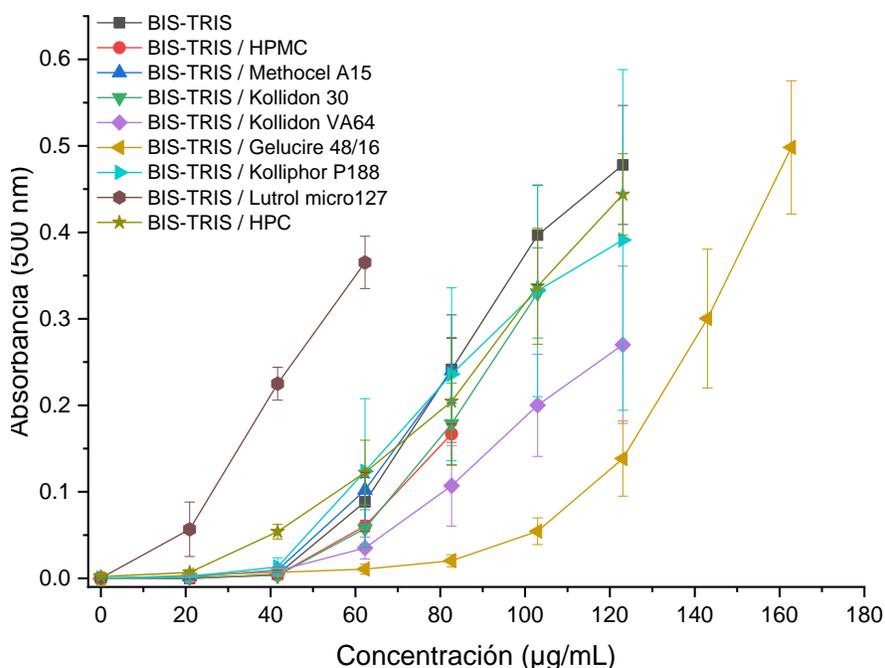
**Figura 54** Análisis de la estabilidad de fase mediada en solución de (a) la sal comercial (DEM), (b) del IFA neutro (DE-L2) y (c) de la NFS (DE-HA) en buffer BIS-TRIS pH 6 a 37 °C.

### 7.6.3.3 Selección de polímeros inhibidores de la precipitación

Se ha identificado que la habilidad y la generación de la supersaturación en una mezcla fármaco-polímero es dependiente del tipo y de la concentración del polímero en cuestión (Pinto et al., 2019). En los últimos años, se han empleado estrategias para mejorar la solubilidad de aquellos IFA's con muy baja solubilidad, entre las cuales se encuentran la generación de dispersiones sólidas amorfas. Éstas generan soluciones con concentraciones de IFA disuelto mayores que los sistemas cristalinos. Estos sistemas amorfos presentan un estado de alta energía y movilidad molecular, por lo que mejoran sus propiedades fisicoquímicas; generalmente exhiben una solubilidad aparente mejorada, lo cual se ve reflejado en una mayor velocidad de disolución. Sin embargo, el gran inconveniente que tienen es que son metaestables, por lo que pueden transformarse a su forma cristalina que es más estable (D. D. Sun & Lee, 2015).

Para continuar con el desarrollo farmacéutico de este proyecto, se evaluaron diferentes familias de polímeros para determinar el punto de saturación de DE en medio BIS-TRIS pH 6 [0.074M] con y sin polímero predisuelto al 0.5% utilizando la técnica "Solvent Shift" (M. Sun et al., 2016). Se emplearon ocho matrices poliméricas de uso farmacéutico (HPMC 80-120 cPs, Methocel A15, Kollidon 30, Kollidon VA64, Kolliphor P188, Lutrol micro 127, Methocel 60HG y HPC 80 000) y un solubilizante (Gelucire 48/16) como potenciales inhibidores de la precipitación, para así desplazar la super saturación de DE a mayores concentraciones.

De los polímeros y solubilizantes utilizados, Gelucire 48/16, Kollidon VA64 y HPMC 80-120 cPs son los que mostraron los mejores resultados en el proceso de solubilización de DE (**Figura 55**), ya que permiten tener mayores concentraciones de DE disuelto en el medio antes de llegar a su punto máximo de saturación. Gelucire 48/16 al ser un agente solubilizante no mantendría el nivel de super saturación de la disolución de la NFS, por esta razón no se recomendaría su uso en una formulación cocrystalina (Charan et al., 2017). Kollidon VA64 si bien muestra buenos resultados, no se contó con cantidad suficiente para realizar todas las pruebas biofarmacéuticas con este polímero; por lo que se decidió trabajar con HPMC 80-120 cPs para las pruebas de disolución de DE y de la NFS.

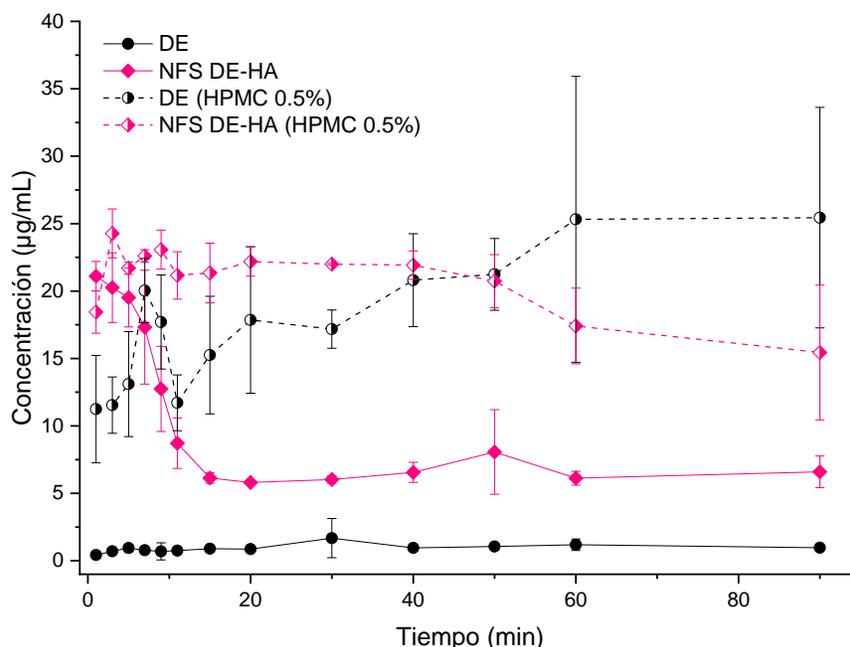


**Figura 55** Monitoreo del grado de supersaturación de DE en presencia y en ausencia de diferentes polímeros inhibidores de la precipitación en BIS-TRIS pH 6 [0.74M],  $n=3 \pm D.E.$

Una vez seleccionado el polímero HPMC (al 0.5%), se procedió a evaluar la cinética de disolución de polvos en condiciones *no sink* para DE-L3 y la NFS DE-HA. En la **Figura 56** se muestra el perfil de disolución de DE, en el cual se obtuvieron concentraciones iniciales de DE disuelto entre 10 y 20 µg/mL; a tiempos posteriores a los 20 minutos los valores promedio de concentración oscilaron entre 20 y 25 µg/mL. Los valores de concentración alcanzados fueron significativamente superiores a los observados en el medio sin HPMC, lo que sugiere que el polímero tiene un efecto solubilizante sobre DE.

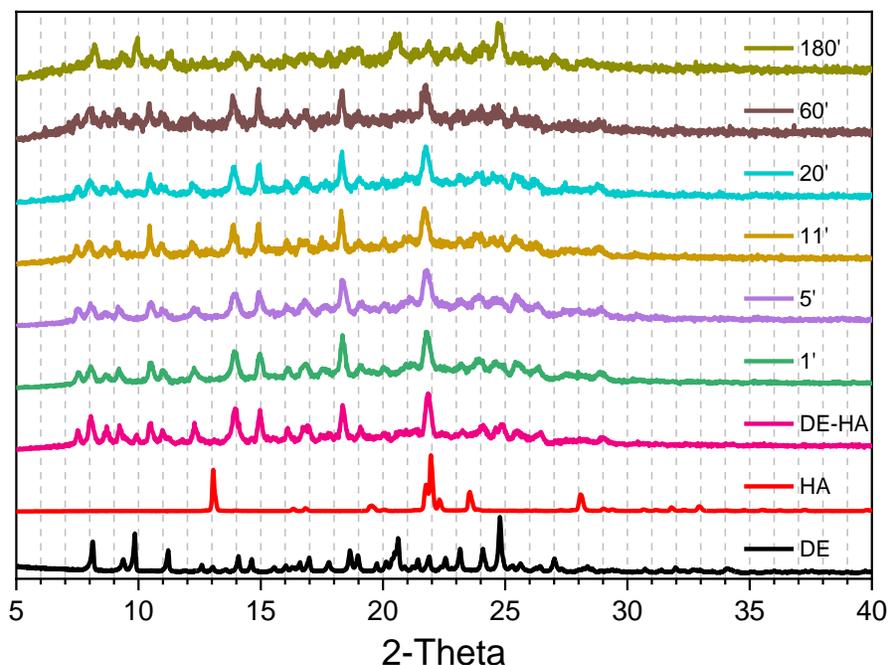
Por otro lado, en el perfil de disolución de DE-HA en presencia del polímero antes mencionado, se observa que las concentraciones de DE alcanzadas a lo largo del experimento oscilaron entre 18 y 24 µg/mL. Dichas concentraciones son mayores a las observadas en el perfil de disolución de DE-HA en el medio de disolución sin polímero. El perfil de disolución en el medio con HPMC claramente muestra que la ventaja en concentración inducida por DE-HA se mejora en mayor medida por la presencia del polímero en el medio de disolución. Cabe señalar que el análisis de polvos de este experimento mostró que la transformación de fase de DE-HA hacia DE se retrasó significativamente en comparación al mismo sólido en medio sin polímero (ver abajo).

Dicha ventaja en supersaturación alcanzada con DE-HA se ve mejorada al emplear un polímero inhibidor de la precipitación; aunque se obtuvieron concentraciones menores que en DEM en ausencia de polímero, éstas se mantienen a lo largo del experimento. Se observa como el uso de un aditivo, en este caso el polímero, mejora el perfil de disolución de ambos sólidos de interés (DE-L3 y DE-HA).



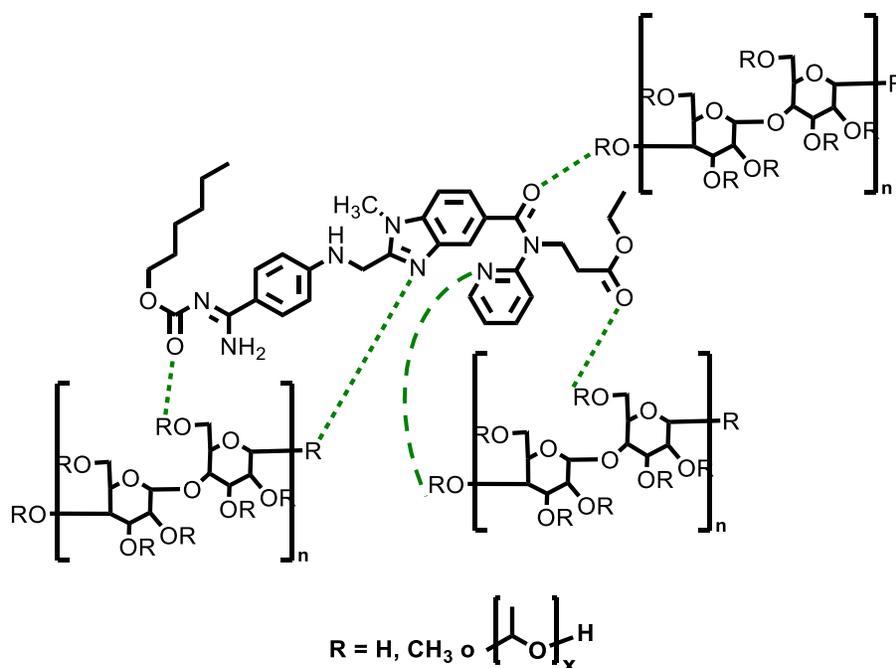
**Figura 56** Perfiles de disolución de polvos para DE y DE-HA en BIS-TRIS pH 6 con HPMC predisuelto al 0.5%,  $n=3 \pm DE$ .

También se monitoreó la estabilidad de fase de DE-HA en medio de disolución de BIS-TRIS pH 6 con HPMC al 0.5 % (p/v). En la **Figura 57** se muestra que el patrón de difracción de DE-HA se conserva hasta los 60 minutos. En contraste, el sólido aislado a los 180 minutos muestra picos de difracción que corresponden a DE-HA (picos en  $14^\circ$  y  $15^\circ$  2-theta) y a DE (nótese pico intenso a  $25^\circ$  2-theta), lo que indica una mezcla de fases entre DE y DE-HA. Es de resaltar que en el caso del medio en ausencia de HPMC, se observa una mezcla de fases desde los 7 minutos. Estos resultados sugieren que el polímero disuelto en el medio de disolución retarda la precipitación de DE, pudiendo conferir una ventaja biofarmacéutica que impacte en la biodisponibilidad de DE.



