



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Secretaría de Docencia**

Jefatura de la Licenciatura en Farmacia

**Fecha: 29 de julio de 2020**  
**Asunto: VOTOS APROBATORIOS**  
**Medio de Notificación: Electrónica**  
**Folio: FF/D/SD/JLF/0117/2020**

**DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**U.A.E.M**  
**PRESENTE**

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado la tesis titulada **“Cocrystalización como herramienta para modificar el perfil biofarmacéutico del Clorhidrato de Moxifloxacino”** presentada por el pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia **C. Leonardo Romo Patiño, Matricula 20151009847** consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**Jurado**

**Firma**

Dr. Efrén Hernández Baltazar

\_\_\_\_\_

Dr. Jorge Armando Moreno Escobar

\_\_\_\_\_

Dr. Sergio Alcalá Alcalá

\_\_\_\_\_

Dr. Juan Manuel Martínez Alejo

\_\_\_\_\_

Dr. Hugo Morales Rojas

\_\_\_\_\_

**ATENTAMENTE**  
**“POR UNA HUMANIDAD CULTA”**  
*Una Universidad de Excelencia*

\_\_\_\_\_  
**MPD. Reyna América Serrano López**  
**Secretaría de Docencia**

\*Lba





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

**REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ** | Fecha:2020-07-29 13:29:19 | Firmante

BwzpVkmKiOXwR+tlow60kSOpoYvSXyWR3SlbmX8ymBHqg452NS8lmT0nDoXKPL19RImVHudx/jtTgf3p97g9OBLrzTq5+QKlyMtu8LZDY5QG07pDNeeBMv6/4QDQ0MCmvZ5l+InxtXPzMIKpTschTnu/YjNr5xIN3TKmldTJi35yt3kUnEc9XAKmHqeoH YiEYCVSFBWeH5JcqqObLoXDzNBzOYI4ujdFB/jWDRCE9hZItj6oE4P0PNvmZUOaF2eqaW3jKFTIdVIB5o+Ng3S7KQXLR572dH4HnjVLut5SCWoAegOY28vjcmpl0MMHLZGtzBf2Q0oWJ2c+5EwwIT5aCw==

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



XzE7rY

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/aZWscgwXG90a7V0fU8v6kGzoM4Kn5dzp>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

**SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2020-09-29 16:11:51 | Firmante**

BoH7Tof5KrL9rW23T/y2Hg9jVEmLxyBk4r/2JAJONj84XY6neRbm0bqscw7jJa+LVRvK4TweEbC5JQLEiA9imTzUGewKzeTybT44FdkJGwwB9HoF5mAOF7YEV7YhJQAP7Ofiyg wXqsje4YW+DTXbyS+BcZlqEfh6lYUHXp16uVKCDDimMIOPOAtoJcCD05iErq+mHFw0O9qJe25nVKFkfnww7Fk2GqwfLNGI2vwHbZWaS+FamoQGmlroxfS+WBuBkt6J+JPzB2 mGef+7Op15pm1WoH75jHv4voMlnMceB9eeHWu8GHXhXnyyRGW5uPMle1a/+hx70hFp61LYWUzSw==

**JORGE ARMANDO MORENO ESCOBAR | Fecha:2020-09-29 19:14:20 | Firmante**

4XZ5q/0o5goFWvnp7L/viYziW2p9BzUZKBQ6EZt8JTZCFajM5LD5qw+8clLIAvwSiW5msW4uNOhQfBaD4COWyJ4k1J2pDiyv+1BLSidSotuCYrvJcLD+DhSG456euENu1NNrL+ XbTiP9d02s4w5h13fTBpPatppnK7YCCQ8ZwivGsYCsY5XCAkaPBwa/5Kp0sACkjEviFRp0kCYWjwMYb3Y8khi+AVUsOuJu005QnE1U5yrDfiaaXh+RLR+NldxDmonDQ1UiYVWVU A4tgM0C0BQsKhErS8j2x4QCXPaC2JYX/aj9JY25k0mdJ5hiaTYndh7ynbZSexZb9DrYASICGQ==

**JUAN MANUEL MARTINEZ ALEJO | Fecha:2020-09-29 21:23:14 | Firmante**

JlIGhFBKWR9pjlVusM9AhoNmkU09Jge3EuX6FHLm77mpL1FoFIMh3QPM68nFab8rdoXWN3/C003RrK4tHfQYmpeTDfhVO86drb3h6lxeSuWQ2Zal0uUznVtShV2E8WKyAdgY IGYZR9Mnk38QLhwePGN763ydVQjHo91OxwBNC20MPD15/GkvDxvvr4Gz6oht2PSau6QO88kV4/NYa4wZA7hDHI6x/phoelVUHdaOblyrt/tlZXTaJNCEqdvhNdkO8aZrvmO5v1 JcTy7tKYp8oYJoG+1Yb36/nlnp3eBpRVmk/OcUYjHPCUeaSzbeIGSxtlOycQPz+FOGPGD0g==

**EFREN HERNANDEZ BALTAZAR | Fecha:2020-09-30 01:15:26 | Firmante**

izMBM9A1XzmvTRGoCoJnN7s04d2gpwwkeIUovpM72nLfJLX+9SOSru54cm5ur25Msl+jUjBmvyxAUda5q2Ook1h+rZHeAwCuBsmOg6BkiQQClYInkVZQIL77AMDofv368JulzViB YWcWHwp8zu65oMSdeEUgXGJSVGoHERXrqzob/K0Z3/2cAq/HqtU9ld+PfxExZTWKCC20B1ncWLquBdlqrxW84GAnQSPeiHnesx84SYI9yY3ldhv7NwBpJpnPL9NzfZZyuF0q0 Ajf4w7zq0rOMCeE0UfwFDy3grd3YhQww8UvEEzvhUEO1g3p5QEpjUj50x+muX/uaZdzbw==

**HUGO MORALES ROJAS | Fecha:2020-09-30 22:34:36 | Firmante**

CsRkKetOQ4wPgEhOSSVeBFBg0xaNq4j5EppjK0Xt0m0wLcPEP8PvbtgwNr0My//zsTNwrU/A3BH8c8gsb+dtBLUH/pkxaYvVVG5KdfriyQK+OlwVZXhHBFCCgX++72NF0X/mvV KBA5c0L/pd9F5s0/JpXmVx1V0XG+UkbejqW5q5CTT0Eo4aS6FoYfXcEV4+kcTH9u5da3tszzTNIABokrFF6rNlwOOXbsis75s5UjiiA383fkFQ2NTtJu9ZaOk9Q0D2MMQcf8rgOEu CRZ8UY+SWN0k/WKJrZFRnWmxDDGLur0ZzZggW0B8gjlUfbNwuQNIq3bC8/6gl5BmabJorw==

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



RNE0rX

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/efZWO32SsEzpfIHnms0wfWbWQMCGbd7W>





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DEL ESTADO DE MORELOS**



**FACULTAD DE FARMACIA**

**COCRISTALIZACIÓN COMO  
HERRAMIENTA PARA MODIFICAR EL  
PERFIL BIOFARMACÉUTICO DEL  
CLORHIDRATO DE MOXIFLOXACINO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN FARMACIA**

PRESENTA:

**LEONARDO ROMO PATIÑO**

DIRECTOR DE TESIS:

**DRA. DEA HERRERA RUIZ**

ASESOR TÉCNICO:

**DR. JUAN MANUEL MARTÍNEZ ALEJO**

Cuernavaca, Morelos.

Octubre de 2020



El presente trabajo se elaboró en las instalaciones del Laboratorio 2 de la Facultad de Farmacia, bajo la asesoría de la Dra. Dea Herrera Ruiz y el Dr. Juan Manuel Martínez Alejo. Por lo cual, les agradezco todas las horas que pasaron corrigiendo la discusión de resultados. También, agradezco el apoyo del Dr. Alcalá, el Dr. Hernández, el Dr. Morales y el Dr. Moreno. Su presencia complementó y enriqueció mi trabajo.

Agradezco el apoyo de mis padres y seres queridos, los cuales siempre creyeron en mí. Sin duda, no hubiera podido llegar tan lejos sin su presencia.

Gracias a Madeli, que siempre estuvo apoyándome en todas mis actividades. Nunca olvidaré todo el apoyo de tu parte, fuiste y siempre serás un pilar muy importante en mi vida. Espero que podamos crecer juntos y tener muchas más aventuras en el futuro. Mortios unidos.

Hago una mención especial para las personas que han sido mis mejores amigos y confidentes durante toda la carrera. Espero que cumplan todas sus metas y lleguen muy lejos. También, agradezco mucho el compañerismo de todos los miembros del laboratorio 2; Magui, Yennifer, Guadalupe, Jocce, Jenifer, Cristian, Reynaldo y demás integrantes del grupo de investigación FF-CIQ.

# I. ÍNDICE

I.	ÍNDICE.....	3
II.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
III.	ÍNDICE DE TABLAS.....	9
IV.	ABREVIATURAS.....	10
V.	RESUMEN.....	11
1.	INTRODUCCIÓN.....	13
2.	ANTECEDENTES.....	14
2.1	El estado sólido.....	14
2.1.1	Sales farmacéuticas.....	16
2.1.2	Polimorfismo.....	17
2.1.3	Ingeniería de cristales.....	18
2.1.4	Cocristales farmacéuticos.....	19
2.1.4.1	Formadores de cocrystal.....	20
2.1.4.2	Síntesis de cocristales.....	20
2.1.4.3	Ventajas de los cocristales farmacéuticos.....	21
2.2	Caracterización física de sólidos.....	22
2.2.1	Infrarrojo (IR).....	23
2.2.2	Difracción de Rayos X de Polvos (DRXP).....	25
2.2.3	Análisis termogravimétrico (TGA).....	26
2.2.4	Resonancia magnética nuclear (RMN).....	28
2.3	Caracterización biofarmacéutica de sólidos.....	28
2.3.1	Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.....	28
2.3.2	Solubilidad.....	30
2.3.3	Permeabilidad.....	31
2.3.4	Disolución.....	32
2.4	Clorhidrato de Moxifloxacino.....	34
2.4.1	Farmacocinética.....	35
2.4.2	Farmacodinamia.....	35
2.4.3	Propiedades físicas.....	36

2.4.4	Reto farmacéutico.....	38
2.5	Nuevas formas sólidas de Clorhidrato de Moxifloxacino .....	39
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
7.1	Cribado de las NFS por RxS.....	44
7.1.1	Cribado de la NFS MoHCl-DTA por RxC.....	44
7.1.2	Determinación de la estequiometría en los cocristales .....	44
7.2	Molienda asistida por disolvente .....	44
7.3	Caracterización física .....	45
7.3.1	Difracción de Rayos X de Polvos (DRXP) .....	45
7.3.2	Análisis termogravimétrico (TGA) acoplado a Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	45
7.3.4	Infrarrojo .....	45
7.4	Preparación de soluciones buffer .....	46
7.4.1	Solución de HCl 0.1 N .....	46
7.4.2	Solución de NaOH 0.1 M .....	46
7.4.3	Buffer de pH 1.2.....	46
7.4.4	Buffer de acetatos pH 4.5 .....	46
7.4.5	Buffer de fosfatos pH 6.5 .....	47
7.5	Método de cuantificación.....	47
7.6	Determinación de la solubilidad de las NFS.....	48
7.7	Determinación de la velocidad de disolución intrínseca .....	48
7.8	Disolución de polvos .....	50
7.9	Evaluación de la transformación de fase.....	50
7.9.1	Pruebas complementarias para la evaluación del grado de polimorfismo.....	51
7.10	Prueba de estabilidad indicativa .....	51
<b>8</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>52</b>
8.1	Caracterización física de las materias primas .....	52
8.1.1	Difracción de Rayos X de Polvos (DRXP) .....	52