**Figura 57** Estudios de la estabilidad de fase de DE-HA cuando se encuentra en contacto con HPMC al 0.5% (p/v) predisuelto en BIS-TRIS

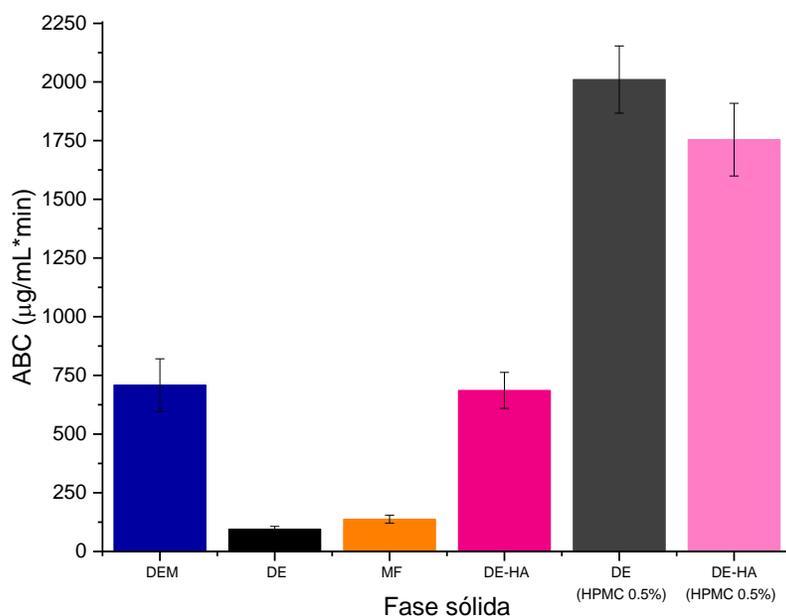
Los resultados mostrados anteriormente se deben a que DE cuenta con varios grupos funcionales, los cuales pueden actuar como potenciales aceptores de puentes de hidrógeno (piridina, amidas, imidazol, éster carbamida), por su parte el polímero HPMC presenta grupos donadores de puentes de hidrógeno, en su mayoría -OH, por lo que se plantean posibles interacciones HPMC-DE tal como se muestra en la **Figura 58**. En DE dichas interacciones favorecen su solubilización y su estado supersaturado en el medio de disolución. Por otro lado, en DE-HA el polímero retrasó su transformación de fase, impactando en un retraso en el proceso de nucleación y crecimiento cristalino de DE (Salas-Zúñiga et al., 2020).



**Figura 58** Posibles interacciones en solución entre DE y HPMC

Para una mejor comparación entre los perfiles de disolución obtenidos en presencia o no de HPMC predisoluto en BIS-TRIS pH 6 (al 0.5%, p/v) se calculó el área bajo la curva (ABC), el cual es un parámetro que sirve para estimar la cantidad total de IFA disuelto bajo ciertas condiciones experimentales en función del tiempo (ver **Figura 59** y **Tabla 13**). En la misma **Tabla 13** se muestra como la cantidad disuelta de DE proveniente de la disolución de la sal comercial es 7.5 veces más soluble que DE en su forma neutra. La MF no tiene un impacto significativo sobre la solubilidad de este. Sin embargo, se muestra que la NFS DE-HA permite alcanzar concentraciones disueltas de hasta 7.26 veces de DE, obteniéndose una solubilidad muy cercana a la obtenida a partir de DEM.

Es evidente como se mejora el ABC de DE y de DE-HA cuando se emplea un polímero predisoluto en el medio, pues se obtuvieron valores de  $ABC_{DE-HPMC (0.5\%)} = 21.27 ABC_{DE}$  y  $ABC_{CC-HPMC (0.5\%)} = 18.56 ABC_{DE}$ .



**Figura 59** ABC de los perfiles de disolución de las materias primas y de la NFS DE-HA en medio BIS-TRIS pH 6,  $n = 3 \pm DE$

**Tabla 13** Áreas bajo la curva y cociente ABC de los resultados de disolución de polvos de los diferentes sólidos de interés en presencia y ausencia del polímero HPMC al 0.5% en el medio BIS-TRIS pH 6

Sólido	BIS-TRIS pH 6		
	ABC (µg/mL*min) ± DE	Cociente ABC	
DEM	708 ± 112	DEM/DE	7.50
DE	94 ± 12	MF/DE	1.45
DE c/HPMC	2010 ± 143	DE-HA/DE	7.26
MF	137 ± 17	DE c/HPMC/DE	21.27
DE-HA	686 ± 77	DE-HA c/HPMC/DE	18.56
DE-HA c/HPMC	1754 ± 155		

Al realizar una prueba estadística por ANOVA de dos vías (Vallejo, et al., 2010) se obtuvo, que en un nivel de significancia de 0.05, las medias poblacionales para el medio de disolución y para las fases sólidas son diferentes significativamente. Por lo que se realizó una prueba de comparaciones múltiples (Tukey,  $p < 0.5$ ) para conocer entre qué tratamientos había diferencia significativa, obteniendo lo siguiente (ver resultados detallados en el **Anexo 7**):

- Existe diferencia significativa al emplear el medio de disolución BIS-TRIS con y sin HPMC al 0.5% (probabilidad = 2.29295E-8).
- La comparación entre las fases sólidas empleadas (DEM, DE, MF, NFS DE-HA) si resultó ser estadísticamente diferente, excepto al comparar a DE y DE-HA en el medio de disolución con HPMC al 0.5%.
- El software empleado (OriginPro 2018) para dicho análisis estadístico realizó 28 combinaciones entre las diferentes fases sólidas y el medio de disolución con y sin polímero, de las cuales 15 fueron el resultado de los experimentos previos de disolución realizados. Todas estas combinaciones resultaron ser estadísticamente diferentes (probabilidad <0.05). Esto da pauta a la posibilidad de evaluar el perfil de disolución de aquellos sólidos faltantes (DEM y MF) en presencia de HPMC al 0.5%.

## 8 CONCLUSIONES

Se obtuvo una nueva fase sólida de dabigatrán etexilato en combinación con el ácido hipúrico en una proporción estequiométrica 1:1 mediante molienda mecanoquímica asistida con disolvente. La fase sólida DE-HA presentó características espectroscópicas (IR y NMR) que parecen indicar que las especies presentes en el sólido no se encuentran ionizadas, dando lugar a un sólido cocrystalino. La fase sólida DE-HA presenta un perfil de disolución y una estabilidad física semejante a la fase comercial del mesilato de dabigatrán etexilato (DEM), por lo que representa una alternativa innovadora para el régimen terapéutico actual.

Otras observaciones relevantes emanadas de este trabajo de investigación son:

- ❖ Se estandarizó una metodología para la obtención de la forma neutra e hidratada de dabigatrán etexilato a partir de la sal comercial de mesilato de dabigatrán etexilato, la cual se ha logrado caracterizar mediante análisis físicos y espectroscópicos.
- ❖ Se ha observado que la estabilidad física de DE se ve influenciada por el número de moléculas de agua que se incorporan en su estructura cristalina, siendo esta característica la que impacta directamente en sus propiedades térmicas.
- ❖ La técnica mecanoquímica establecida ha sido útil para el escalamiento de la NFS DE-HA a 2 g de producto.
- ❖ Las pruebas de estabilidad indicativa mostraron que dabigatrán etexilato sufre transformación física a una fase polimórfica de DE cuando se almacena a 50°C y 0% HR. Un comportamiento similar se observó en la nueva fase cocrystalina DE-HA al encontrarse a 40 °C y 75% HR; esta fase es estable bajo estrés térmico en condiciones anhidras. (**Anexo 6**).
- ❖ En los estudios de disolución de polvos se observó que la fase DE-HA genera condiciones de supersaturación por periodos breves de tiempo (5 minutos); sin embargo, dada la velocidad de transformación de la fase se alcanzan concentraciones disueltas mayores del IFA que con dabigatrán etexilato (DE), las cuales se aproximan a las de DEM.
- ❖ El uso de un polímero inhibidor de la precipitación como HPMC al 0.5% (p/v) predisoluto en el medio de disolución, logró modificar el perfil de disolución de dabigatrán etexilato; manteniendo por más tiempo la solubilización del IFA e incrementando el ABC hasta

aproximadamente 18 veces, haciendo evidente la ventaja farmacéutica del uso del cocrystal de DE-HA formulado con HPMC en comparación con DE.

## 9 PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar experimentos para la obtención del monocristal del DE-HA (1:1) para conocer con certeza los sintónes supramoleculares formados entre DE y el coformador HA, y contrastarlos con las interacciones de las moléculas de agua presentes en la fase tetrahidratada reportada en la CCDS (EFAXAM). Con este análisis se definiría de manera inequívoca si DE-HA pertenece a una sal o a un cocrystal.
- ❖ Realizar estudios de preformulación farmacéutica empleando el HPMC al 0.5% p/v estudiado con el uso concomitante de un agente solubilizante (Gelucire 48/16). La hipótesis es que la dupla puede promover por mayor tiempo la supersaturación de DE-HA e impactar por tiempos mayores y a mayor escala en la solubilización del IFA.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

- Administration, F. and D. (2018). Andexxa. Retrieved from <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/andexxa-coagulation-factor-xa-recombinant-inactivated-zhzo>
- Administration, U. S. D. of H. and H. S. F. and D. (2018). Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-Crystals, Guidance for Industry. *U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration*, (February). Retrieved from <https://www.fda.gov/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/default.htm>
- Aitipamula, S., Banerjee, R., Bansal, A. K., Biradha, K., Cheney, M. L., Choudhury, A. R., ... Zaworotko, M. J. (2012). Polymorphs, salts, and cocrystals: What's in a name? *Crystal Growth and Design*, 12(5), 2147–2152. <https://doi.org/10.1021/cg3002948>
- Alegría, M. A., Arauz, A., Roa, L. F., Márquez, J., Calleja, J., Leyva, A., Escamilla, J. M. (2010). Anticoagulación en la prevención secundaria de la enfermedad vascular cerebral. *Revista de Investigacion Clínica*, 62(2), 141–151.
- Allen, F. H., & Taylor, R. (2004). Research applications of the Cambridge Structural Database (CSD). *Chemical Society Reviews*, 33(8), 463–475. <https://doi.org/10.1039/b309040j>
- Arous, B., & Al-mardini, M. A. (2019). LC-MS method for Analysis of Dabigatran and its Impurities. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*, 3(5), 121–127. ISSN: 2581-5423
- Baldrighi, M., Cavallo, G., Chierotti, M. R., Gobetto, R., Metrangolo, P., Pilati, T., ... Terraneo, G. (2013). Halogen bonding and pharmaceutical cocrystals: The case of a widely used preservative. *Molecular Pharmaceutics*, 10(5), 1760–1772. <https://doi.org/10.1021/mp300574j>
- Berkovits, A., & Mezzano, D. (2011). Nuevos anticoagulantes orales. *Revista Chilena de Cardiología*, 139(10), 1347–1355. <https://doi.org/10.4067/S0718-85602017000300254>
- Birkholz, M. (2006). Principles of X-ray Diffraction. *Thin Film Analysis by X-Ray Scattering* (pp. 1–42). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/3527607595.ch1>
- Blann Andrew, N. A. (2014). The Physiology and Pathology of Haemostasis. In *Blood Science: principles and pathology* (First Edit, p. 161/175). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/978-1-118-35146-8>
- Blech, S., et al. (2007). The Metabolism and Disposition of the Oral Direct Thrombin Inhibitor, Dabigatran, in Humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(2), 386–399. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.019083.atrial>
- Breik, O., Tadros, R., & Devitt, P. (2013). Thrombin inhibitors: Surgical considerations and pharmacology. *ANZ Journal of Surgery*, 83(4), 215–221. <https://doi.org/10.1111/ans.12078>
- Brittain, H. G. (2009). Vibrational studies of cocrystals and salts. 1. The benzamide-Benzoic acid System. *Crystal Growth and Design*, 9(5), 2492–2499. <https://doi.org/10.1021/cg801397t>
- Brittain, H. G. (2012). Cocrystal Systems of Pharmaceutical Interest: 2010. *Crystal Growth and Design*, 12 (2), 1046-1054. <https://doi.org/10.1021/cg201510n>
- Cai, Z., Hou, X., Kong, D., Hou, L., & Hu, Z. (2016). Synthesis, crystal structural, and spectral characterisation of dabigatran etexilate tetrahydrate, 40(8), 461–466. <https://doi.org/10.3184/174751916X14664340623037>
- Charan, K., et al., (2017). Gelucire : A versatile polymer for modified release drug delivery system. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2017.11.001>
- Childs, S. L., Kandi, P., & Lingireddy, S. R. (2013). Formulation of a danazol cocrystal with controlled supersaturation plays an essential role in improving bioavailability. *Molecular Pharmaceutics*, 10(8), 3112–3127. <https://doi.org/10.1021/mp400176y>
- Clas, S. D., Sanchez, R. I., & Nofsinger, R. (2014). Chemistry-enabled drug delivery (prodrugs): Recent progress and challenges. *Drug Discovery Today*, 19(1), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.08.014>
- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A. C. (2002). Métodos Analíticos, Guía de Validación.
- Cruz-Cabeza, A. J. (2012). Acid-base crystalline complexes and the  $pK_a$  rule. *CrystEngComm*, 14(20), 6362–6365. <https://doi.org/10.1039/c2ce26055g>
- Delori, A., Frišić, T., & Jones, W. (2012). The role of mechanochemistry and supramolecular design