8.1.2	DSC/TGA.....	53
8.2	Cribado de nuevas fases de las NFS .....	56
8.2.1	DLMA y 24DBA .....	56
8.2.2	Con el coformador DTA.....	61
8.3	Caracterización física de las NFS sintetizadas.....	64
8.3.1	MoHCl-DLMA.....	64
8.3.2	MoHCl-24DBA .....	66
8.4	Evaluación biofarmacéutica.....	68
8.4.1	Espectros de absorción .....	69
8.4.2	Método de cuantificación de MoHCl .....	72
8.4.3	Pruebas de solubilidad .....	73
8.4.4	Pruebas de disolución intrínseca .....	80
8.4.5	Disolución de polvos.....	83
8.4.6	Cuantificación del coformador 24DBA.....	86
8.5	Pruebas de estabilidad indicativa .....	87
8.6	Estudios de estabilidad de fase sólida en diferentes disolventes de relevancia farmacéutica.....	88
8.7	Resumen de estabilidad de fase de MoHCl y los cocrisales .....	91
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>94</b>
<b>10</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>95</b>
<b>11</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>96</b>
<b>12.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>103</b>
	Anexo 1. Polimorfos de MoHCl.....	103
	Anexo 2. Análisis de DRXP de los polvos obtenidos de la RxC de MoHCl-DTA .....	107

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Sólidos cristalinos (izquierda) y amorfos (derecha). (Lichtenstein, L., Heyde, M., & Freund, H. J. 2012) .....	15
Figura 2 Clasificación de los tipos de fases que conforman el estado sólido de la materia. (Modificado de Newman, A., Wenslow, R. 2016). .....	16
Figura 3 Sintones supramoleculares, a) homosinton y b) heterosinton (Duggirala, Perry, Almarsson, & Zaworotko, 2016).....	18
Figura 4 Ensamblaje de una molécula por medio de sintones. Modificado de (Desiraju, 2003). .....	19
Figura 5 Aplicaciones de la espectroscopía de infrarrojo dentro del ámbito farmacéutico. Modificado de (Kalinkova, 1999).....	23
Figura 6 Espectro electromagnético de la región visible (abajo), espectro electromagnético de la región infrarrojo (arriba). Modificado de (Rodgers et al., 2008). .....	24
Figura 7 Cambio de un dipolo en una molécula diatómica heteronuclear. Modificado de (Stuart, 2004). .....	25
Figura 8 Tipos de vibraciones moleculares detectadas por el espectro IR. Modificado de (Stuart, 2004). .....	25
Figura 9 Funcionamiento del equipo de Rayos X de Polvos, desplazamiento y detección de estos. Modificado de (Dann, 2000). .....	26
Figura 10 Sistema de clasificación Biofarmacéutico. Modificado de (Mehta et al., 2017). .....	29
Figura 11 Proceso de solubilización de una molécula (Florence & Attwood, 2015) .....	30
Figura 12 Estructura química de MoHCl, señalando los grupos que ocasionan su comportamiento anfotérico. ....	36
Figura 13 Los posibles isómeros de MoHCl. Modificado de (Cruz & Hall, 2005). .....	37
Figura 14 Difractograma obtenido de la forma anhidra y la forma hidratada de MoHCl. Modificado de (Grunenberg et al, 1998). .....	38
Figura 15 Modificación del aparato de Wood que fue utilizada en las pruebas de disolución intrínseca de MoHCl y las NFS. ....	49
Figura 16 Análisis de DRXP-T de MoHCl (a) y de las materias primas (b) antes y después del experimento de formación de pasta con MeOH (RxS). .....	53
Figura 17 Análisis térmico de las materias primas. TGA (a) y DSC (b) .....	54
Figura 18 Análisis de DRXP-I del cribado de nuevas fases del cocrystal MoHCl-DLMA con los disolventes MeOH (a), EtOH (b) y agua desionizada (c). Por último, se observa la comparación de los resultados de la RxS y la RxM para sintetizar el cocrystal en proporción 1:1(d). .....	57
Figura 19 Análisis de DRXP-I del cribado de nuevas fases del cocrystal MoHCl-24DBA con los disolventes MeOH (a), EtOH (b) y agua desionizada (c). En el (d) se observa la comparación de los resultados de la reacción de RxS y la RxM para sintetizar el cocrystal. ....	60
Figura 20 Análisis de DRXP-T del cribado de nuevas fases del cocrystal MoHCl-DTA con los disolventes MeOH (a), EtOH (b) y agua desionizada (c). .....	63
Figura 21 Caracterización física del cocrystal MoHCl-DLMA y las materias primas, análisis de TGA (a) y análisis de DSC (b). .....	65
Figura 22 Caracterización física del cocrystal MoHCl-DLMA y las materias primas por medio de Infrarrojo. ....	66
Figura 23 Caracterización física del cocrystal MoHCl-24DBA y las materias primas, análisis de TGA (a) y análisis de DSC (b). .....	67
Figura 24 Espectros de IR de MoHCl-24DBA y materias primas.....	68

Figura 25 a) Espectro de absorción UV-vis de MoHCl (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en presencia de DLMA (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y 24DBA (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el medio de disolución de solución de ácido HCl pH 1.2, b) Comparación del espectro de absorción de MoHCl (en los medios de disolución de solución de HCl pH 1.2, buffer de acetatos pH 4.5 y buffer de fosfatos pH 6.5). .....	69
Figura 26 Titulación sobre soluciones de MoHCl disuelto en solución pH 1.2. a) Titulaciones con 24DBA; b) titulaciones con DLMA. ....	71
Figura 27 Resultados de las pruebas de solubilidad realizadas en los 3 medios de disolución para MoHCl y los cocrystalos. Los valores mostrados corresponden a $t=1\text{h}$ de iniciado el experimento. 37 $^{\circ}\text{C}$ , $n=3$ , $\pm\text{DE}$ .....	74
Figura 28. Análisis de DRXP-I de las muestras obtenidas de las pruebas de disolución de MoHCl (a), MoHCl-DLMA (b), MoHCl-24DBA (c), realizadas en medio de disolución pH 1.2 a 37 $^{\circ}\text{C}$ . Todas las muestras fueron obtenidas a 1 hora de iniciado el experimento.....	76
Figura 29 a) Diagrama de especiación de MoHCl, utilizado para ilustrar como cambian las especies presentes en el medio de disolución conforme cambia el pH de este; b) Diagrama de solubilidad de las diferentes especies existentes en solución para ciprofloxacino -con un comportamiento semejante a MoHCl-, se observa como las formas ionizadas de la molécula presentan un mayor grado de solubilidad que la especie zwitterionica. (Modificado de Florence A. 2004); y c) Estudio realizado sobre el cambio en solubilidad del clorhidrato de papaverina en un rango de pH de 1 a 7, donde se observa la supersaturación cerca del $\text{pH}_{\text{max}}$ y el efecto del ion común en un pH bajo. La línea punteada muestra el perfil de solubilidad teórico que se determinó basándose en la solubilidad intrínseca del fármaco neutro y su $\text{pK}_a$ , la desviación positiva indica una agregación del sólido. (Modificado de Serajuddin A., 2007).....	79
Figura 30 (a) Comparación del perfil de disolución intrínseca de MoHCl y las NFS en medio de pH 1.2, (b) en solución amortiguadora de pH 4.5 y (c) en solución amortiguadora de pH 6.5 Media $\pm$ D.E. $n=3$ . T = 37 $^{\circ}\text{C}$ .....	81
Figura 31. Análisis de DRXP-I de las muestras obtenidas de las pruebas de disolución intrínseca de MoHCl (a), MoHCl-DLMA (b), MoHCl-24DBA (c), realizadas en medio de disolución pH 1.2 a 37 $^{\circ}\text{C}$ . Todas las muestras fueron obtenidas al término del experimento.....	82
Figura 32 Prueba de disolución de polvos de MoHCl y las NFS en medio ácido pH 1.2. .	84
Figura 33 Análisis de DRXP-I de las muestras obtenidas de las pruebas de disolución de polvos de MoHCl (a), MoHCl-DLMA (b), MoHCl-24DBA (c), realizadas en medio de disolución pH 1.2 a 37 $^{\circ}\text{C}$ . Todas las muestras fueron obtenidas al término del experimento.....	85
Figura 34 Cuantificación del coformador 24DBA en la prueba de disolución de polvos del cocrystal MoHCl-24DBA en medio de pH 1.2. $n=1$ . 37 $^{\circ}\text{C}$ . ....	87
Figura 35 Pruebas de estabilidad indicativa por DRXP-I de MoHCl (a), cocrystal MoHCl-DLMA (b) y cocrystal MoHCl-24DBA (c). ....	88
Figura 36 Pruebas complementarias de transformación de fase por DRXP-I de MoHCl (a), MoHCl:DLMA (b) y MoHCl:24DBA (c). Todas realizadas con MeOH, EtOH y H <sub>2</sub> O. Los sólidos fueron obtenidos después de 30 minutos de la RxS. ....	90
Figura 37 Sólido obtenido al final de la reacción cristalización de MoHCl-DTA. Se observó una consistencia parecida a un gel (derecha). Después de 24 horas el producto precipitó y se obtuvo un sobrenadante de coloración anaranjada (izquierda). ....	107
Figura 38 Comparación del análisis de DRXP de los sólidos obtenidos de la RxC y la RxS de MoHCl-DTA. ....	107

Figura 39 Comparación de los análisis de DRXP del sólido obtenido de la RxC de 1 mL, 2 mL y 2 mL con lavado de MeOH. .... 108

### III. Índice de tablas

Tabla 1	Reactivos y disolventes utilizados para la elaboración de este proyecto. ....	43
Tabla 2	Equipos utilizados para la realización de este proyecto .....	43
Tabla 3	Resumen de resultados de la síntesis de los cocrisales bajo las diferentes condiciones evaluadas .....	56
Tabla 4	Valores obtenidos de la validación de las curvas de cuantificación de MoHCl en los medios acuosos de pH 1.2, 4.5 y 6.5. ....	73
Tabla 5	Resumen de los resultados obtenidos de las pruebas biofarmacéuticas de MoHCl y las NFS en los diferentes medios empleados a 37°C. n=3, ±DE. ....	80
Tabla 6	Resumen de los resultados de estabilidad de fase de MoHCl y cocrisales bajo las condiciones evaluadas .....	92
Tabla 7	Polimorfos de MoHCl, su síntesis y las técnicas utilizadas para su caracterización. Modificada de (Al Omari, Jaafari, Al-Sou'od, & Badwan, 2014). ....	103

#### IV. ABREVIATURAS

24DBA	Ácido 2,4-dihidroxibenzoico
CV	Coefficiente de Variación
DTA	Ácido D-tartárico
EtOH	Etanol
DE	Desviación Estándar
DLMA	Ácido DL-málico
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
DRXP	Difracción de Rayos X de Polvos
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos
GRAS	Reconocido Generalmente como Seguro
IFA	Ingrediente Farmacéutico Activo
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
H <sub>2</sub> O	Agua
MeOH	Metanol
MoHCl	Clorhidrato de Moxifloxacino
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RxC	Reacción Cristalización
RxM	Reacción de Molienda Asistida por Disolvente
RxS	Reacción de Formación de Pasta
SCB	Sistema de Clasificación Biofarmacéutico
TGA	Análisis Termogravimétrico

## V. RESUMEN

El clorhidrato de moxifloxacino (MoHCl) es una fluoroquinolona de cuarta generación perteneciente al grupo I del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB). A pesar de que su solubilidad no limita su biodisponibilidad, MoHCl presenta una alta tendencia al polimorfismo con 22 fases reportadas (Al Omari, Jaafari, Al-Sou'od, & Badwan, 2014). Esto conlleva a que potenciales transformaciones de fase sólida puedan ocurrir durante el proceso de manufactura, almacenamiento y/o tras su administración, limitando así su seguridad y eficacia.