- in the development of pharmaceutical materials. *CrystEngComm*, 14(7), 2350–2362. <https://doi.org/10.1039/c2ce06582g>
- Desiraju, G. R. (1995). The Supramolecular Synthons in Crystal Engineering: A New Organic Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34(21), 2311–2327. <https://doi.org/10.1002/3527605746.ch19>
- Desiraju, G. R. (2007). Crystal engineering: A holistic view. *Angewandte Chemie - International Edition*, 46(44), 8342–8356. <https://doi.org/10.1002/anie.200700534>
- Dimatteo, C., et al., (2016). Pharmacogenetics of dabigatran etexilate interindividual variability. *Thrombosis Research*, 144, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.05.025>
- Dinnebie, S. (1st Ed.) (2008). Principles of Powder Diffraction. *Powder Diffraction. Theory and Practice*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. ISBN: 978-0-85404-31-9-A
- Domingos, S., et al., (2015). New forms of old drugs: Improving without changing. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(6), 830–846. <https://doi.org/10.1111/jphp.12384>
- Duggirala, N. K., et al., (2016). Pharmaceutical cocrystals: Along the path to improved medicines. *Chemical Communications*, 52(4), 640–655. <https://doi.org/10.1039/c5cc08216a>
- Duncan Q, M. C., & Reading, M. (2007). *Thermal Analysis of Pharmaceuticals*. United States of America: CRC Press. ISBN: 978-0-8247-5814-1
- Ebner, T., Wagner, K., & Wiene, W. (2010). Dabigatran acylglucuronide, the major human metabolite of dabigatran: In vitro formation, stability, and pharmacological activity. *Drug Metabolism and Disposition*, 38(9), 1567–1575. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.033696>
- Eisert, W. G., Huel, N., Stangier, J., Wiene, W., Clemens, A., & Van Ryn, J. (2010). Dabigatran: An oral novel potent reversible nonpeptide inhibitor of thrombin. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(10), 1885–1889. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.203604>
- EMA. (2014). Anexo I: Ficha técnica o resumen de las características del producto: Bortezomib (Velcade®). *Agencia Europea de Medicamentos*, 1–33. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.SABCS12-S5-3>
- EMA. (2008). CHMP Assessment Report for Pradaxa, 1–36. Retrieved from <http://www.emea.europa.eu>
- Eriksson, B. I., Quinlan, D. J., & Weitz, J. I. (2009). Comparative pharmacodynamics and pharmacokinetics of oral direct thrombin and factor xa inhibitors in development. *Clin Pharmacokinetics*, 48(1), 1–22. <https://doi.org/10.2165/0003088-200948010-00001>
- Escobar, C., Barrios, V., & Jimenez, D. (2010). Atrial Fibrillation and Dabigatran: Has the Time Come To Use New Anticoagulants? Importance of Atrial Fibrillation (AF). *Cardiovascular Therapeutics*, 28, 295–301. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00216.x>
- Etter, M. C. (1991). Hydrogen bonds as design elements in organic chemistry. *Journal of Physical Chemistry*, 95(12), 4601–4610. <https://doi.org/10.1021/j100165a007>
- European Medicines Agency. (2010). GUIDELINE ON THE INVESTIGATION OF BIOEQUIVALENCE DISCUSSION, 25–27. Retrieved from <http://www.ema.europa.eu>
- Fischer, Dirk, James, K. (2011). *WO 2012/044595* Dabigatran etexilate bismesylate salt, solid state forms and process for preparation thereof. Retrieved from <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2012044595&recNum=62&docAn=US2011053381&queryString=teva&maxRec=3982>
- Fischer, F., et al., (2016). Polymorphism of Mechanochemically Synthesized Cocrystals: A Case Study. *Crystal Growth and Design*, 16(3), 1701–1707. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b01776>
- Fischer, P. M. (2018). Design of Small-Molecule Active-Site Inhibitors of the S1A Family Proteases as Procoagulant and Anticoagulant Drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(9), 3799–3822. review-article. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00772>
- Food and Drug Administration. (2013). PRADAXA® (dabigatran) tablets, for oral use. Highlights of prescribing information, 33. Retrieved from [https://www.boehringer-ingenheim.mx/sites/mx/files/ipp/ni/pradaxa\\_crgtnisvpahn.pdf](https://www.boehringer-ingenheim.mx/sites/mx/files/ipp/ni/pradaxa_crgtnisvpahn.pdf)
- Food and Drug Administration. (2018). Q3C - Tables and list. Guidance for Industry. *Food and Drug Administration*, 9765 (August), 301–827. Retrieved from <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> %5Cn<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>
- Friebolin, H. (1993). *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*. (2 ed). Germany: VCH. ISBN: 3-527-29059-1

- Fucke, K., et al., (2012). How good are the crystallisation methods for co-crystals? A comparative study of piroxicam. *New Journal of Chemistry*, 36(10), 1969–1977. <https://doi.org/10.1039/c2nj40093f>
- FuJuan, Chai. et al., (2016). A solid self-nanoemulsifying system of the BCS class IIb drug dabigatran etexilate to improve oral bioavailability. *Nanomedicine*, 11(14), 1801–1816. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0138>
- Furie, B., & Furie, B. C. (2008). Mechanisms of thrombus formation. *New England Journal of Medicine*, 359(9), 938–949. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0801082>
- Gabriel, A. G., et al. (2012). Nuevos anticoagulantes: dabigatrán, rivaroxabán y apixabán. *Gaceta Médica de México*, 148, 257–264.
- Gadade, D. D., & Pekamwar, S. S. (2016). Pharmaceutical cocrystals: Regulatory and strategic aspects, design and development. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 6(4), 479–494. <https://doi.org/10.15171/apb.2016.062>
- Garnock-Jones, K. P. (2011). Dabigatran etexilate: A review of its use in the prevention of stroke and systemic embolism in patients with atrial fibrillation. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 11(1), 57–72. <https://doi.org/10.2165/11206400-000000000-00000>
- Grandgirard, J., Poinot, D., Krespi, L., Nénon, J. P., & Cortesero, A. M. (2002). Biopharmaceutics Classification System: The Scientific Basis for Biowaiver Extensions. *Pharmaceutical Research*, 19(7), 921–925.
- Greco, K., & Bogner, R. (2012). Solution-Mediated Phase Transformation: Significance During Dissolution and Implications for Bioavailability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(9), 2996–3018. <https://doi.org/10.1002/jps.23025>
- Gupta, D., Bhatia, D., Dave, V., Sutariya, V., & Gupta, S. V. (2018). Salts of therapeutic agents: Chemical, physicochemical, and biological considerations. *Molecules*, 23(7), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules23071719>
- Hakeam, H. A., & Al-Sanea, N. (2017). Effect of major gastrointestinal tract surgery on the absorption and efficacy of direct acting oral anticoagulants (DOACs). *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 43(3), 343–351. <https://doi.org/10.1007/s11239-016-1465-x>
- Härtter, S., Sennewald, R., Nehmiz, G., & Reilly, P. (2013). Oral bioavailability of dabigatran etexilate (Pradaxa®) after co-medication with verapamil in healthy subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(4), 1053–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04453.x>
- Hauel, N. H., Nar, H., Pripke, H., Ries, U., Stassen, J., & Wiene, W. (2002). Structure-Based Design of Novel Potent Nonpeptide Thrombin Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(9), 1757–1766. <https://doi.org/10.1021/jm0109513>
- Healy, A. M., Worku, Z. A., Kumar, D., & Madi, A. M. (2017). Pharmaceutical solvates, hydrates and amorphous forms: A special emphasis on cocrystals. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 117, 25–46. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.03.002>
- Hepsebah, N. J. R., & Kumar, A. A. (2018). Spectrometric Dissolution Method for Dabigatran Etexilate Mesylate Capsules. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(4), 1277–1290. <https://doi.org/10.20959/wjpps20184-11351>
- Hyun, J., Cheul, J., Kim, H., Shik, D., Soo, K., Il, Y., Choi, H. (2017). Novel dabigatran etexilate hemisuccinate-loaded polycap: Physicochemical characterisation and in vivo evaluation in beagle dogs. *International Journal of Pharmaceutics*, 525(1), 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.028>
- IMSS. (2015). Salud en Línea. Retrieved December 5, 2019, from <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/enfermedad-vascular-cerebral>
- James, S. L., Adams, C. J., Bolm, C., Braga, D., Collier, P., Frišćic, T., Waddell, D. C. (2012). Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis. *Chemical Society Reviews*, 41(1), 413–447. <https://doi.org/10.1039/c1cs15171a>
- Jones, W., & Eddleston, M. D. (2014). Introductory lecture: Mechanochemistry, a versatile synthesis strategy for new materials. *Faraday Discussions*, 170, 9–34. <https://doi.org/10.1039/c4fd00162a>
- Kalogeras, I. M. (2016). Glass-Transition Phenomena in Polymer Blends. *Encyclopedia of Polymer Blends*, 3, 1–134. <https://doi.org/10.1002/9783527653966.ch1>
- Kavanagh, O. N., Croker, D. M., Walker, G. M., & Zaworotko, M. J. (2019). Pharmaceutical cocrystals: from serendipity to design to application. *Drug Discovery Today*, 24(3), 796–804. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.11.023>
- Kawakami, K. (2012). Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical

- ingredients and application of supersaturatable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(6), 480–495. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.10.009>
- Khamar, D., Zeglinski, J., Mealey, D., & Rasmuson, Å. C. (2014). Investigating the role of solvent-solute interaction in crystal nucleation of salicylic acid from organic solvents. *Journal of the American Chemical Society*, 136(33), 11664–11673. <https://doi.org/10.1021/ja503131w>
- KIRÁLY, I., et al. (2011). W02011110876 Novel salts for the manufacture of pharmaceutical compositions. Retrieved from <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=W02011110876&recNum=1&maxRec=&office=&prevFilter=&sortOption=&queryString=&tab=PCTDescription>
- Krishna, Rajesh & Yu, L. (2008). *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*. USA: Springer. ISBN: 978-0-387-72378-5
- Kumar, P., Gordon, L. A., Brooks, K. M., Jomy, M., Kellogg, A., Mcmanus, M., Corporation, Parker Tide Worth, F. (2017). Differential Influence of the Antiretroviral Pharmacokinetic Enhancers Ritonavir and Cobicistat on Intestinal P-Glycoprotein Transport and the Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Disposition of Dabigatran. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(11), e01201-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01201-17>
- Kuminek, G., Cao, F., Bahia, A., & Oliveira, D. (2016). Cocrystals to facilitate delivery of poorly soluble compounds beyond-rule-of-5. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 101, 143–166. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.022>
- Lampman, P., Vyvyan, K., Pavia, D. L., & Kriz, G. S. (2001). Chapter 2. Infrared Spectroscopy. *Introduction to Spectroscopy* (Fourth Edition). US: Cengage Learning. ISBN-13: 978-0-495-11478-9. págs 16-20.
- Laurella, S. L. (2017). RMN: Fundamentos. *Resonancia Magnética Nuclear. Una herramienta para la elucidación de estructuras moleculares* (Primera Ed, pp. 10–13). Buenos Aires: Editorial de la Universidad de La Plata. Retrieved from [www.editorial.unlp.edu.edu.ar](http://www.editorial.unlp.edu.edu.ar)
- Lehr, T., Dansirikul, C., Reilly, P. A., & Connolly, S. J. (2011). Population pharmacokinetic analysis of the oral thrombin inhibitor dabigatran etexilate in patients with non-valvular atrial fibrillation from the RE-LY trial. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9, 2168–2175. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04498.x>
- Li, C., Dong, M., Ren, Y., & Li, L. (2015). RSC Advances molecular docking of novel dabigatran derivatives as potential thrombin inhibitors †. *RSC Advances*, 5, 23737–23748. <https://doi.org/10.1039/C5RA01828E>
- MacRae, C. F., Sovago, I., Cottrell, S. J., Galek, P. T. A., McCabe, P., Pidcock, E. Wood, P. A. (2020). Mercury 4.0: From visualization to analysis, design and prediction. *Journal of Applied Crystallography*, 53, 226–235. <https://doi.org/10.1107/S1600576719014092>
- Martínez-murillo, C. (2006). Mecanismos de activación de la coagulación. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 44, 51–58.
- Mei, H., Jinjie, Z., Rui, D., Yao, F., Tao, G., & Zhirong, Z. (2017). Improved oral bioavailability and therapeutic efficacy of dabigatran etexilate via Soluplus®-TPGS binary mixed micelles system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(4), 687–697. <https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1278015>
- Mexicanos, C. P. de la F. de los E. U. (2008). Métodos generales de análisis. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* (9a ed., pp. 301–303). México: Secretaría de Salud México.
- Milan Remko, Ria Broer, A. R. (2014). A comparative study of the molecular structure, lipophilicity, solubility, acidity, absorption and polar surface area of coumarinic anticoagulants and direct thrombin inhibitors. *RSC Advances*, (4), 8072–8084. <https://doi.org/10.1039/C3RA42347F>
- Mutha, V., et al. (2018). Hydrolytic Degradation Study of Dabigatran Etexilate Mesylate: Isolation and Structural Elucidation of New Degradants. *Analytical Chemistry Letters*, 8(3), 277–286. <https://doi.org/10.1080/22297928.2018.1449664>
- Narro Robles, J. R. (2018). *Enfermedades No Transmisibles Situaciones y Propuestas de Acción: Una Perspectiva desde la Experiencia de México*. (Secretaría de Salud, Ed.) (1st ed.). CDMX.
- Ogata, M., & Taguchi, T. (1986). Quantitative analysis of urinary glycine conjugates by high performance liquid chromatography: excretion of hippuric acid and methylhippuric acids in the urine of subjects exposed to vapours of toluene and xylenes. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 58(2), 121–129. <https://doi.org/10.1007/BF00380763>
- Palta, S., Saroa, R., & Palta, A. (2014). Overview of the coagulation system. *Indian Journal of*

- Anaesthesia*, 58(5), 515–523. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.144643>
- Paulekuhn, G. S., Dressman, J. B., & Saal, C. (2007). Trends in active pharmaceutical ingredient salt selection based on analysis of the orange book database. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(26), 6665–6672. <https://doi.org/10.1021/jm701032y>
- Pindelska, E., Sokal, A., & Kolodziejcki, W. (2017a). Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 117, 111–146. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.014>
- Pindelska, E., Sokal, A., & Kolodziejcki, W. (2017b). Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 117, 111–146. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.014>
- Pinto, J. M. O., Leão, A. F., Alves, G. F., Mendes, C., França, M. T., Fernandes, D., & Stulzer, H. K. (2019). New supersaturating drug delivery system as strategy to improve apparent solubility of candesartan cilexetil in biorelevant medium. *Pharmaceutical Development and Technology*, 0(0), 000. <https://doi.org/10.1080/10837450.2019.1675171>
- Polo García, J., Barón Esquivias, G., & Vicente García, V. (2011). *50 preguntas y respuestas sobre el manejo clínico de Dabigatran*. Barcelona: Lexic S.L. Retrieved from <http://catalogo.rebiun.org/rebiun/record/Rebiun04069595>
- Pop, Mihaela. Pete, Sieger. Coen, Hoogland. Gerd, M. (2008). *WO 2008/043759 A1*. Retrieved from <https://patents.google.com/patent/WO2008043759A1/en?q=WO2008%2F043759>
- Pritula, I., & Sangwal, K. (2015). *Fundamentals of Crystal Growth from Solutions. Handbook of Crystal Growth: Bulk Crystal Growth: Second Edition* (Second Edi, Vol. 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63303-3.00029-8>
- PUBCHEM. (n.d.). Dabigatran etexilate mesylate. Retrieved February 21, 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dabigatran-etexilate-mesylate#section=Octanol-Water-Partition-Coefficient&fullscreen=true>
- Reilly, P. A., van Ryn, J., Grottke, O., Glund, S., & Stangier, J. (2016). Idarucizumab, a Specific Reversal Agent for Dabigatran: Mode of Action, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, and Safety and Efficacy in Phase 1 Subjects. *The American Journal of Medicine*, 129(11A), S64–S72. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2016.06.007>
- Remko, M., Broer, R., & Remková, A. (2014a). A comparative study of the molecular structure, lipophilicity, solubility, acidity, absorption and polar surface area of coumarinic anticoagulants and direct thrombin inhibitors. *RSC Advances*. <https://doi.org/10.1039/c3ra42347f>
- Remko, M., Broer, R., & Remková, A. (2014b). A comparative study of the molecular structure, lipophilicity, solubility, acidity, absorption and polar surface area of coumarinic anticoagulants and direct thrombin inhibitors. *RSC Advances*, 4, 8072–8084. <https://doi.org/10.1039/c3ra42347f>
- Roberts, H. R., Monroe, D. M., & Escobar, M. A. (2004). Current Concepts of Hemostasis: Implications for Therapy. *Anesthesiology*, 100(3), 722–730. <https://doi.org/10.1097/0000542-200403000-00036>
- Robertson, S. G., & Glass, B. D. (2018). Stability of repackaged dabigatran etexilate capsules in dose administration aids. *European Journal of Hospital Pharmacy*, 25(e2), e93–e97. <https://doi.org/10.1136/ejhpharm-2017-001224>
- Rodríguez-Hornedo, N., et al. (2006). Reaction crystallization of pharmaceutical molecular complexes. *Molecular Pharmaceutics*, 3(3), 362–367. <https://doi.org/10.1021/mp050099m>
- Ross, S. A. (2017). Advanced methodologies for cocrystal synthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 117, 178–195. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2017.07.008>
- Saal, C., & Becker, A. (2013). Pharmaceutical salts: A summary on doses of salt formers from the Orange Book. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(4), 614–623. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.05.026>
- Salas-Zúñiga, R., Rodríguez-Ruiz, C., Höpfl, H., Morales-Rojas, H., Sánchez-Guadarrama, O., Rodríguez-Cuamatzi, P., & Herrera-Ruiz, D. (2020). Dissolution advantage of nitazoxanide cocrystals in the presence of cellulosic polymers. *Pharmaceutics*, 12(1), 23. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010023>
- Sarge, S. M., Höhne, G. W., & Hemminger, W. (2014). *Calorimetry: fundamentals, instrumentation and applications*. Germany: John Wiley & Sons. ePDF ISBN: 978-3-527-64939-6
- Schultheiss, N., & Newman, A. (2009). Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties. *Nature. Crystal Growth & Design*, 9(6), 2950–2967. <https://doi.org/10.1021/cg900129f>

- Secretaria de Salud México. (2017). Subsistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades. Información Epidemiológica de Morbilidad Reporte Correspondiente a Marzo de 2017. *Información Epidemiológica de Morbilidad*, 128. Retrieved from [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/215342/3\\_Reporte\\_de\\_marzo\\_de\\_2017.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/215342/3_Reporte_de_marzo_de_2017.pdf)
- Shaikh, R., Singh, R., Walker, G. M., & Croker, D. M. (2018). Pharmaceutical Cocrystal Drug Products: An Outlook on Product Development. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(12), 1033–1048. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.10.006>
- Shan, N., Toda, F., & Jones, W. (2002). Mechanochemistry and co-crystal formation: Effect of solvent on reaction kinetics. *Chemical Communications*, 2(20), 2372–2373. <https://doi.org/10.1039/b207369m>
- Shattock, T. R., Arora, K. K., Vishweshwar, P., & Zaworotko, M. J. (2008). Hierarchy of supramolecular synthons: Persistent carboxylic acid··pyridine hydrogen bonds in cocrystals that also contain a hydroxyl moiety. *Crystal Growth and Design*, 8(12), 4533–4545. <https://doi.org/10.1021/cg800565a>
- Sherry Ku Manching. (2010). *Preformulation consideration for drugs in oral CR formulation. Oral controlled release formulation design and drug delivery : theory to practice*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470640487>
- Shi, J., Wang, X., Nguyen, J. H., Bleske, B. E., Liang, Y., Liu, L., & Zhu, H. J. (2016). Dabigatran etexilate activation is affected by the CES1 genetic polymorphism G143E (rs71647871) and gender. *Biochemical Pharmacology*, 119, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.003>
- Silverstein R., Webster F., K. D. (2005). Infrared Epectrometry. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. WILEY (7th ed., pp. 72–85). USA. ISBN: 978-0-470-61637-6
- Sobotta, Rainer. Sieger, Peter, Schid, R. (2006). *MXPA06001959A 3-[(2-[[4-(hexyloxycarbonylamino-imino-methyl)-phenylamino]-methyl]-1-methyl-1h-benzimidazol-5-carbonyl)-pyridin-2-yl-amino]-propionic acid ethyl ester-methanesulphonate and use thereof as a medicament*. México. Retrieved from <https://patents.google.com/patent/CA2749579C/ru>
- Solanki, P. V., et al. (2018a). Facile Synthesis of Dabigatran Etexilate Mesylate, an Anticoagulant Drug, Using a Novel Synthon, N-Hexyl-4-nitrophenyl Carbonate. *ACS Omega*, 3(5), 5744–5753. research-article. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00846>
- Solanki, P. V., et al.(2018b). Facile Synthesis of Dabigatran Etexilate Mesylate, an Anticoagulant Drug, Using a Novel Synthon, N-Hexyl-4-nitrophenyl Carbonate. *ACS Omega*, 3(5), 5744–5753. research-article. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00846>
- SSA. (2013). NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. Retrieved from [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013)
- SSA. (2016). NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015. Retrieved August 11, 2020, from [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5440183&fecha=07/06/2016](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5440183&fecha=07/06/2016)
- Staab, A., Clemens, A., & Lehr, T. (2013). Pharmacometric Characterization of Dabigatran Hemodialysis. *Clin Pharmacokinet*, 52(6), 453–462. <https://doi.org/10.1007/s40262-013-0049-6>
- Stangier, J. (2008). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate. *Clin Pharmacokinet*, 47(5), 285–295. <https://doi.org/4751>
- Stangier, J. et al. (2005). Pharmacokinetic Profile of the Oral Direct Thrombin Inhibitor Dabigatran Etexilate. *Journal of Clinical Pharmacology*, 45(5), 555–563. <https://doi.org/10.1177/0091270005274550>
- Steinmetzer, T., Pilgram, O., Wenzel, B. M., & Wiedemeyer, S. J. A. (2019). Fibrinolysis Inhibitors: Potential Drugs for the Treatment and Prevention of Bleeding. *Journal of Medicinal Chemistry*, (Article ASAP). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01060>
- Strukova, S. (2006). Blood coagulation-dependent inflammation. Coagulation-dependent inflammation and inflammation-dependent thrombosis. *Blood*, 11, 59–80. Retrieved from [www.bioscience.org/current/vol11.htm](http://www.bioscience.org/current/vol11.htm)
- Stuart B. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. WILEY, England. ISBN: 978-0-470-85428-0
- Sun, D. D., & Lee, P. I. (2015). Haste Makes Waste: The Interplay Between Dissolution and Precipitation of Supersaturating Formulations. *AAPS Journal*, 17(6), 1317–1326. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9825-6>
- Sun, M., Wu, C., Fu, Q., Di, D., Kuang, X., Wang, C., Sun, J. (2016). Solvent-shift strategy to identify suitable polymers to inhibit humidity-induced solid-state crystallization of lacidipine amorphous