El presente proyecto se centra en reproducir cocrisales de MoHCl previamente sintetizados dentro del grupo de investigación, con la finalidad de concluir su caracterización mediante la evaluación de las propiedades físicas y biofarmacéuticas de estas Nuevas Fases Sólidas. Los cocrisales se sintetizaron utilizando al ácido DL-málico (DLMA) y al ácido 2,4-dihidroxibenzoico (24DBA) como agentes formadores de cocrystal. Se realizaron pruebas de cribado con 3 solventes: metanol, etanol y agua. El escalamiento de los cocrisales sintetizados se realizó mediante molienda mecanoquímica asistida con disolvente a 20 Hertz por 20 minutos.

Los difractogramas obtenidos por DRXP en las pruebas de cribado comprueban la formación de fases cristalinas con patrones de difracción distintos a las materias primas. Con ayuda de la investigación que precede a este estudio, se determinó que se sintetizaron los cocrisales de MoHCl reportados. El análisis entre DRXP, TGA/DSC e IR me permitió determinar que MoHCl-DLMA y MoHCl-24DBA poseen una estequiometría 1:1.

Las pruebas biofarmacéuticas realizadas en medios de disolución farmacopéicos pH 1.2, 4.5 y 6.5 demostraron que ambos cocrisales modifican el perfil biofarmacéutico de MoHCl. El cocrystal MoHCl-DLMA limita la solubilidad de MoHCl a un valor constante e independiente del pH, manteniendo la velocidad de disolución muy similar a la del fármaco. Mientras que el cocrystal MoHCl-24DBA disminuye considerablemente la solubilidad y velocidad de disolución de MoHCl, efecto que aumenta conforme el medio de disolución se acerca a la neutralidad. Ambos

resultados se atribuyen a las propiedades de las materias primas y el arreglo cristalino de los cocristales.

Ambos cocristales modifican las propiedades físicas de MoHCl y modifican su grado de polimorfismo de varias maneras. El cocrystal sintetizado con DLMA no presentó polimorfismo al contacto con los medios de disolución, a diferencia del fármaco. Sin embargo, este cocrystal es propenso a polimorfismo cuando se expone a temperaturas elevadas. El cocrystal MoHCl:24DBA sufre un cambio de fase al contacto con los medios de disolución de pH 4.5 y 6.5, de la misma forma que el fármaco. Sin embargo, se demostró que el cocrystal mantiene su fase sólida al exponerse a temperatura y humedad alta, a diferencia de MoHCl que sufre polimorfismo.



## 1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día la cocrystalización se reconoce como una opción para mejorar las propiedades físicas y biofarmacéuticas de los ingredientes farmacéuticos activos (IFA). Esto se considera importante debido al gran número de medicamentos que actualmente se producen en estado sólido, siendo las tabletas la forma farmacéutica más utilizada. Sin embargo, casi el 40% de las moléculas innovadoras que se descubren presentan insolubilidad (Sareen. S, *et. al*, 2012), complicando la administración de manera convencional. La aplicación de la cocrystalización se ha enfocado en tratar de solventar este problema. En la literatura se han reportado ampliamente algunos de los efectos que la cocrystalización tiene sobre las propiedades físicas y biofarmacéuticas de los sólidos. Entre estas se encuentra la posibilidad de modificar la solubilidad, la fluidez y la velocidad de disolución. Sin embargo, en ocasiones los IFA presentan otro tipo de problemas relacionados al estado sólido.

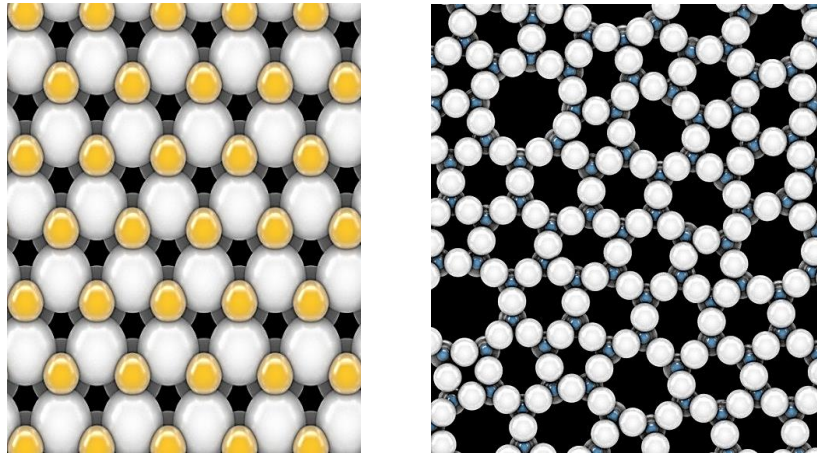
El Clorhidrato de Moxifloxacino (MoHCl) siendo un fármaco que se encuentra en el grupo I del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico, no requiere de la cocrystalización para la mejoría de su solubilidad. Sin embargo, tiene la característica de poseer alrededor de 22 fases polimórficas en estado sólido. Esta es una de las principales complicaciones cuando se manipula y acondiciona para la producción del medicamento en la industria. Para resolver esta problemática la búsqueda de Nuevas Fases Sólidas (NFS) cocrystalinas con MoHCl se ha llevado a cabo con anterioridad en nuestro grupo de investigación, reportando la generación de tres cocrystalales sintetizados con coformadores alifáticos e hidroxibenzoicos de carácter ácido. No obstante, se carece de estudios de escalamiento, estabilidad de fase y propiedades biofarmacéuticas de estas NFS, siendo imperativa la evaluación del impacto sobre las propiedades físicas y biofarmacéuticas de MoHCl.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 El estado sólido

Todos los cuerpos se componen de materia ordenada en átomos y moléculas que se organizan en uno de los tres estados físicos; sólido, líquido o gaseoso. El estado sólido es el más utilizado en la industria farmacéutica debido a que los principios activos se pueden estabilizar y formular de manera más sencilla en comparación con el estado líquido. Las moléculas pueden interaccionar por medio de varios tipos de enlaces, siendo el covalente uno de los más fuertes y los puentes de hidrógeno uno de los enlaces débiles más frecuentes (Cui, 2007). Estos últimos pueden ser modificados por la temperatura y la presión para conformarse en un determinado arreglo molecular. Se sabe que la modificación de dicha conformación forma nuevas fases con niveles de energía diferentes (Gupta, Askarkar, Joshi, & Padole, 2015).

Existen dos tipos de arreglos supramoleculares en los sólidos, los cristalinos y los amorfos (Figura 1). Los sólidos cristalinos están formados por una estructura definida y repetitiva denominada “celda unitaria”, la cual se considera como la unidad mínima que conforma un sólido cristalino, representando el arreglo intermolecular de la estructura. Esta celda se repite múltiples veces hasta formar cristales de mayor tamaño. En cambio, los amorfos se conforman de múltiples estructuras repetidas dentro de un mismo sólido, careciendo de una forma definida.



*Figura 1 Sólidos cristalinos (izquierda) y amorfos (derecha). (Lichtenstein, L., Heyde, M., & Freund, H. J. 2012)*

Dentro del grupo de los sólidos cristalinos podemos identificar a otro tipo de conformación molecular denominada polimorfo. Estos se definen como materiales que comparten la misma composición química pero difieren en su conformación molecular o estructura reticular (Rodríguez-Spong, Price, Jayasankar, Matzger, & Rodríguez-Hornedo, 2004). Asimismo, existen los pseudopolimorfos, estructuras que incluyen moléculas de solvente dentro de la conformación cristalina (Giron, Mutz, & Garnier, 2004). Debido a que los polimorfos difieren en sus interacciones débiles como fuerzas de Van der Waals o los puentes de hidrógeno, poseen niveles de energía diferentes modificando las propiedades físicas del material como la solubilidad, la estabilidad química, el punto de fusión, la densidad, etc. (Hilfiker, 2006).

Los materiales cristalinos que se conforman por varios componentes se clasifican como se observa en la Figura 2. Los solvatos, sales y cocristales se consideran cristales multicomponentes debido a que dentro de la red cristalina podemos encontrar átomos pertenecientes a varios compuestos diferentes.

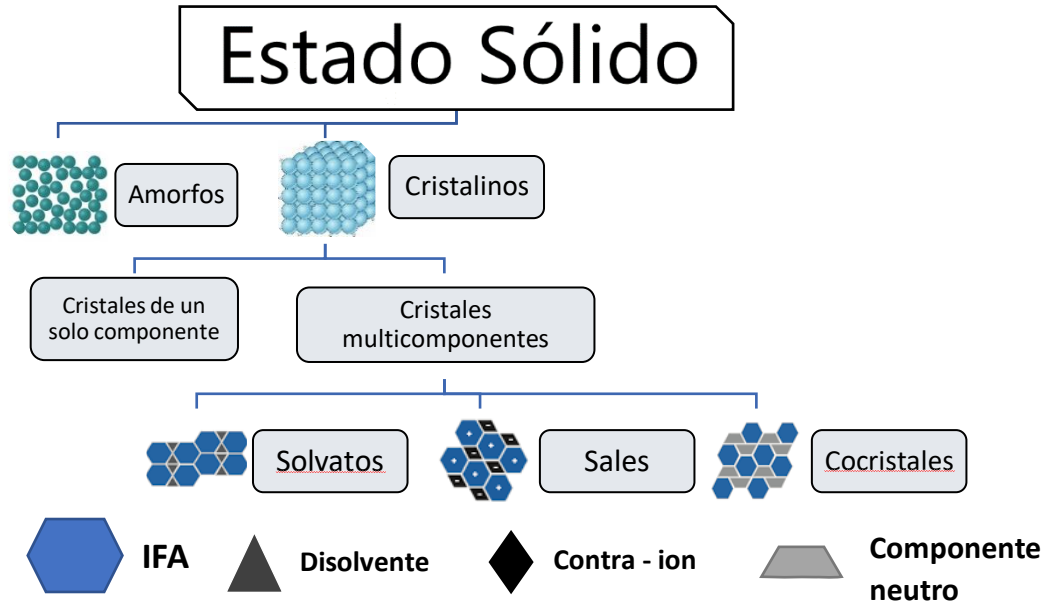


Figura 2 Clasificación de los tipos de fases que conforman el estado sólido de la materia. (Modificado de Newman, A., Wenslow, R. 2016).