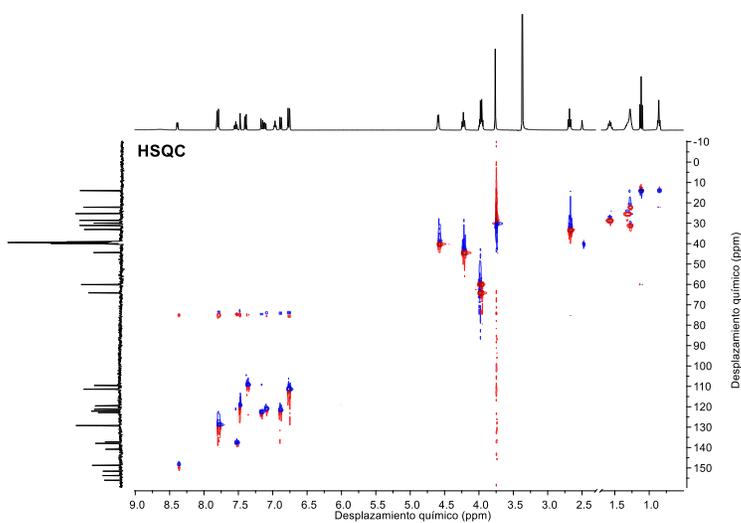
- solid dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, 503(1–2), 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.062>
- Szakács, Z., & Sánta, Z. (2015). NMR Methodological Overview. *Anthropic Awareness: The Human Aspects of Scientific Thinking in NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry* (pp. 257–289). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-419963-7.00007-9>
- Takagi, T., Ramachandran, C., Bermejo, M., Yamashita, S., Yu, L. X., & Amidon, G. L. (2006). A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. *Molecular Pharmaceutics*, 3(6), 631–643. <https://doi.org/10.1021/mp0600182>
- Takata, N., Shiraki, K., Takano, R., Hayashi, Y., & Terada, K. (2008). Cocrystal screening of stanolone and mestanolone using slurry crystallization. *Crystal Growth and Design*, 8(8), 3032–3037. <https://doi.org/10.1021/cg800156k>
- Taylor, R., & Wood, P. A. (2019). A Million Crystal Structures: The Whole Is Greater than the Sum of Its Parts. *Chemical Reviews*, 119(16), 9427–9477. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00155>
- Thakuria, R., Delori, A., Jones, W., Lipert, M. P., Roy, L., & Rodríguez-Hornedo, N. (2013). Pharmaceutical cocrystals and poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 453(1), 101–125. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.10.043>
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. (2017a). Q3C — Tables and List Guidance for Industry, *Revision 3*. Retrieved from <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. (2017b). Waiver of *In Vivo* Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Guidance for Industry, 1–16. Retrieved from <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> %0AU.S.
- Vallejo, Guillermo; Fernández, Paula; Livacic-Rojas, P. (2010). Pruebas robustas para modelos ANOVA de dos factpres con varianzas heterogéneas. *Psicológica*, 31(1), 129–148. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=16912881007%0ACómo>
- Venkatramana, M. Rao. Ritesh, Sanghvi. Haijian (Jim), Z. (2009). Solubility of Pharmaceutical Solids. *Developing Solid Oral Dosage Forms. Pharmaceutical Theory and Practice* (2<sup>nd</sup> Edition). USA: Academic Press, Elsevier. eBook ISBN: 9780128026373
- Verma, A. K. (2010). Dabigatran etexilate: A new thrombin inhibitor. *Medical Journal of Australia*, 192(7), 407–412. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.004424>
- Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W. M., Levi, M., & Reitsma, P. H. (2013). New Fundamentals in hemostasis. *Physiological Reviews*, 93(1), 327–358. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2011>
- Vioglio, P. C. aspects of salt and cocrystal forms of Api. and characterization challenges, Chierotti, M. R., & Gobetto, R. (2017). Pharmaceutical aspects of salt and cocrystal forms of APIs and characterization challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 117, 86–110. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.001>
- Walsh, G. (2007). *Pharmaceutical Biotechnology: Concepts and Applications*. England: John Wiley & Sons Ltd. ISBN: 978-0-470-01244-4
- Walsh, R. D. B., Bradner, M. W., Fleischman, S., Morales, L. A., Moulton, B., Rodríguez-Hornedo, N., & Zaworotko, M. J. (2003). Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases. *Chemical Communications*, 3(2), 186–187. <https://doi.org/10.1039/b208574g>
- Warren, D. B., Bergström, C. A. S., Benameur, H., Porter, C. J. H., & Pouton, C. W. (2013). Evaluation of the structural determinants of polymeric precipitation inhibitors using solvent shift methods and principle component analysis. *Molecular Pharmaceutics*, 10(8), 2823–2848. <https://doi.org/10.1021/mp300576u>
- Weitz, J. I., & Harenberg, J. (2017). New developments in anticoagulants: Past, present and future. *Thrombosis and Haemostasis*, 117(7), 1283–1288. <https://doi.org/10.1160/TH16-10-0807>
- Williams, H. D., Trevaskis, N. L., Charman, S. A., Shanker, R. M., Charman, W. N., Pouton, C. W., & Porter, C. J. H. (2013a). Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacological Reviews*, 65(1), 315–499. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005660>
- Williams, H. D., Trevaskis, N. L., Charman, S. A., Shanker, R. M., Charman, W. N., Pouton, C. W., &

- Porter, C. J. H. (2013b). Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. *Pharmacol Rev*, 65(January), 315–499. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005660>
- Wood, P. A., et al. (2013). Evaluation of molecular crystal structures using Full Interaction Maps, 65–72. <https://doi.org/10.1039/c2ce25849h>
- Zhang Geoff, Henry Rodger, Borchardt Rhomas, L. X. (2007). Efficient Co-crystal Screening Using Solution-Mediated Phase Transformation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(5), 990–995. <https://doi.org/10.1002/jps.20949>
- Zheng, Q., Zhang, Y., Montazerian, M., Gulbitten, O., Mauro, J. C., Zanotto, E. D., & Yue, Y. (2019). Understanding Glass through Differential Scanning Calorimetry. *Chemical Reviews*, 119(13), 7848–7939. review-article. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00510>

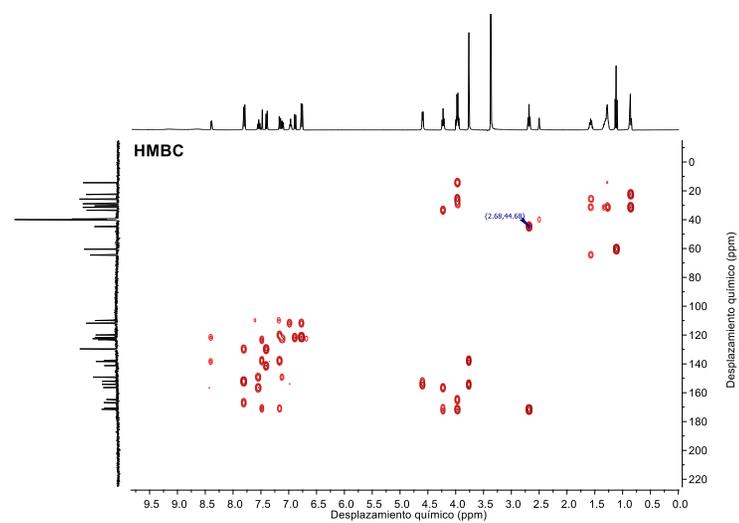
## 11 ANEXOS

Factor de coagulación	Nombre del factor de coagulación	Función	Vida media en plasma (h)	Concentración plasmática (mg/L)
I	Fibrinógeno	Formación de coágulos	90	3000
II	Protrombina	Activa a los factores I, V, VII, VIII, XI, XIII, a la proteína C y a las plaquetas	65	100
III	Factor tisular	Cofactor de VIIa	-	-
IV	Calcio	Facilita la unión de los factores de coagulación con los forfolípidos	-	-
V	Proacclerina, factor lábil	Cofactor del complejo X protrombinasa	15	10
VI	No asignado			
VII	Factor estable, proconvertina	Cofactor del complejo IX-tenasa	5	0.5
VIII	Factor A antihemofílico	Activa a los factores IX, X	10	0.1
IX	Factor B antihemofílico	Activa a factor X, forma el complejo tenasa con el factor VIII	25	5
X	Factor Stuart Prower o autoprotrombina III	Forma parte del complejo protrombinasa con el factor V, activa al factor II	40	10
XI	Antecedente de tromboplastina plasmática	Activa al factor IX	45	5
XII	Factor de Hageman	Activa al factor XI y al VII		-
XIII	Factor estabilizador de la fibrina	Reticula a la fibrina	200	30
XIV	Prekallikerina (F Fletcher)	Zimógeno serín proteasa	35	
XV	Quininógeno de alto peso molecular (HMWK, F Fitzgerald)	Cofactor	150	
XVI	Factor de Von Willebrand (vWf)	Se une al factor VIII, media la adhesión plaquetaria	12	10 µg/mL
XVII	Antitrombina III	Inhibe a IIa, Xa y a otras proteasas	72	0.15-0.2 µg/mL
XVIII	Cofactor heparina II	Inhibe a IIa	60	-
XIX	Proteína C	Inactiva a los factores Va y VIIIa	0.4	-
XX	Proteína S	Cofactor para activar a la proteína C		-

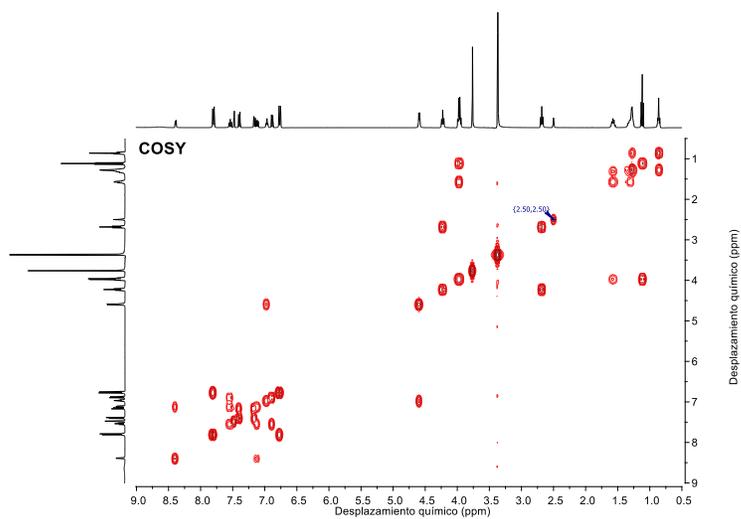
*Anexo 1 Nomenclatura de las proteínas y los factores de coagulación del sistema de coagulación (Palta et al., 2014)*



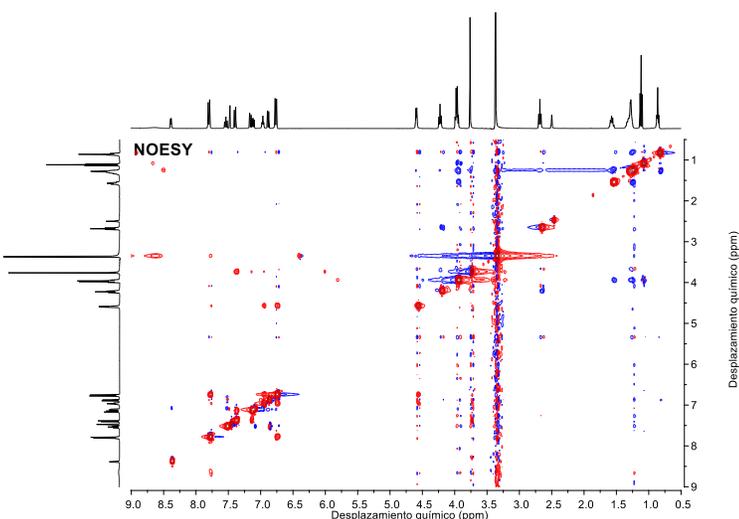
a)



b)

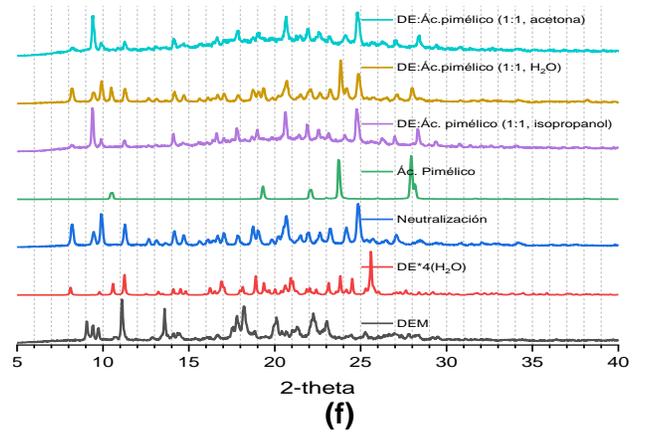
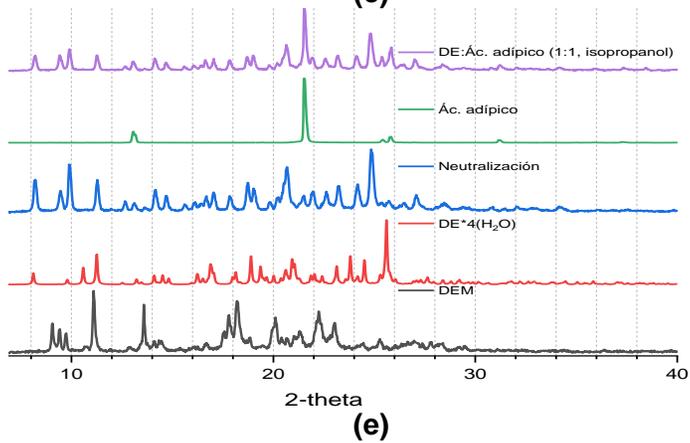
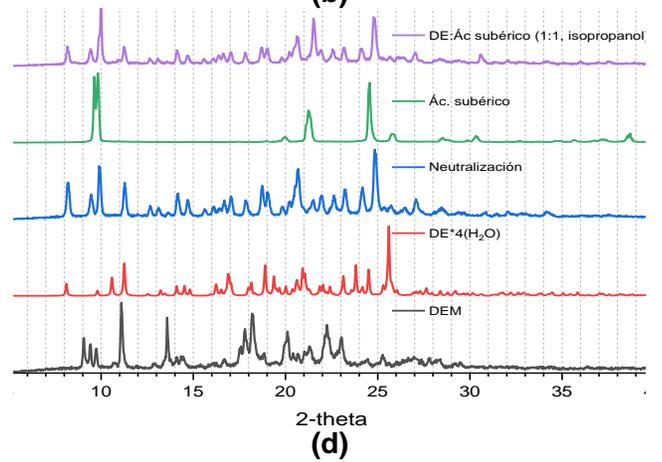
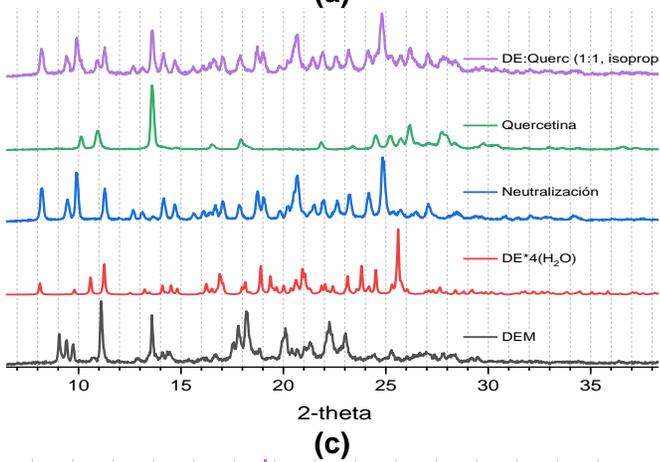
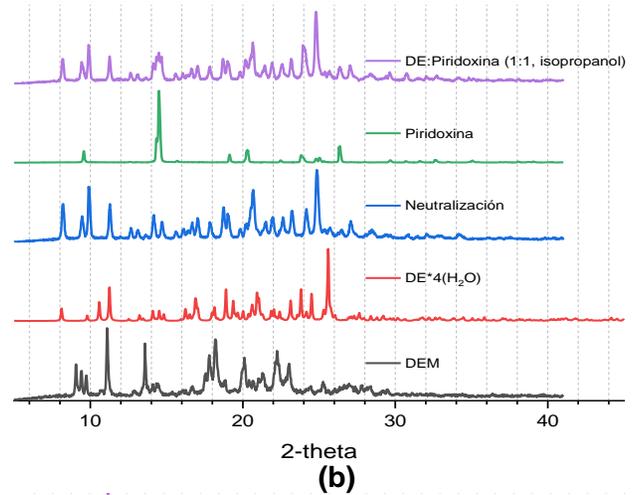
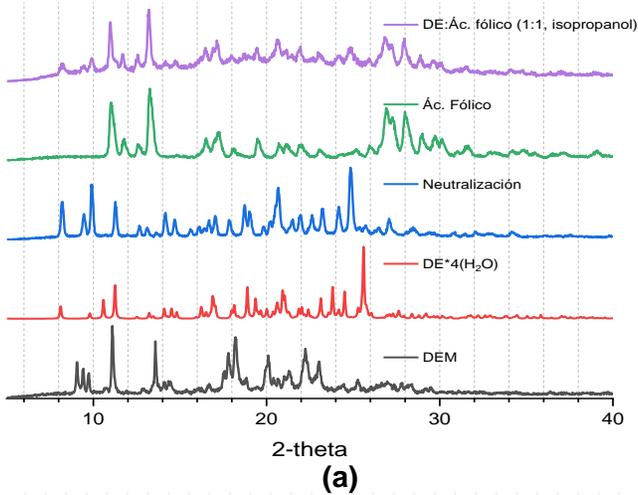