### 2.1.1 Sales farmacéuticas

Una sal farmacéutica está formada por un IFA en su forma ionizada y un contraión molecular o atómico. Debido a esta característica, las sales siempre tienen una relación molar definida y previsible. Asimismo, una de las limitaciones que presentan por su naturaleza es el requerimiento de un fármaco ionizable. La selección del mejor contraión para un IFA se efectúa mediante pruebas de cribado con varios candidatos, siendo los más utilizadas el sodio ( $\text{Na}^+$ ) en el caso de los fármacos ácidos y el clorhidrato ( $\text{Cl}^-$ ) para los básicos o alcalinos (Vioglio, Chierotti, & Gobetto, 2017).

La formación de sales farmacéuticas es una herramienta muy común para la mejora de la solubilidad de un fármaco (Serajuddin A., 2007). Se ha reportado que la solubilidad de la sal del fármaco depende del producto de solubilidad del IFA y el contraión. Sin embargo, la mejora en la solubilidad se debe a la modificación en la

velocidad de disolución del fármaco debido a alteraciones del pH en el microambiente (Kawakami, 2012). Algunas ventajas que aporta la formación de sales incluyen la modificación de propiedades físicas como el flujo y el aumento en la pureza o estabilidad del fármaco. En cambio, una desventaja que presentan las sales es la modificación del pH del medio de disolución por la liberación de moléculas de contraión. Este efecto incluso puede disminuir considerablemente la solubilidad del fármaco, dependiendo de la naturaleza del medio en el cual se disuelve. Se ha reportado que las sales que utilizan al ion clorhidrato suelen presentar una ligera disminución de la velocidad de disolución en jugo gástrico debido al efecto del ión común (Kawakami, 2012).

#### 2.1.2 Polimorfismo

El polimorfismo ocurre en el estado sólido cuando una molécula presenta varios arreglos cristalinos sin modificar su naturaleza química. Este fenómeno tiene mucha relevancia en la industria farmacéutica ya que implica una posible modificación de las propiedades de un IFA. Para garantizar la calidad y el contenido de un medicamento, es importante identificar cualquier tipo de polimorfismo desde etapas tempranas del desarrollo farmacéutico, además de buscar un método robusto que evite la transformación de fase de la molécula (Horosanskaia, Seidel-Morgenstern, & Lorenz, 2014). Por lo tanto, desarrollar los métodos adecuados es un reto dentro de la industria.

Los dos tipos de polimorfismo más común son el conformacional y el de empaquetamiento (Sarma, Chen, Hsi, & Myerson, 2011). Cuando los cristales comparten la misma celda unitaria, pero difieren en la conformación de las moléculas presentes en la red cristalina se denominan polimorfos conformacionales. Mientras que en el polimorfismo de empaquetamiento ocurre un efecto de rigidez entre las moléculas, por lo que difieren en el tipo de celda unitaria que conforma al cristal; por ejemplo, monoclinica y tetragonal.

### 2.1.3 Ingeniería de cristales

El término ingeniería de cristales es conocido por ser el estudio de la formación de estructuras cristalinas en un arreglo determinado. Muchas veces el objetivo de la aplicación de esta disciplina es determinar la manera de producir un determinado cristal con una propiedad de interés en particular. En general, se utiliza en conjunto la química supramolecular, elucidando la manera en la que los enlaces débiles (puentes de hidrógeno, enlaces coordinados, fuerzas de Van der Waals, interacciones  $\pi-\pi$ ) van a interactuar para formar patrones subestructurales mejor conocidos como sintones (Desiraju, 2007). En general, los sintones supramoleculares pueden encontrarse en dos tipos de conformación (Figura 3), los homosintones cuando las interacciones son entre dos unidades estructurales iguales y los heterosintones cuando estas son diferentes.

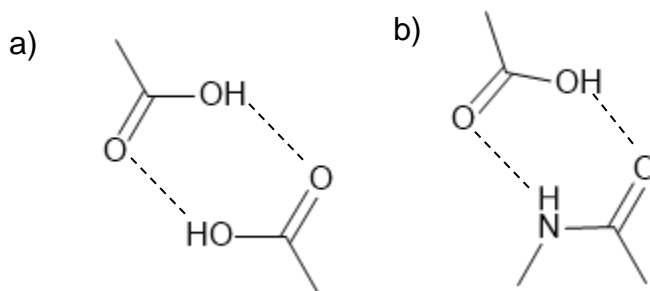


Figura 3 Sintones supramoleculares, a) homosinton y b) heterosinton (Duggirala, Perry, Almarsson, & Zaworotko, 2016).

Las moléculas por medio de la ingeniería de cristales se van a conformar de acuerdo a los sintones que se originen por medio de las interacciones débiles antes mencionadas. En la Figura 4 se observa un ejemplo de la aplicación de este principio, donde se ensambla una molécula por medio de la repetición de varios sintones. Una característica deseable de los sintones es su capacidad de formar varios tipos de estructuras cristalinas, denominándolos como robustos (Desiraju,

2003). Es importante identificar estos sintones ya que se generan en múltiples moléculas cristalinas y facilitan la elucidación de las propiedades de los productos.

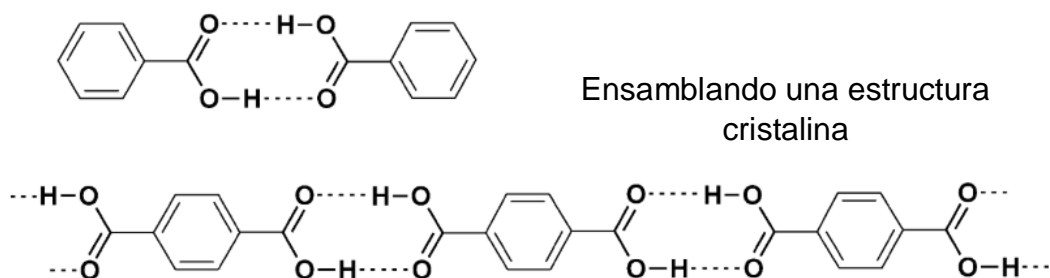


Figura 4 Ensamblaje de una molécula por medio de sintones. Modificado de (Desiraju, 2003).

#### 2.1.4 Cocristales farmacéuticos

Actualmente la definición de un cocrystal puede variar entre autores pero coincide en una característica fundamental, se entiende que son materiales cristalinos compuestos por al menos dos componentes en una estequiometría dada y que los materiales de partida son sólidos a temperatura ambiente (Schultheiss & Newman, 2009). Los cocristales farmacéuticos se sintetizan por interacciones entre un IFA y un compuesto cocrystalizante, denominado formador de cocrystal o agente coformador. Los formadores de cocrystal son moléculas de bajo peso molecular que poseen grupos funcionales capaces de compartir puentes de hidrógeno. Estos compuestos deben ser seleccionados a partir de la lista de la FDA - GRAS (Generally Recognized As Safe) y pasar por un proceso de selección para considerarlos adecuados.

Esta forma sólida es utilizada en la industria farmacéutica para modificar de manera favorable diversas propiedades de un fármaco; punto de fusión, solubilidad, disolución, estabilidad o hábito cristalino (Shan & Zaworotko, 2008). Se le considera como una herramienta útil que no modifica la identidad de un fármaco y conlleva la formación de enlaces débiles.

#### 2.1.4.1 Formadores de cocrystal

Uno de los pasos previos a la síntesis de un cocrystal consiste en seleccionar una molécula adecuada como formador. Las propiedades más relevantes para la selección de los formadores son: el reconocimiento de interacciones intermoleculares, el pKa de las moléculas, los grupos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno (Qiao, N. *et al.*, 2011). Asimismo, debemos de estudiar la estructura del fármaco y determinar cuáles son los grupos funcionales que pueden dar lugar a puentes de hidrógeno con un formador adecuado.

Como se mencionó con anterioridad, los formadores son seleccionados a partir de la lista GRAS. Estas moléculas son evaluadas posteriormente con herramientas como la Base de Datos Estructurales de Cambridge (CSD). Esta plataforma almacena los datos cristalográficos de muchos formadores y fármacos, siendo útil para la elucidación de interacciones intermoleculares estables (Orpen, 2002).

La selección previa de los formadores reduce el número de posibles moléculas en gran manera facilitando la realización de las pruebas de cribado de NFS. En éstas se define la capacidad de un par de moléculas de sintetizar el cocrystal deseado, además de evaluar el rendimiento al final de la reacción. Desde el descubrimiento de este tipo de formas sólidas se han utilizado diversos métodos de cribado como; la formación de pasta (RxS) y la molienda asistida por disolvente (RxM) (Douroumis, *et al.*, 2017).

#### 2.1.4.2 Síntesis de cocrystal

Las técnicas más utilizadas en la síntesis de cocrystal se basan en la aplicación de una energía mecánica, favoreciendo la interacción entre ambos fármaco y formador. Asimismo, otras técnicas consisten en disolver ambos compuestos en un sistema que favorezca la cristalización de una nueva fase sólida. Como se mencionó anteriormente, existen 3 técnicas que son utilizadas ampliamente: RxS, molienda



asistida por disolvente (RxM) y cristalización (RxC) (Shan & Zaworotko, 2008). Otro tipo de técnicas más avanzadas son: La extrusión por fusión (Hot melt extrusión), cocrystalización por antisolvente, granulación por alto corte (High shear) y cristalización con ultrasonido (Shan & Zaworotko, 2008).

La RxS consiste en la formación de una pasta, compuesta por el fármaco y el formador con una pequeña cantidad de disolvente. En general, es una técnica que no ocupa mucho tiempo o recursos. Un inconveniente de utilizar esta técnica es la escala a la cual se considera funcional, produciendo cantidades muy pequeñas del sólido de interés. Debido a esto, se requieren otras técnicas con mayor rendimiento como la molienda. A grandes rasgos la molienda funciona de la misma manera que una RxS, con un aumento en la cantidad de energía que se aplica al sistema. En este caso la cantidad de sólido cambia, siendo una de las opciones más utilizadas para la síntesis de cocrisales a gran escala. Dentro de la molienda podemos encontrar dos tipos: húmeda o seca (Douroumis, Ross, & Nokhodchi, 2017). La primera no utiliza disolvente durante el proceso de síntesis, favoreciendo la formación de fases sólidas con baja energía de activación. En cambio, al agregar disolvente al proceso aumentamos la interacción de ambos compuestos y facilitamos la nucleación de sintones con una mayor energía de activación (Douroumis *et al.*, 2017). En la industria farmacéutica ambas técnicas son aceptables, siendo el criterio de selección la capacidad de producir la fase sólida de interés.