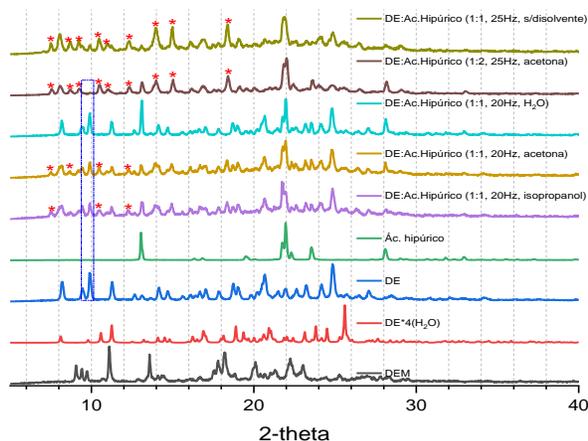
c)



d)

**Anexo 2** Correlación bidimensional por RMN para la molécula de DE ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz, DMSO- $d_6$ ), en a)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, b)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (dos o tres enlaces), c)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY H-H (a través de: acoplamiento escalar, CH - CH vecinos y a tres enlaces), y d)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY protones vecinos).

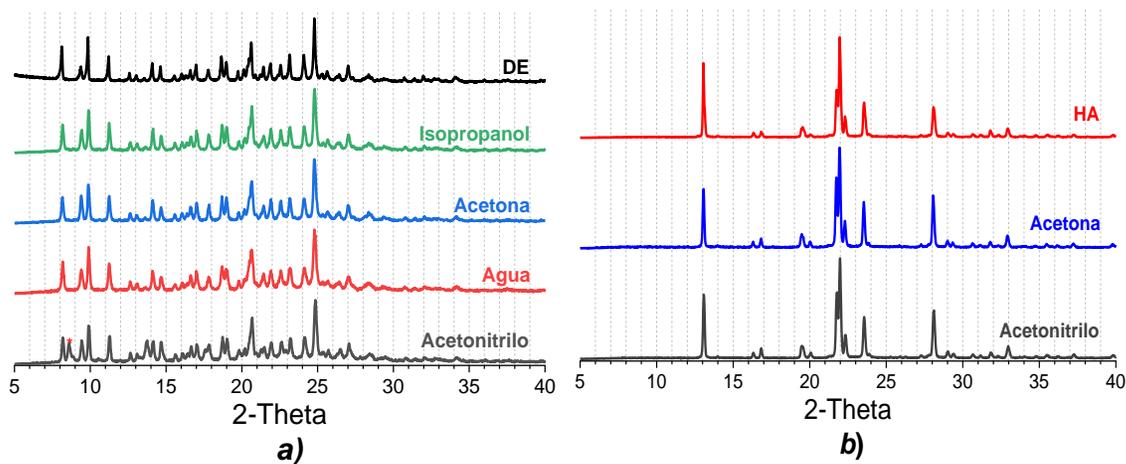




(g)

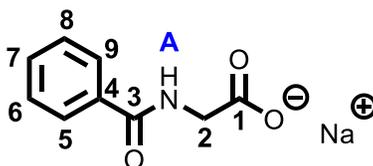
**Anexo 3** DRXP de materias primas y productos de molienda mecanoquímica asistida con gota de disolvente a 20 Hz durante 20 minutos, realizados con: (a) Ácido fólico (mortero, 20 minutos, disolvente 200  $\mu$ L); (b) Piridoxina; (c) Quercetina; (d) Ácido subérico, (e) Ácido adipico, (f) Ácido pimélico y (g) ácido hipúrico.

**Anexo 4** Estabilidad de fase de a) DE y b) HA en diferentes disolventes, resultados de molienda mecanoquímica



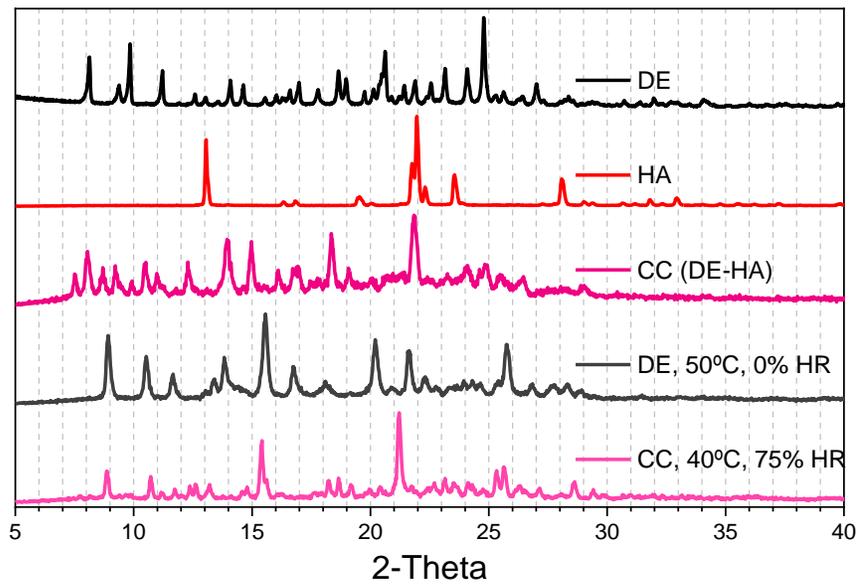
a)

b)



Se colocó en agitación, una mezcla equimolar de ácido hipúrico (2.7 g, 15 mmol) e hidróxido de sodio (0.6g, 15 mmol) en una mezcla de metanol (20 mL) y tolueno anhidro (60 mL), se calentó a reflujo por 2 horas a 400 rpm. Se removió el exceso de disolvente a vacío y se lavó con una mezcla de etanol (10 mL) y tolueno anhidro (30mL). RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ (ppm) 8.28 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, **A**), 7.867-7.828 (m, 2H, **5, 9**), 7.51-7.41 (m, 3H, **6, 7, 8**), 3.75 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, **2**). RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ (ppm) 43.3, 127, 128.3, 131, 134.6, 165.6, 171.9.

**Anexo 5** Metodología sintética y caracterización de la sal hipurato de sodio



**Anexo 6** Patrón de DRXP de DE-L1, HA, CC, DE después de haber sido almacenado a 50°C y 0% HR, y CC almacenado a 40°C y 75% HR.

**Anexo 7 ANOVA de dos vías del ABC de los perfiles de disolución de DEM, DE, MF y la NFS DE-HA bajo condiciones no-sink, en presencia o no de HPMC al 0.5%**

ANOVA TwoWay (07/10/2020 12:44:03)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

Medio de disolución

	N	Mean	SD	SEM	Variance	Missing	NonMissing
BIS-TRIS	12	406.56252	309.75153	89.41757	95946.01161	0	12
BIS-TRIS HPMC 0.5%	6	1882.25724	193.436	78.96992	37417.48508	0	6

Fase sólida

	N	Mean	SD	SEM	Variance	Missing	NonMissing
DEM	3	708.4488	112.37922	64.88217	12629.08872	0	3
DE	6	1052.38766	1053.22781	429.97845	1.10929E6	0	6
MF	3	137.2658	16.9443	9.7828	287.10934	0	3
DE-HA	6	1220.13732	595.20315	242.99067	354266.78682	0	6

Overall

	N	Mean	SD	SEM	Variance	Missing	NonMissing
	18	898.46076	765.16792	180.35181	585481.95117	0	18

Interaction

		N	Mean	SD	SEM	Variance	Missing	NonMissing
BIS-TRIS	DEM	3	708.4488	112.37922	64.88217	12629.08872	0	3
	DE	3	94.50274	12.46851	7.1987	155.46365	0	3
	MF	3	137.2658	16.9443	9.7828	287.10934	0	3
	DE-HA	3	686.03274	76.94127	44.42206	5919.95953	0	3
BIS-TRIS HPMC 0.5%	DEM	0	0	0	0	0	0	0
	DE	3	2010.27259	142.95457	82.53486	20436.00932	0	3
	MF	0	0	0	0	0	0	0
	DE-HA	3	1754.24189	154.73822	89.33815	23943.91642	0	3

ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Medio de disolución	1	9910.6778	9910.6778	0.95721	0.35097
Fase sólida	3	107625.30741	35875.10247	3.46493	0.0589
Interaction	3	561974.82061	187324.9402	18.09245	2.30153E-4
Model	7	9.84966E6	1.40709E6	135.90167	4.19435E-9
Error	10	103537.62849	10353.76285	--	--
Corrected Total	17	9.95319E6	--	--	--

At the 0.05 level, the population means of Medio de disolución are not significantly different.  
 At the 0.05 level, the population means of Fase sólida are not significantly different.  
 At the 0.05 level, the interaction between Medio de disolución and Fase sólida is significant.

Means Comparisons

Tukey Test

Medio de disolución

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
BIS-TRIS HPMC 0.5% BIS-TRIS	1475.69472	50.87672	41.01969	2.29295E-8	0.05	1	1362.33427	1589.05516

Fase sólida

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
DE DEM	343.93886	71.95055	6.76024	0.00347	0.05	1	123.81674	564.06099
MF DEM	-571.183	83.08134	9.7227	2.11336E-4	0.05	1	-825.35813	-317.00786
MF DE	-915.12186	71.95055	17.98704	7.4516E-7	0.05	1	-1135.24398	-694.99973
DE-HA DEM	511.68852	71.95055	10.05742	1.59066E-4	0.05	1	291.56639	731.81064
DE-HA DE	167.74966	58.74738	4.0382	0.06907	0.05	0	-11.97931	347.47862
DE-HA MF	1082.87152	71.95055	21.28422	7.07373E-8	0.05	1	862.74939	1302.99364

Interactions

Medio de disolución	Fase sólida	Medio de disolución	Fase sólida	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
BIS-TRIS	DE	BIS-TRIS	DEM	-613.94606	83.08134	10.45061	4.00972E-4	0.05	1	--	--
BIS-TRIS	MF	BIS-TRIS	DEM	-571.183	83.08134	9.7227	7.29088E-4	0.05	1	--	--
BIS-TRIS	MF	BIS-TRIS	DE	42.76307	83.08134	0.72791	0.99925	0.05	1	--	--
BIS-TRIS	DE-HA	BIS-TRIS	DEM	-22.41606	83.08134	0.38157	0.99999	0.05	1	--	--
BIS-TRIS	DE-HA	BIS-TRIS	DE	591.53001	83.08134	10.06905	5.46698E-4	0.05	1	--	--
BIS-TRIS	DE-HA	BIS-TRIS	MF	548.76694	83.08134	9.34113	0.00101	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	DEM	BIS-TRIS	DEM	--	--	--	--	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	DEM	BIS-TRIS	DE	--	--	--	--	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	DEM	BIS-TRIS	MF	--	--	--	--	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	DEM	BIS-TRIS	DE-HA	--	--	--	--	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	DE	BIS-TRIS	DEM	1301.82379	83.08134	22.15969	4.51405E-7	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	DE	BIS-TRIS	DE	1915.76985	83.08134	32.6103	0	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	DE	BIS-TRIS	MF	1873.00678	83.08134	31.88239	0	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	DE	BIS-TRIS	DE-HA	1324.23984	83.08134	22.54126	3.87561E-7	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	DE	BIS-TRIS HPMC 0.5%	DEM	--	--	--	--	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	MF	BIS-TRIS	DEM	--	--	--	--	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	MF	BIS-TRIS	DE	--	--	--	--	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	MF	BIS-TRIS	MF	--	--	--	--	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	MF	BIS-TRIS	DE-HA	--	--	--	--	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	MF	BIS-TRIS HPMC 0.5%	DEM	--	--	--	--	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	MF	BIS-TRIS HPMC 0.5%	DE	--	--	--	--	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	DE-HA	BIS-TRIS	DEM	1045.79309	83.08134	17.80153	3.42183E-6	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	DE-HA	BIS-TRIS	DE	1659.73916	83.08134	28.25214	0	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	DE-HA	BIS-TRIS	MF	1616.97609	83.08134	27.52423	0	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	DE-HA	BIS-TRIS	DE-HA	1068.20915	83.08134	18.1831	2.80844E-6	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	DE-HA	BIS-TRIS HPMC 0.5%	DEM	--	--	--	--	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	DE-HA	BIS-TRIS HPMC 0.5%	DE	-256.03069	83.08134	4.35816	0.13269	0.05	1	--	--
BIS-TRIS HPMC 0.5%	DE-HA	BIS-TRIS HPMC 0.5%	MF	--	--	--	--	0.05	1	--	--

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0.05 level.  
 Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 0.05 level.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>%CV</b>	Porcentaje del coeficiente de variación
<b>ABC</b>	Área bajo la curva (AUC, siglas en inglés)
<b>BIS-TRIS</b>	Buffer de BIS-TRIS pH 6
<b>COSY</b>	Correlación homonuclear
<b>DAB</b>	Dabigatrán
<b>DE</b>	Dabigatrán etexilato
<b>DE-HA</b>	Nueva fase sólida de DE-HA
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>DEM</b>	Mesilato de dabigatrán etexilato
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DMSO-<i>d</i><sub>6</sub></b>	Dimetilsulfóxido
<b>DRXP</b>	Difracción de rayos x de polvos
<b>DSC</b>	Calorimetría diferencial de barrido
<b>Et<sub>3</sub>N</b>	Trietilamina
<b>ETAC</b>	Acetato de etilo (por sus siglas en inglés)
<b>FDA</b>	Administración de medicamentos y alimentos (por sus siglas en inglés)
<b>FT</b>	Factor Tisular
<b>GRAS</b>	Generalmente reconocido como seguro
<b>HA</b>	Ácido hipúrico
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HMBC</b>	Correlación de enlace múltiple heteronuclear
<b>HSQC</b>	Coherencia cuántica única heteronuclear
<b>IFA</b>	Ingrediente farmacéutico activo
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>J</b>	Constante de acoplamiento medida en Hz
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de asociación de un IFA a su sitio de unión
<b>LD</b>	Límite de detección
<b>LQ</b>	Límite de cuantificación
<b>MF</b>	Mezcla física (DE-HA 1:1)
<b>mg</b>	Miligramos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>NFS</b>	Nueva(s) fase(s) sólida(s)
<b>NOESY</b>	Coherencia cuántica heteronuclear única
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>R</b>	Coeficiente de regresión
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RMN CP-MAS</b>	RMN con ángulo mágico de polarización cruzada de estado sólido
<b>RxC</b>	Reacción de cristalización
<b>RxS</b>	Reacción en solución
<b>SDG</b>	Molienda mecanoquímica asistida con gota de disolvente (por sus siglas en inglés)
<b>TGA</b>	Análisis termogravimétrico
<b>t<sub>max</sub></b>	Tiempo en el que se encuentra la máxima concentración de un IFA en sangre
<b>T<sub>onset</sub></b>	Temperatura de inicio de un evento térmico
<b>T<sub>peak</sub></b>	Temperatura de finalización de un evento térmico
<b>UV</b>	Ultravioleta

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Hemostasia primaria como respuesta de un daño vascular (Furie & Furie, 2008). .....	6
<b>Figura 2</b> Proceso de coagulación in vivo (Blann Andrew, 2014). Ver <b>Anexo 1</b> para más información sobre las proteínas y factores del sistema de coagulación. ....	8
<b>Figura 3</b> Proceso dinámico de la hemostasia (Blann Andrew, 2014). .....	9
<b>Figura 4</b> Número de casos de ECV reportados en México en el 2017 (Secretaria de Salud México, 2017).....	10
<b>Figura 5</b> Desarrollo de anticoagulantes y antídotos (Weitz & Harenberg, 2017). .....	12
<b>Figura 6</b> Estructura molecular de Dabigatrán Etexilato (DE). En rojo se muestran los átomos potenciales que pueden actuar como aceptores de puentes de hidrógeno, en los recuadros azules se muestran los grupos funcionales con capacidad de donar un puente de hidrógeno. ....	12
<b>Figura 7</b> Estructura química de a) la sal comercial (DEM), b) el profármaco dabigatrán etexilato (DE) y de c) la forma farmacológicamente activa, dabigatrán (DAB) (Solanki et al., 2018a) .....	14
<b>Figura 8</b> Diagramas de distribución de especies de DE en función del pH (EMEA, 2008) .....	15
<b>Figura 9</b> a) Unidad asimétrica de EFAXAM y b) crecimiento cristalino de EFAXAM en el eje a .....	17
<b>Figura 10</b> Estructuras y tamaños relativos de la trombina, DAB y de Idarucizumab (Reilly et al., 2016). .....	20
<b>Figura 11</b> Estructura química del dabigatrán etexilato, se muestra uno de los sitios de incisión por hidrólisis ácida .....	21
<b>Figura 12</b> Comparación de la distribución de la solubilidad del top de los 200 medicamentos orales en Estados Unidos (US), Gran Bretaña (GB), España (ES), Japón (JP) y de la lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud (WHO). Fármacos muy solubles: arriba de 1000 mg/mL; totalmente solubles: 100-1000 mg/mL; fármacos solubles: 33-100 mg/mL; escasamente soluble: 10-33 mg/mL; ligeramente soluble: 1-10 mg/mL; muy poco soluble: 0.1-1 mg/mL; prácticamente insoluble: <0.1 mg/mL. (Takagi et al., 2006).....	22
<b>Figura 13</b> Ejemplos de a) homosíntones y b) heterosíntones supramoleculares comúnmente estudiados y empleados en el diseño cristalino (donde R = H, alquil; X = Br, I) (Corpinot & Bučar, 2019). .....	24
<b>Figura 14</b> Posibles arreglos cristalinos en estado sólido de un IFA y su forma amorfa (Williams et al., 2013b). .....	26
<b>Figura 15</b> Diagrama de fase que indica la posible formación o disolución de un cocrystal ((Kuminek, Cao, Bahia, et al., 2016). .....	33
<b>Figura 16</b> Ejemplo de técnicas físicas y espectroscópicas para la caracterización de NFS según Healy y colaboradores (Healy, Worku, Kumar, & Madi, 2017). .....	34
<b>Figura 17</b> Orientación del spín cuando se aplica un campo magnético (Laurella, 2017). .....	36
<b>Figura 18</b> Representación de la ecuación de Bragg. La intensidad de dispersión máxima solo se observa cuando las diferencias de fase se suman a un múltiplo de la longitud de onda incidente $\lambda$ (Birkholz, 2006). .....	37
<b>Figura 19</b> Representación esquemática de curvas de DSC del barrido por (1) enfriamiento y (2) calentamiento, mostrando diferentes eventos térmicos de un polímero típico (Kalogerias, 2016). .....	38
<b>Figura 20</b> Perfil de disolución de un IFA amorfo (de alta energía) con respecto al tiempo (Williams et al., 2013b). .....	43
<b>Figura 21</b> Esquema general de las estrategias experimentales empleadas para el desarrollo y evaluación de la NFS del presente proyecto .....	49

<b>Figura 22</b> Esquema de la neutralización de la sal comercial DEM a su base libre DE. ....	50
<b>Figura 23.</b> Esquema general de la técnica de solvent shift, se empleó BIS-TRIS como medio con o sin polímero. ....	56
<b>Figura 24</b> Reacción de neutralización de la sal comercial DEM a DE, su base neutra. ....	58
<b>Figura 25</b> Espectros IR de DEM (superior) y DE (inferior). Se señalan las bandas de los grupos funcionales relevantes. ....	60
<b>Figura 26</b> Numeración de los núcleos de carbono en DEM para su análisis por RMN <sup>1</sup> H. Se toma en cuenta la misma numeración para la fase neutra DE. ....	62
<b>Figura 27</b> Comparación de los espectros parciales de RMN- <sup>1</sup> H para DEM y DE en DMSO-d <sub>6</sub> a 400 MHz. ....	62
<b>Figura 28</b> Espectro parcial en 2D de la zona aromática de la molécula DE, correlación heteronuclear HSQC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) (100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ). ....	64
<b>Figura 29</b> Espectros parciales de RMN- <sup>13</sup> C para DEM y DE en DMSO-d <sub>6</sub> a 100 MHz ....	65
<b>Figura 30</b> Análisis térmicos para a) DEM y b) DE provenientes de los diferentes lotes de la reacción de neutralización ....	69
<b>Figura 31</b> Patrones de difracción de DRXP de la fase neutra tetrahidratada, la sal comercial (DEM) y de los lotes obtenidos de la neutralización con diferentes grados de hidratación. ....	70
<b>Figura 32</b> Estructura molecular de DE, en rojo se muestran los grupos funcionales con capacidad de aceptar un puente de hidrógeno, y en azul se muestran los grupos funcionales capaces de donar un puente de hidrógeno. ....	72
<b>Figura 33</b> Estructura cristalina de DE tetrahidrato reportado en la CSD (Refcode EFAXAM (Cai et al., 2016)) ....	72
<b>Figura 34</b> Comparación de los difractogramas de las materias primas (DE y Quercetina) con el del producto obtenido entre DE y Quercetina mediante SDG ....	75
<b>Figura 35</b> Productos de síntesis entre DE-L1 y HA. En a) se muestran los difractogramas de los productos de síntesis empleando diferentes disolventes, en b) se muestran las diferentes estequiometrias ensayadas mediante métodos mecanoquímicos (50 mg de mezcla, 20 Hz durante 20 minutos y 15 µL de acetona). ....	77
<b>Figura 36</b> Patrón de PXRD de materias primas y el producto obtenido por RxC ....	78
<b>Figura 37</b> Determinación de la estequiometría de la NFS DE-HA mediante RMN- <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz). En las secciones en amarillo se destacan algunas señales correspondientes a HA, mientras que en rojo se destacan aquellas correspondientes a DE. ....	79
<b>Figura 38</b> Difractogramas de los productos de síntesis de la NFS DE-HA mediante RxS y RxR en estequiometría 1:1. ....	80
<b>Figura 39</b> Patrones de DRXP de las materias primas (DE y HA), así como de los productos de síntesis de la NFS de DE-HA (1:1) mediante RxC y molienda mecanoquímica con acetona variando el tiempo de molienda. ....	81
<b>Figura 40</b> Patrón de DRXP de materias primas y sólidos obtenidos por RxC y SDG con acetona en escala de 2 g. Para la síntesis por SDG se empleó el Lote 1 de DE (3.5*H <sub>2</sub> O) ....	82
<b>Figura 41</b> Caracterización termogravimétrica de a) DE, b) HA y c) la NFS (DE-HA). ....	83
<b>Figura 42</b> Espectroscopía IR para DE, HA, la NFS (DE-HA) y la sal hipurato de sodio. ....	85
<b>Figura 43</b> Espectro parcial de RMN- <sup>13</sup> C correspondiente a DE, la NFS, el coformador HA, y la sal de hipurato de sodio (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz). En amarillo se resaltan las señales correspondientes al grupo metileno y al ácido carboxílico del ácido hipúrico. ....	86
<b>Figura 44</b> Espectros de RMN de <sup>13</sup> C en líquidos y sólidos (RMN CP-MAS) de DEM y DE. La adquisición para ambos casos se realizó a 125 MHz. Se empleó DMSO-d <sub>6</sub> como	