#### 2.1.4.3 Ventajas de los cocrisales farmacéuticos

La cocrystalización como herramienta para mejorar las propiedades farmacéuticas de un IFA, posee varias ventajas en comparación con otras alternativas que actualmente son utilizadas. La facilidad de crear estas fases sólidas sin generar o romper enlaces covalentes en el estado sólido, permite la búsqueda de métodos más ecológicos para su síntesis. La generación de cocrisales permite la innovación de fármacos ya utilizados comúnmente dentro de la industria, mejorando su vida

media, posología, estabilidad o propiedades biofarmacéuticas (Schultheiss & Newman, 2009). También está investigando la posibilidad de diseñar NFS por medio y ajustar las propiedades del IFA a conveniencia de la industria o el paciente (Aakeröy, 2015).

En la literatura podemos encontrar ejemplos del uso de la cocrystalización para la resolución de características indeseables en fármacos de uso común. En el año 2009 Karki *et al.*, reportaron la modificación de las propiedades físicas del paracetamol, mejorando la capacidad del sólido para ser comprimido al formar cocrystalales con coformadores que facilitaran la formación de capas dentro del arreglo cristalino. De la misma forma, en el 2013 Aher *et al.*, observaron el mismo efecto a partir de la cocrystalización de la cafeína con ácido oxálico. La NFS sintetizada presentó mejores propiedades mecánicas que las materias primas de partida, además de disminuir el grado de higroscopicidad de la cafeína.

## 2.2 Caracterización física de sólidos

La caracterización de un fármaco en estado sólido es un proceso de suma importancia. En general, la caracterización física nos permite identificar las propiedades que un compuesto posee de manera intrínseca, siendo clave para la evaluación del grado de pureza de una molécula. Dentro de las técnicas utilizadas comúnmente podemos clasificarlas de la siguiente manera; espectroscópicas, microscopía y térmicas (L. Yu, Reutzel, & Stephenson, 1998). Las técnicas espectroscópicas más utilizadas son Infrarrojo (IR), difracción de rayos X de polvos (DRXP) y resonancia magnética nuclear (NMR).

Otra técnica muy utilizada es el Termogravimétrico, la cual se encuentra agrupada en la categoría de análisis térmicos.

### 2.2.1 Infrarrojo (IR)

La espectroscopía de infrarrojo nos permite observar las vibraciones de los grupos funcionales presentes en la estructura de una molécula, así como evaluar las interacciones intermoleculares de una sustancia, obteniendo un patrón o espectro específico para cada molécula en particular. Esta “huella” de cada molécula nos ayuda a elucidar cambios en los enlaces débiles por la interacción con otras sustancias o impurezas que se puedan encontrar, de manera que es una excelente herramienta para comprobar la identidad de una sustancia (Chapman, 1963). La aplicación de esta técnica en el área farmacéutica es muy versátil (Figura 5) debido a su bajo costo, corto tiempo de análisis y el hecho de que no se destruye la muestra post – análisis (Kalinkova, 1999).

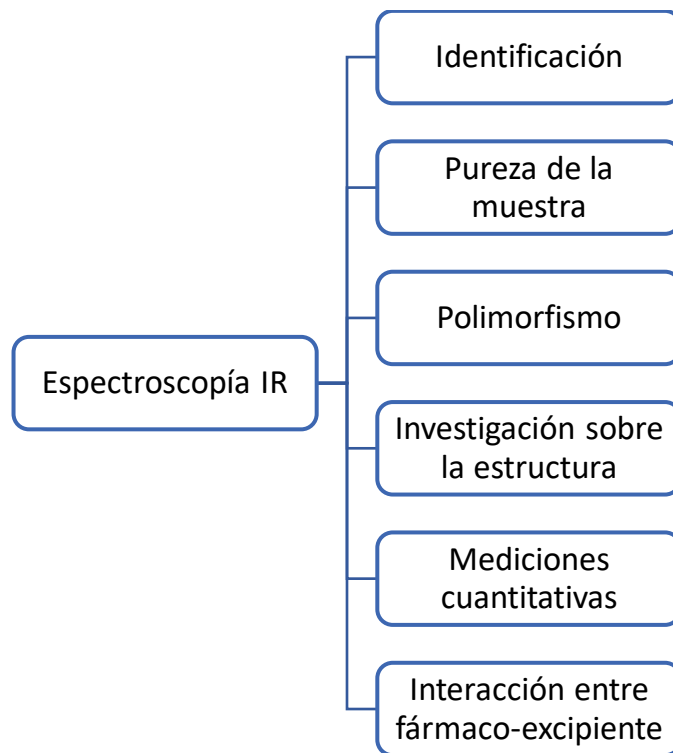


Figura 5 Aplicaciones de la espectroscopía de infrarrojo dentro del ámbito farmacéutico. Modificado de (Kalinkova, 1999).

Dentro del espectro electromagnético (Figura 6) el intervalo de análisis para infrarrojo va desde los 2500 a los 6897 nm de número de onda y se le conoce como infrarrojo medio. Cabe destacar que dentro de la región de infrarrojo se pueden identificar otras áreas de medición como el infrarrojo cercano o lejano. Sin embargo, para llevar a cabo el análisis se requieren de otros instrumentos especializados.

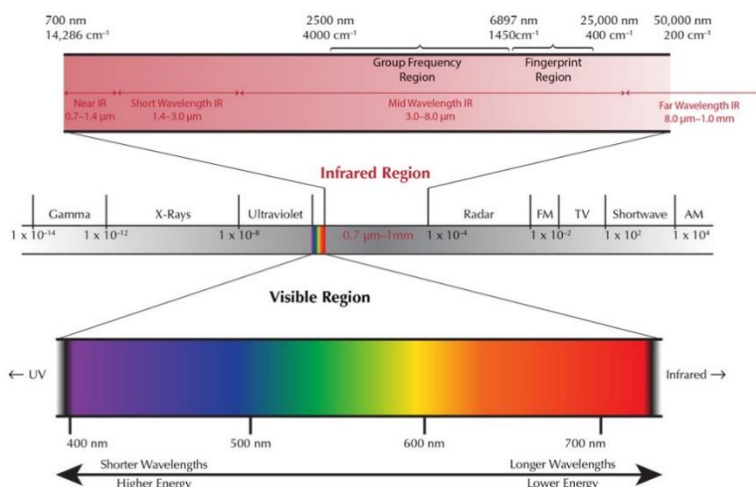


Figura 6 Espectro electromagnético de la región visible (abajo), espectro electromagnético de la región infrarrojo (arriba). Modificado de (Rodgers et al., 2008).

Las moléculas pueden ser analizadas por medio de esta técnica debido a que generan un movimiento vibracional que modifica el momento dipolar de los enlaces químicos. Los dipolos dentro de una molécula se originan cuando existen diferencias de cargas parciales entre los átomos que la conforman. En la Figura 7 se observa como el dipolo de una molécula compuesta por dos átomos diferentes va cambiando, estos movimientos son detectados dentro del espectro de IR y nos ayudan a determinar qué tipo de interacciones ocurren dentro de una molécula.

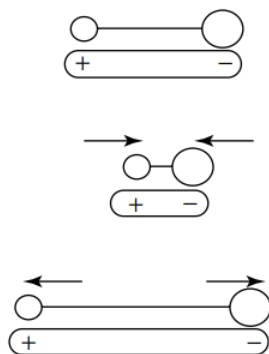


Figura 7 Cambio de un dipolo en una molécula diatómica heteronuclear. Modificado de (Stuart, 2004).

La radiación IR detecta dos tipos de movimientos de los enlaces químicos conocidos como tensión y flexión. La tensión se relaciona con el cambio en el espacio entre las moléculas, la flexión se refiere al cambio en los ángulos entre los enlaces de éstas. En la Figura 8 se ilustra la manera en que estos movimientos pueden ocurrir en una molécula como lo es el formaldehído (izquierda) o el agua (derecha).

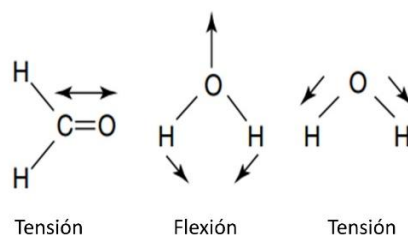
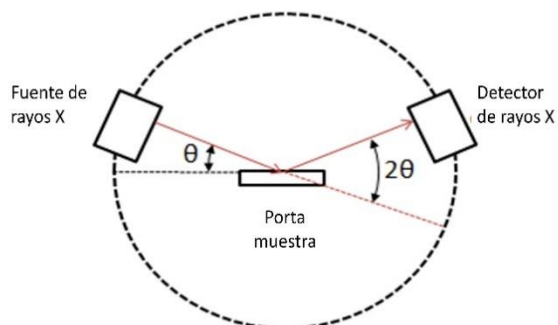


Figura 8 Tipos de vibraciones moleculares detectadas por el espectro IR. Modificado de (Stuart, 2004).

### 2.2.2 Difracción de Rayos X de Polvos (DRXP)

La Difracción de Rayos X de Polvos se utiliza para el análisis de muestras en estado sólido, determinando su identidad mediante la estimación de la fase sólida en la cual se encuentra. Estos análisis nos permiten obtener la fase cristalina de un compuesto. El equipo se encarga de medir el desplazamiento angular ( $2\theta$ ) de los rayos X que inciden sobre el polvo (Figura 9). Los compuestos cristalinos son una agrupación periódica ordenada de átomos. Por lo tanto, cuando un haz de radiación cuya longitud de onda es la misma que la distancia interatómica ocasiona la difusión de este. El detector de rayos X se encarga de registrar todas las interferencias que

se generan. La acumulación de estas produce un espectro de difracción que será único para cada compuesto. Cada estructura cristalina presenta un propio espectro de difracción, siendo una huella dactilar con la cual se le puede identificar. Esta técnica nos permite determinar la existencia de polimorfos, así como comprobar la síntesis de la fase sólida de interés de un compuesto determinado.



*Figura 9 Funcionamiento del equipo de Rayos X de Polvos, desplazamiento y detección de estos. Modificado de (Dann, 2000).*

Una de las ventajas de esta técnica es la rapidez del análisis, al no tener que darle un tratamiento previo a la muestra sólida y poder recuperarla posteriormente. Sin embargo, no se considera una técnica que pueda determinar la pureza de un compuesto ya que un contenido de impureza menor al 5% no es detectable (Dann, 2000). Asimismo, solo es posible comprobar una fase cristalina mediante la comparación del difractograma con una referencia, por lo cual se deben utilizar otras técnicas de caracterización para complementar los resultados.

### 2.2.3 Análisis termogravimétrico (TGA)

Dentro del análisis térmico utilizado para la caracterización física de fármacos en la industria, una de las técnicas más utilizadas es el análisis termogravimétrico (TGA). Un TGA se obtiene a partir de la medición del cambio en masa con respecto a la temperatura a la cual se expone un sólido. Este análisis nos permite obtener

información importante acerca de los enlaces intermoleculares del compuesto (Xu, Li, Whitely, & Pan, 2005). Asimismo, nos da una idea de la estabilidad y la pureza de este. Comúnmente el TGA se acopla a otro tipo de análisis como la calorimetría diferencial de barrido (DSC), analizando el cambio en el flujo del calor que está siendo aplicado al fármaco. El resultado del análisis se modifica para obtener los puntos de inflexión en el termograma. Esto se hace mediante la determinación de la primera derivada del cambio en la masa contra el cambio en la temperatura.

Una vez graficado el TGA se pueden determinar varios factores que ayudan a caracterizar un sólido. En primer lugar, la cantidad de humedad o agua contenida en su estructura es cuantificable. La temperatura a la cual se descompone un sólido es una característica intrínseca, siendo parte de las pruebas de identidad que se realizan a los fármacos (Xu et al., 2005). Cuando se obtiene un resultado acoplado con DSC se incluyen otras propiedades de interés como el punto de fusión, el punto de ebullición y el flujo de calor para todas las reacciones que ocurren durante el análisis. Como se mencionó anteriormente los enlaces intermoleculares se pueden determinar mediante esta técnica, debido a que se observa a qué temperatura se separan los diferentes componentes del sólido es posible relacionar la fuerza de los enlaces con la energía necesaria para romperlos.

Los efectos que la temperatura tiene sobre el fármaco pueden ser variados. Se dividen en dos categorías: efectos físicos y efectos químicos. Los efectos físicos están relacionados con los cambios de estado, siendo principalmente sublimaciones o vaporizaciones. En cambio, los efectos químicos conllevan la degradación total de la molécula o la descomposición parcial (Charlsey, 1992).

Existen aspectos importantes a considerar antes de hacer un TGA. Para evitar efectos sobre el flujo del calor se debe tener cuidado en el tamaño de la muestra a analizar y el gradiente de la temperatura. También, el tamaño de partícula, la aglomeración del sólido y el recipiente que contiene al mismo son factores que afectan los resultados obtenidos.

#### 2.2.4 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear es de suma importancia cuando se pretende caracterizar un sólido. En general, proporciona información sobre la composición atómica del fármaco, siendo de gran interés el análisis en los átomos de hidrógeno y carbono. La técnica consiste en identificar el ambiente químico electrónico que existe alrededor de cada uno de los átomos de la molécula. Las señales obtenidas se representan como desplazamiento químico y la intensidad de estas. Las diferentes fases cristalinas de un sólido pueden generar ambientes químicos únicos alrededor de los átomos de éste, obteniendo un espectro diferente para cada fase (Gupta et al., 2015). Por ello, se le considera una herramienta muy útil para la identificación de polimorfos en la industria farmacéutica.

### 2.3 Caracterización biofarmacéutica de sólidos

#### 2.3.1 Sistema de Clasificación Biofarmacéutico

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS por sus siglas en inglés) es marco de referencia científico utilizado para clasificar a los IFA de acuerdo con su solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal (Yu *et. al.*, 2002). Se compone por 4 grupos clasificados dentro de un gráfico, en el eje horizontal encontramos el volumen requerido para disolver la dosis más alta y en el eje vertical se encuentra la permeabilidad como se ilustra en la Figura 10. Los fármacos se dividen de la siguiente manera:

- Grupo I: moléculas con alta solubilidad y permeabilidad, con alta biodisponibilidad.
- Grupo II: moléculas con baja solubilidad y alta permeabilidad, tienen una absorción limitada por la velocidad de disolución.



- Grupo III: moléculas con alta solubilidad y baja permeabilidad, la absorción se ve limitada por la permeabilidad.
- Grupo IV: moléculas con baja solubilidad y permeabilidad, con muy baja biodisponibilidad.

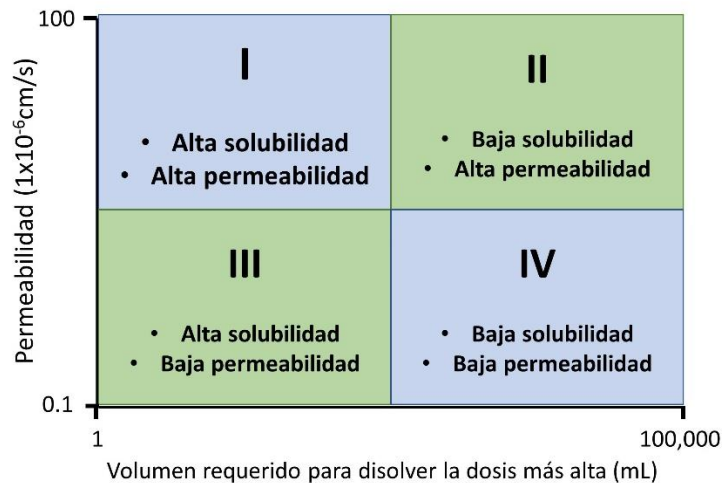


Figura 10 Sistema de clasificación Biofarmacéutico. Modificado de (Mehta et al., 2017).

Este sistema nos permite identificar varias características relevantes que podrían alterar la absorción oral como la posología y la frecuencia de administración. También, es una herramienta muy útil para identificar las modificaciones que se requieren para mejorar su biodisponibilidad. En general, las moléculas que se administran por vía oral tienen como prerequisite cumplir con una buena solubilidad para permitir la absorción (Amidon-Gordon et al., 1995). Sin embargo, cuando una molécula se encuentra clasificada dentro del grupo IV presenta un gran dilema para la industria farmacéutica.

También, el BCS toma en cuenta la velocidad de disolución de las moléculas al clasificarlas por el porcentaje disuelto en 30 minutos de prueba. Siendo relevante la clasificación bajo los 3 parámetros mencionados, con la finalidad de predecir el comportamiento *in vivo* del fármaco.

### 2.3.2 Solubilidad

Se define como la cantidad máxima de un compuesto que se puede disolver en un volumen de disolvente específico a una temperatura determinada (Lerner & Lerner, 2004). En fisicoquímica la solubilidad se define como la concentración en la cual una fase en solución se encuentra en equilibrio con su fase sólida, bajo temperatura y presión establecida (Babu & Nangia, 2011). La solubilidad aparente se define como aquella que se alcanza en un momento determinado donde aparentemente se llega al equilibrio o sobresaturación, siendo un fenómeno termodinámico.

De manera esquemática, este proceso ocurre a través de tres etapas (Figura 11): Inicia con el desprendimiento de una molécula del soluto, posteriormente el disolvente forma cavidades y finalmente la cavidad del disolvente engloba a la molécula del soluto. La solubilidad puede verse afectada por varios factores, físicos y químicos.

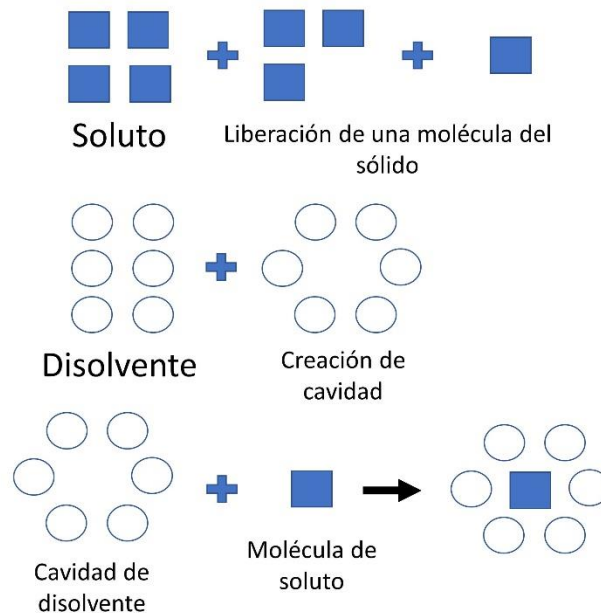


Figura 11 Proceso de solubilización de una molécula (Florence & Attwood, 2015)

En el BCS utiliza el valor de solubilidad de las moléculas para clasificarlas dentro de los grupos antes mencionados. Sin embargo, este valor es determinado bajo

condiciones específicas. En general siempre se utiliza el valor de solubilidad mínimo para la dosis máxima del fármaco, a 37°C en un medio de pH en el rango de 1 a 8 (Martinez, M. N., & Amidon, G. L., 2002). Los fármacos que se encuentran en el grupo I del BCS son aquellos que pueden disolver su dosis máxima en menos de 250 mL de medio acuoso.

### 2.3.3 Permeabilidad

Una molécula se considera permeable al tracto gastrointestinal de acuerdo con la facilidad con la que atraviesa este órgano. Los fármacos que se encuentran dentro del grupo I del BCS se absorben en más del 90% de la dosis administrada. En términos matemáticos la permeabilidad se determina al multiplicar el coeficiente de difusión en la membrana por el coeficiente de partición de la molécula, dividido por el grosor de la membrana (Gao, Yu, Dahan, & Miller, 2012). Sin embargo, actualmente no se comprenden completamente los mecanismos por los cuales se puede modificar la permeabilidad de un determinado fármaco. Asimismo, se desconocen los efectos que tienen sobre la permeabilidad los métodos para la mejora de la solubilidad que comúnmente se utilizan en la industria farmacéutica.

Debido a la complejidad de los métodos para determinar la permeabilidad, se han llegado a generar polémicas sobre la correcta clasificación de los fármacos en el BCS. En el 2014 Zur y colaboradores realizaron una evaluación del fármaco Codeína, el cual se comparó con metoprolol como una referencia para clasificarlo en el Grupo III por el valor de su coeficiente de partición. Sin embargo, al realizar otro tipo de pruebas de permeabilidad *in vitro* e *in vivo* se demostró que la Codeína era altamente permeable y debía de clasificarse dentro del Grupo I del BCS.

#### 2.3.4 Disolución

La disolución se define como un proceso cinético que determina el tiempo que tarda una molécula en cambiar de estado sólido a ser parte de una solución. Este proceso depende de la solubilidad de dicha molécula, siendo un factor importante que limita la biodisponibilidad de un fármaco que es administrado por medio de la vía oral (Qiao, Wang, Schlindwein, Davies, & Li, 2012).

Con la finalidad de evaluar el comportamiento *in-vivo* de los fármacos o medicamentos, se establecieron las pruebas de disolución. Estas también fueron diseñadas para el control de la calidad de los medicamentos (Dokoumetzidis & Macheras, 2006). Hoy en día se utilizan comúnmente dentro del departamento de Control de Calidad o Investigación y Desarrollo en la industria Farmacéutica. Dentro de la investigación se hace uso de este tipo de pruebas como indicadores sobre el comportamiento del fármaco en contacto con medios que simulan el ambiente del tracto gastrointestinal. También, las pruebas de disolución se realizan variando el pH del medio de disolución. Esto nos proporciona información sobre los efectos que ocurren en la molécula al modificar su grado de ionización.