disolvente en la RMN en solución, y en estado sólido se emplearon las señales del adamantano como referencia. ....	87
<b>Figura 45</b> Comparación de los espectros de RMN de <sup>13</sup> C en solución y en estado sólido de HA. La adquisición para ambos casos se realizó a 125 MHz. Se empleó DMSO-d <sub>6</sub> como disolvente en la RMN en solución, y en estado sólido se emplearon las señales del adamantano como referencia. ....	88
<b>Figura 46</b> Espectros de <sup>13</sup> C CP-MAS de HA, DEM, DE-L2 y DE-HA. La adquisición se realizó a 125 MHz a temperatura ambiente, se emplearon las señales del adamantano como referencia. ....	89
<b>Figura 47</b> Espectros de absorción de DE en BIS-TRIS pH 6.....	90
<b>Figura 48</b> Comparación de los patrones de DRXP de a) DE, b) HA y en c) DE-HA después del estudio de estabilidad de fase en diferentes medios farmacéuticamente relevantes (a 37 °C y 100 rpm). En las secciones en amarillo (en a y c) se muestran los picos nuevos debido a que los sólidos sufren una transformación de fase en solución. En el recuadro punteado en c se muestran aquellos picos provenientes de DE-HA que sufren transformación de fase a DE a pH 4.5 y 6.....	94
<b>Figura 49</b> Difractogramas de la estabilidad indicativa de a) DEM, b) DE-L1, b) HA y c) DE-HA almacenados durante un mes bajo diferentes condiciones de estrés de temperatura y humedad .....	96
<b>Figura 50</b> Análisis térmicos de a) DE y del sólido resultante de la estabilidad indicativa; así como en b) la NFS DE-HA y el sólido resultante de la estabilidad indicativa. ....	98
<b>Figura 51</b> Monitoreo de la estabilidad de DE-L1 y del producto que sufrió transformación de fase a 50 °C y 0% HR mediante RMN, en a) <sup>1</sup> H y b) <sup>13</sup> C. Experimentos realizados a 400 MHz para <sup>1</sup> H y 100 MHz para <sup>13</sup> C, en DMSO-d <sub>6</sub> . ....	99
<b>Figura 52</b> Monitoreo de la estabilidad de la NFS DE-HA y de su producto que sufre transformación de fase (40°C y 75% HR) mediante RMN, en a) <sup>1</sup> H y en b) <sup>13</sup> C. Experimentos realizados a 400 MHz para <sup>1</sup> H y 100 MHz para <sup>13</sup> C, en DMSO-d <sub>6</sub> .....	100
<b>Figura 53</b> Perfiles de disolución de polvos en condiciones no-sink para DE-L2, DE+HA (mezcla física 1:1), DEM y DE-HA en BIS-TRIS pH 6, 37 °C n=3 +DE. ....	102
<b>Figura 54</b> Análisis de la estabilidad de fase mediada en solución de (a) la sal comercial (DEM), (b) del IFA neutro (DE-L2) y (c) de la NFS (DE-HA) en buffer BIS-TRIS pH 6 a 37 °C. ...	104
<b>Figura 55</b> Monitoreo del grado de supersaturación de DE en presencia y en ausencia de diferentes polímeros inhibidores de la precipitación en BIS-TRIS pH 6 [0.74M], n=3 ± D.E. ....	106
<b>Figura 56</b> Perfiles de disolución de polvos para DE y DE-HA en BIS-TRIS pH 6 con HPMC predisoluto al 0.5%, n=3 ± DE. ....	107
<b>Figura 57</b> Estudios de la estabilidad de fase de DE-HA cuando se encuentra en contacto con HPMC al 0.5% (p/v) predisoluto en BIS-TRIS .....	108
<b>Figura 58</b> Posibles interacciones en solución entre DE y HPMC .....	109
<b>Figura 59</b> ABC de los perfiles de disolución de las materias primas y de la NFS DE-HA en medio BIS-TRIS pH 6, n = 3 ± DE .....	110

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Principales características fisicoquímicas de DE y la sal comercial DEM .....	15
<b>Tabla 2</b> Datos cristalográficos de dabigatran etexilato tetrahidrato (Cai et al., 2016).....	16
<b>Tabla 3</b> Contraiones disponibles para la formación de una sal (Gupta et al., 2018).....	28
<b>Tabla 4</b> Cocrystal farmacéuticos comercialmente disponibles (Kavanagh, et al.,2019). .....	30
<b>Tabla 5</b> Número de estructuras cristalinas y porcentajes de AB (cocrystal) y A·B <sup>+</sup> (sal) dentro de las tres diferentes zonas de $\Delta pK_a$ (Cruz-Cabeza, 2012) .....	51
<b>Tabla 6</b> Bandas relevantes en el espectro IR de DEM y DE (Cai et al., 2016; Solanki et al., 2018a) .....	60
<b>Tabla 7</b> Desplazamientos químicos ( $\delta$ ppm) para DEM y DE provenientes de RMN de <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C .....	66
<b>Tabla 8</b> Ángulos 2-Theta e intensidad relativa de los picos de difracción de DE tetrahidrato y de los lotes obtenidos de DE .....	71
<b>Tabla 9.</b> Formadores de cocrystal propuestos del cribado in silico, se muestra el Refcode de la CSD, % de éxito de generación de una NFS y estructura química. ....	74
<b>Tabla 10</b> Curva de calibración para la cuantificación de DE por UV-Vis a 336 nm en BIS-TRIS pH 6.....	91
<b>Tabla 11</b> Calificación de la curva de calibración para cuantificar a DE. Curvas de calibración realizadas en buffer BIS-TRIS pH 6 [0.074M] .....	92
<b>Tabla 12</b> Resultados de los estudios de la estabilidad indicativa para DEM, DE, HA y DE-HA .....	97
<b>Tabla 13</b> Áreas bajo la curva y cociente ABC de los resultados de disolución de polvos de los diferentes sólidos de interés en presencia y ausencia del polímero HPMC al 0.5% en el medio BIS-TRIS pH 6.....	110

Cuernavaca, Morelos a 13 de marzo de 2020

Folio: FF/D/SAC/CIP/MF/046/2020

**L.F. FLOR MAGALI RODRÍGUEZ SOTO**  
**ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA**  
**P R E S E N T E**

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado le asignó el siguiente jurado para evaluar la tesis "**Diseño, síntesis y caracterización de una nueva fase sólida de un IFA con efecto anticoagulante**"

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

**PRESIDENTE:** Dr. Efrén Hernández Baltazar  
**SECRETARIO:** Dr. Juan Manuel Martínez Alejo  
**VOCAL 1:** Dr. Víctor Barba López  
**VOCAL 2:** Dra. Adriana Valladares Méndez  
**VOCAL 3:** Dr. Herbert Höpfl Bachner

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*  
*Una universidad de excelencia*



**DR. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA**  
**JEFATURA DE POSGRADO**



*Facultad  
de Farmacia*  
**POSGRADO**

ccp: archivo: Dr. Efrén Hernández Baltazar, Dr. Juan Manuel Martínez Alejo, Dr. Víctor Barba López, Dra. Adriana Valladares Méndez, Dr. Herbert Höpfl Bachner

mitv

**UA  
EM**

*Una universidad de excelencia*

RECTORÍA  
2017-2023

---

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre de la alumna:** Flor Magali Rodríguez Soto

**Título de la tesis:** "Diseño, síntesis y caracterización de una nueva fase sólida de un IFA con efecto anticoagulante"

---

---

**Grado a obtener:**

- Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Efrén Hernández Baltazar

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

---

---

---

\_\_\_\_\_  
Dr. Efrén Hernández Baltazar

**3 de Noviembre del 2020**  
Fecha



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

#### Sello electrónico

**EFREN HERNANDEZ BALTAZAR** | Fecha:2020-11-03 15:12:38 | Firmante

InoRhnBF+TY10dTMo8pKykMcmOd5DDHeHFL4AHd484W5EwxFPRAUIU2aB4qZyKvWnqEts/a7ee4befG6W1t5xuF3fhsr/4N9mPRNroVtKD6M/gOH744NqryXZlmz6FZhb7G0s knAcbb/16NwJUms5YXB84o54cqsUuuVpn5ng1GfnhiZZamcoFs6Ln43EM60Jta2OdH/WwvumuYy9i8+1x8O+1XgX1Wfdi6t5PspPdvEBwyjxndbi6as33w64j7JH4V+AGMmOB+u ykflqLsxfMVLmryNkbiYTx01pL2B/m7T0SABmbVHkOxRaFUVMyK1gGnM8Qt1UBQ7uH6Oyxlw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



s0QU5J

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/W4xHMmd4yniH56nvrVYZduabzePmAp6s>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre de la alumna:** Flor Magali Rodríguez Soto

**Título de la tesis:** "Diseño, síntesis y caracterización de una nueva fase sólida de un IFA con efecto anticoagulante"

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Víctor Barba López

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Dr. Víctor Barba López

**3 de Noviembre del 2020**  
Fecha



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

VICTOR BARBA LOPEZ | Fecha:2020-11-03 22:05:37 | Firmante  
RQyH2SmdTsgHymkF15UtgYBXfSgsyVrLLR0QX0V0vfmwohHbcyUTsKINr+uPRIK60U1PFvJMKZbGoHUIYsRoprhBkNID2OKM1mu5IKJH95+QJZ+K6Wix5y2MaKgwaPIHJ2jXqX  
A/T8av5iGxgkMpk7JBirdt9m/PGDcFBHL3ip+p+v1xEs6tGFyBGJHCK9I4nhDJoC9Cfs0yANvJIRmt+Uc+R6DA5qqjNTsA6tvLZKO+2Y59r/0nF9/u61VsvqbcJsuJsCpsoNqDwTx5+  
OU/2vZLnzoPk2T4xKLMOdFC1ikesygl6ipAYtv7K7i0SihNG4jjXUnAs3ycVGTdqRdQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



VzEXf4

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/7I29kYFPiroTBKRYI51aBskPkcZM13RW>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre de la alumna:** Flor Magali Rodríguez Soto

**Título de la tesis:** "Diseño, síntesis y caracterización de una nueva fase sólida de un IFA con efecto anticoagulante"

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Juan Manuel Martínez Alejo

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Manuel Martínez Alejo

**3 de Noviembre del 2020**  
Fecha



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

**JUAN MANUEL MARTINEZ ALEJO** | Fecha:2020-11-03 20:50:08 | Firmante  
Zs16h/8OsXB274yKZADafLgju5KE+TZDVIIXZz8fSHTkcr4lJxq19FDWYbWP5+TMBUgJSew3S3dCinfqaVMd8qCHxmOIWSDlyMfj87+PmGSih1NdksylSWDaYz/ULAv/WVvflaPw37Bd/Wmbk6FDWG9YpUirXCAgmBqkDACL/9XvzTlo3K1RUR2GTMn2UcAk847b9p7d1cneBrYQ9z7r02HHajrKkxvZ7E6zRap6TguzPca1vrv5Vj3qYGf010A/oP0jsHAkhmD0ldbd005km6JCtsxMkCLw3M5M5dSoTisqBlz/TdhcG9arRaYJQobz1x8TLcFPFw0o6nHISoxEA==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

[Nzc0eK](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/kNRDrzH3ManYs5R4LsHgxxvhYdC8IEWf>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre de la alumna:** Flor Magali Rodríguez Soto

**Título de la tesis:** "Diseño, síntesis y caracterización de una nueva fase sólida de un IFA con efecto anticoagulante"

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Adriana Valladares Méndez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Dra. Adriana Valladares Méndez

**3 de Noviembre del 2020**  
Fecha



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

ADRIANA VALLADARES MENDEZ | Fecha:2020-11-04 10:45:55 | Firmante  
oTJUxSTTsQV8tMs2KUghWv9JbpTsnFtOhRndUT+Y9eeANEchbdQnNy3eZBIOfaUYEoGg4Rr/aaa4DlJhsOTSC18NswwyRVHqD9WZg2Xqj8ydp0hKGMJJ07vqVePZJrdoZV/4vc5MjCoFF88d+3DlImSAV+sBliqNpAW486rTV9qzqCqVh15zqwmyzzKbp2Qtr/7zi3+kBMXxwhp2sMxQAsxzu0kaNQ6mGLuuNUZMuz9elo3711IvcuYcyf7zH4C2TQszM1c9ARXPMZD5CK/BFFGC0riqCmURhhk/gI8APWa1gkpf81xNL6dqFTOCIAipNYFdNlyOpAwIhmYwwY5g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



oXNJx4

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/weADj1sXIX6FrYLhUI7h9XwCf7F3WO3K>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



**VOTO APROBATORIO**  
**PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA**  
**FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre de la alumna:** Flor Magali Rodríguez Soto

**Título de la tesis:** "Diseño, síntesis y caracterización de una nueva fase sólida de un IFA con efecto anticoagulante"

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Herbert Höpfl Bachner

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Dr. Herbert Höpfl Bachner

**3 de Noviembre del 2020**  
Fecha

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

#### Sello electrónico

HERBERT HOPFL | Fecha:2020-11-05 20:31:06 | Firmante  
mAD2Y4KwKfdZ4havKGCRCGWMtDZuNzuPHKFTqE/9EKYJEqcGO1Q+JHT0j7AdCE36GPfZMAIHwX96iBB+WtyhBd5mzpf13uDZkxP+bU2kk0zpfwSJNZ0vTJ+qhnvRVx/aOSJA  
dTVfnj7CXBPMxjKpN6/uk5s2t9BmBPFIPMwHrpxxGWZfQ+U+19+AEXM8F2KEeU68kHAePvVzFTY4hitL6JcrPV2IU0B+Kv4/3dfGhlcck075XYIW3cVEW6fW68ix60sF9+jw1/f  
QqVamahyzLi0G7K/FBDGswtUf84CFrLhPIH6kLoF/IMGKR4tD3oeJbrAmUFOGpzoVLWw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



LIQoS4

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/4LUaAkMleXL7uziLGby0utA8wb8XLRXG>