Dentro de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) podemos consultar los parámetros a los cuales realizar las pruebas de disolución de un determinado fármaco. Asimismo, en otros países existen organismos que regulan y establecen dichos parámetros como la FDA en Estados Unidos.

Una de las pruebas de disolución para la evaluación de fármacos es la determinación de la velocidad de disolución intrínseca. Esta prueba tiene varias aplicaciones como el estudio del efecto del pH o surfactantes sobre el perfil de disolución de un fármaco o la evaluación de la relación entre la forma cristalina y la velocidad de disolución (L. X. Yu, Carlin, Amidon, & Hussain, 2004). La prueba se realiza utilizando un disco denominado aparato de Wood. En este, se comprime el fármaco de manera que solo una cara del comprimido tiene contacto con el medio de disolución. Esto nos permite observar un fenómeno relacionado con la velocidad de disolución de una molécula sin llegar al punto de saturación. Esta condición es

denominada como “*sink*” donde la cantidad de medio es 10 veces mayor a la necesaria para la saturación (Mehta et al., 2017). Esta condición nos permite descartar la concentración de fármaco presente en el medio.

En este proyecto el uso del aparato de Wood se modificó para ser utilizado de manera invertida en conjunto con el aparato 2 de la USP (paletas). Esto es denominado como método de disco fijo (Issa & Ferraz, 2011) y fue necesario debido a la rápida disolución del comprimido de MoHCl, la cual provoca desprendimiento y rotura de este en el aparato de Wood convencional.

Otra prueba importante es la disolución de polvos, la cual se realiza para la determinación de la solubilidad de un fármaco. Asimismo, se utiliza cuando una NFS presenta un cambio de fase durante la evaluación de sus propiedades biofarmacéuticas. Esta prueba es sometida bajo condiciones no “*sink*”, lo que permite observar el momento en el cual el cambio de fase ocurre. El método convencional para determinar la estabilidad de fase es a través del análisis por DRXP de las muestras de sólido obtenidas al final del experimento. Principalmente, la prueba provee información importante sobre el comportamiento de la NFS a un determinado pH bajo condiciones de saturación. Este tipo de disolución se ve afectada por varios factores como el tamaño de partícula, la temperatura y el pH (Sugano et al., 2007).

Un fármaco administrado en una forma de liberación inmediata se clasifica como de rápida disolución en el BCS cuando más del 85% de la dosis se disuelve en 30 minutos. Las pruebas se llevan a cabo con el Aparato I de la USP con 100 revoluciones por minuto (rpm) o con el Aparato II a 50 rpm, en un volumen de 900 mL o menos con los siguientes medios de disolución: 1) medio ácido en una concentración 0.1 N HCl; 2) Buffer de pH 4.5; 3) Buffer de pH 6.8. De otra forma el fármaco se considera de disolución lenta (Yu et al., 2002).

## 2.4 Clorhidrato de Moxifloxacino

El clorhidrato de Moxifloxacino (MoHCl) es un antibiótico de amplio espectro que se encuentra dentro del grupo de las fluoroquinolonas, siendo parte de la cuarta generación. Es comercializado bajo el nombre de Avelox® por la compañía Bayer. Originalmente, fue aprobado por la FDA en 1999 como un agente antimicrobiano para el tratamiento de la sinusitis aguda bacteriana (Miller, 2008). Posteriormente, se reconoció su efectividad para padecimientos del tracto respiratorio como la neumonía adquirida en la comunidad (NAC), exacerbaciones agudas de bronquitis crónica (EABC) y sinusitis aguda (SA). El tratamiento con Moxifloxacino tiene una duración de 5 a 10 días con una administración de 400 mg cada 24 horas (Caballero, Cardenas, Gurucharri, Rodrigo, & Honorato, 2000). En México se comercializa en varias formas farmacéuticas, siendo administrado principalmente por la vía oral en forma de tabletas de liberación inmediata. Desde el año de 2014 se comercializó una nueva presentación de MoHCl en forma de tabletas con recubrimiento entérico por la compañía TEVA®, donde reportan aplicaciones para varios padecimientos del tracto respiratorio y el tracto genital superior femenino (Jernberg, E., 2008).

Las marcas que se utilizan comúnmente en territorio nacional incluyen a medicamentos de patente como Avelox® y medicamentos genéricos de varios laboratorios como Pisa®, Aurax® o Merck®. El tratamiento utilizado tiene un costo aproximado de 1,600 pesos si se adquiere de patente y de 600 pesos si se adquiere un genérico. También, la aplicación de MoHCl se ha extendido a la aplicación de una solución oftálmica para el tratamiento preventivo postcirugía debido a su excelente actividad contra bacterias gram positivas y gram negativas de importancia en infecciones oculares (Stroman, D., 2015).

#### 2.4.1 Farmacocinética

La absorción de MoHCl después de ser administrado de forma oral es casi completa en el tracto gastrointestinal. El fármaco no se ve afectado por el metabolismo de primer paso, ocasionando que la biodisponibilidad sea del 90% o más (Al Omari, Jaafari, Al-Sou'od, & Badwan, 2014). La concentración máxima ( $C_{max}$ ) en plasma posterior a una dosis de 400 mg se alcanza en 1.5 horas, con una media de 2.5 mg/mL (Stass, Dalhoff, Kubitz & Schühly, 1998). Se ha confirmado que la  $C_{max}$  es independiente de la dosis (Sullivan et al., 1999). Una vez absorbido se une a las proteínas plasmáticas en un 30 a 50%, siendo acumulado en saliva, capilares, mucosa del seno maxilar y tejido bronquial en concentraciones incluso mayores que la plasmática.

El metabolismo de MoHCl ocurre principalmente por medio de la conjugación, donde se obtienen dos metabolitos inactivos denominados M1 y M2. El primero es producto de la sulfonación del fármaco, esta reacción es mediada en el cuerpo por una familia de enzimas denominadas sulfotransferasas. Estas enzimas se encargan de sustituir un grupo sulfo en la amina secundaria de la estructura de MoHCl, facilitando la eliminación de este por las heces. En cambio, M2 es producto de la glucoronidación del fármaco, reacción mediada por las glucoronosiltransferasas. En general, las enzimas se encargan de añadir a la molécula un grupo

El compuesto sin modificar y los metabolitos son eliminados por heces y orina de manera completa, sin una acumulación importante en el cuerpo (Al Omari et al., 2014). La vida media de eliminación se ha estimado que se encuentra entre 8 a 16 horas posteriores a la administración.

#### 2.4.2 Farmacodinamia

El Clorhidrato de Moxifloxacino posee un efecto bactericida, se sabe que tiene mayor actividad contra bacterias grampositivas del tracto respiratorio. La molécula

se une con la DNA girasa y las topoisomerasas bacterianas II y IV. Tiene un efecto directo sobre la replicación, traducción, reparación y por consiguiente la muerte bacteriana (Saravolatz & Leggett, 2003). Esta acción sobre ambas proteínas provee a MoHCl una mayor actividad bactericida, evitando a su vez la resistencia bacteriana de mejor manera que otras fluoroquinolonas.

Hoy en día el uso de MoHCl ha sido más común para el tratamiento de neumonía adquirida en la comunidad (Forsingdal Hardlei et al., 2015). Los microorganismos que se relacionan con esta enfermedad incluyen bacterias Gram negativas, Gram positivas e incluso cepas de *S. pneumoniae* multirresistentes. Debido a esto, el empleo de MoHCl se ha considerado empírico y debe ser cauteloso para evitar la generación de resistencia bacteriana (Saravolatz & Leggett, 2003).

#### 2.4.3 Propiedades físicas

El Clorhidrato de Moxifloxacino, también llamado ácido 7-[(4aS,7aS)-1,2,3,4,4a,5,7,7a-octahidropirrolo[3,4-b]piridin-6-il]-1-ciclopropil-6-fluoro-8-metoxi-4-oxoquinolin-3-carboxílico por la IUPAC, es un compuesto anfótero que posee una amina secundaria, y un grupo ácido carboxílico en su estructura (Figura 12). A su vez, estos grupos ocasionan que el MoHCl posea 2 pKa's con valores de 6.4 (ácido carboxílico) y 9.5 (amina). (Al Omari, et al., 2014).

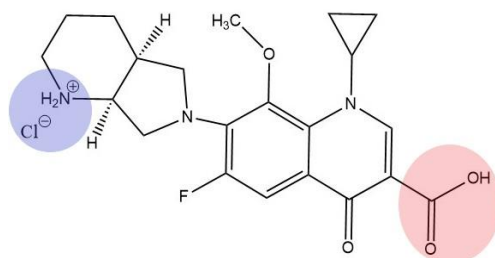


Figura 12 Estructura química de MoHCl, señalando los grupos que ocasionan su comportamiento anfotérico.

Se considera un compuesto que pertenece al grupo I de la BCS, debido a su alta solubilidad en agua (1.3 mg/mL) permitiendo disolver la dosis necesaria para el



tratamiento, en 250 mL de agua. Sin embargo, este comportamiento es de esperarse cambie en proporción dependiendo del pH de 1.2 a 6.8 (Al Omari et al., 2014). También, se ha calculado el coeficiente de partición del compuesto con un valor de 0.832 y una absorción en el tracto gastrointestinal del 90%, confirmando su alta permeabilidad (Al Omari et al., 2014).

Debido a los diversos grupos funcionales que posee en su estructura, MoHCl tiene la posibilidad de presentar 4 isómeros estructurales (Figura 13)(Cruz & Hall, 2005). El compuesto aprobado desde 1999 ha sido el isómero S,S - MoHCl, considerando a los otros como impurezas.

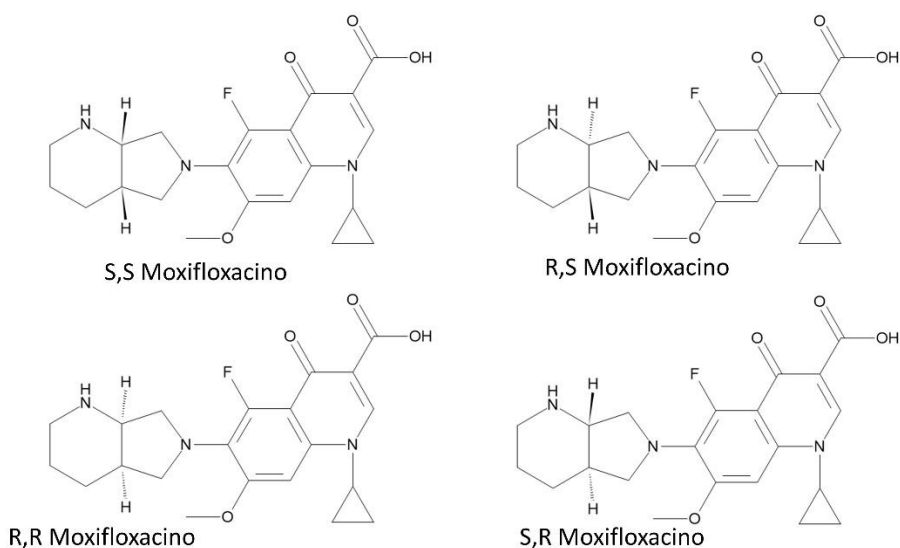


Figura 13 Los posibles isómeros de MoHCl. Modificado de (Cruz & Hall, 2005).

MoHCl posee alrededor de 22 polimorfos (Anexo 1. Polimorfos de MoHCl) en estado sólido (Al Omari, Jaafari, Al-Sou'od, & Badwan, 2014), complicando la manipulación del compuesto. Dentro de las modificaciones en el arreglo molecular cristalino de MoHCl, la más común es la solvatación del sólido. En la Figura 14 se observa el difractograma de ambas formas de MoHCl. En la parte superior, la forma anhidra

presenta picos de mayor intensidad entre  $5^\circ$  y  $15^\circ$   $2\theta$ . En cambio, en la forma hidratada (parte inferior) del fármaco ocurre un cambio en la intensidad de los picos, aumentando en la zona de  $25^\circ$  a  $30^\circ$   $2\theta$ . El análisis por Difracción de Rayos X de Polvos ayuda a discernir entre los polimorfos de MoHCl. Sin embargo, debido a la falta de reportes de difractogramas en la literatura, es difícil determinar los cambios que ocurren con los otros polimorfos de MoHCl.

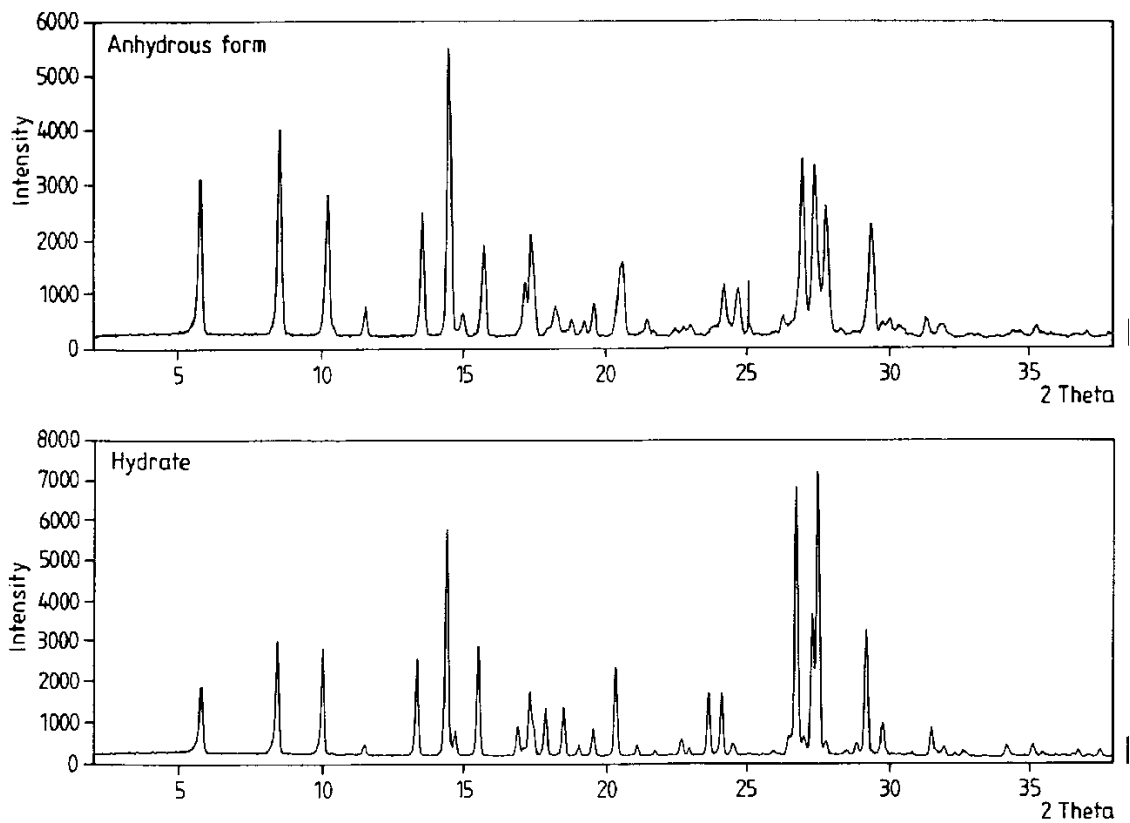


Figura 14 Difractograma obtenido de la forma anhidra y la forma hidratada de MoHCl. Modificado de (Grunenberg et al, 1998).

#### 2.4.4 Reto farmacéutico

Como se mencionó en el subcapítulo anterior, MoHCl posee un gran número de polimorfos. Esta propiedad es un factor importante al momento de formular un

medicamento, ya que conlleva una menor tolerancia de la fase sólida a la manipulación durante el desarrollo farmacéutico. Las principales razones por las cuales MoHCl cambia de fase sólida son la humedad relativa y la temperatura (Júlio et al., 2015).

Se han investigado diversos métodos de fabricación que pudiesen mantener la estabilidad de fase de MoHCl, sin embargo, se han reportado bajos rendimientos y aumento en el costo de manufactura. Así mismo, la producción de MoHCl industrial conlleva a la formación de isómeros que son difíciles de separar (Biswas, Bose, & Kumar, 2006), siendo la purificación un proceso necesario que provoca la reducción del rendimiento de la reacción.

En la literatura se pueden encontrar otros métodos que evitan la formación directa de los isómeros, al agregar la sal de HCl como paso final de síntesis. Sin embargo, esto también provoca un aumento en el costo y tiempo de producción.

## 2.5 Nuevas formas sólidas de Clorhidrato de Moxifloxacino

Estudios previos dentro del grupo de investigación demostraron la posibilidad de generar NFS de MoHCl mediante la reacción de cristalización (RxC) con varios coformadores, dentro de los cuales se encuentran los propuestos en este proyecto; ácido DL-málico, ácido D-tartárico y ácido 2,4-dihidroxibenzoico (MX2011004759A).

Las NFS fueron caracterizadas físicamente mediante técnicas como DRXP, Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y TGA. Con estas técnicas se determinó la relación estequiométrica entre los materiales de partida, además de establecer el disolvente con el cual es posible sintetizarlas. Sin embargo, la RxC hace uso de grandes cantidades de disolvente para la síntesis de cocristales. Por lo tanto, se consideró la búsqueda de métodos más amigables con el medio ambiente para la generación de estas NFS, como la formación de pasta (RxS) y la molienda

mecanoquímica. También, se consideró la modificación del disolvente utilizado en la síntesis de estos cocristales, por lo que se realizará un cribado con etanol y agua desionizada.

Se determinó que la estequiometría de los cocristales sintetizados era de 1:1 MoHCl:coformador. Los estudios concluyeron con este resultado, por lo que es relevante evaluar la modificación de las propiedades físicas y biofarmacéuticas de MoHCl. Por lo cual, además de reproducir y caracterizar las fases previamente reportadas, se planteó realizar una caracterización biofarmacéutica. Esto con la finalidad de evaluar el impacto de la cocrystalización sobre el perfil biofarmacéutico de MoHCl.

Adicionalmente, se considera relevante la evaluación de la estabilidad de fase de cada una de las NFS en comparación con MoHCl. Procurando la detección de cualquier transformación de fase que presenten los sólidos que se utilizan en este proyecto.

### 3 JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de NFS que permitan mantener estable la fase sólida de MoHCl durante un proceso de manufactura económico y rentable, es primordial para la reducción del costo de producción. Así mismo, la mejora de sus propiedades biofarmacéuticas reduciría la posología que actualmente se utiliza para los tratamientos vigentes.

El reto farmacéutico que presenta MoHCl ha sido abordado por el grupo de investigación, identificándose la formación de cocrystalos con diversos agentes formadores de cocrystal, tales como ácidos hidroxibenzoicos y ácidos de cadena alifática. Sin embargo, los estudios previos concluyeron en una etapa temprana de la investigación, por lo que es necesario realizar una caracterización profunda que busque reproducir las nuevas fases sólidas, determinar su composición, realizar una caracterización del sólido y por último evaluar el desempeño biofarmacéutico que la cocrystalización genera sobre MoHCl. Cabe señalar que el número de estudios encaminados al desarrollo y caracterización de cocrystalos a partir de sales farmacéuticas son contados en la literatura científica.

En el presente proyecto se aborda el estudio de sales cocrystalinas a partir del clorhidrato de moxifloxacino con tres moléculas formadores de cocrystal (ácido DL-Málico, ácido D-tartárico y ácido 2,4-dihidroxibenzoico).

#### **4 OBJETIVO GENERAL**

- Sintetizar y caracterizar física y biofarmacéuticamente cocristales de MoHCl utilizando al ácido DL-málico (DLMA), ácido D-tartárico (DTA) y al ácido 2,4-dihidroxibenzoico (24DBA) como agentes formadores de cocrystal.

#### **5 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Realizar la síntesis de las fases sólidas previamente reportadas (2.5), utilizando las técnicas de RxS y RxM.
- Determinar la relación estequiométrica de las fases sólidas correspondientes.
- Caracterizar las fases obtenidas mediante difracción de rayos X de polvos (DXRP), infrarrojo (IR) y análisis termogravimétrico (TGA).
- Evaluar las propiedades biofarmacéuticas mediante pruebas de solubilidad, disolución de polvos y disolución intrínseca.
- Evaluar la estabilidad indicativa y de fase, de cada uno de los sólidos obtenidos.
- Evaluar si las NFS sufren una transformación de fase ocasionada por las condiciones de experimentación, temperatura o disolventes utilizados.

#### **6 HIPÓTESIS**

El uso de ácido málico, ácido tartárico y ácido 2,4-dihidroxibenzoico como coformadores permitirá la formación de Nuevas Fases Sólidas con propiedades físicas y biofarmacéuticas modificadas con respecto a MoHCl.

## 7 MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos y disolventes utilizados para la realización de este proyecto se presentan en la siguiente tabla:

*Tabla 1 Reactivos y disolventes utilizados para la elaboración de este proyecto.*

Compuesto	Compañía	Lote	#CAS
Ácido DL-Málico	Aldrich®	MKBG0103V	6915-15-7
Ácido D-Tartárico	Aldrich®	10804DD	147-71-7
Ácido 2,4-Dihidroxibenzoico	Aldrich®	30398PJ	89-86-1
Alcohol estearílico	IND	IND	IND
Clorhidrato de Moxifloxacino**	Senosiain®	IND	IND
Etanol	JT.Baker®	V82C23	64-17-5
Fosfato monobásico de sodio	Aldrich®	SLBM6715V	7558-70-8
Fosfato dibásico de sodio	Aldrich®	SLBM8152V	7558-79-4
Hidróxido de sodio	Sigma Aldrich®	MKBQ8944V	
Metanol	JT.Baker®	T07C18	67-56-1
Sol. de Ácido clorhídrico 0.1 N	IND	IND	IND

\* IND: Información no disponible

\*\* Fármaco donado por la empresa Senosiain®

La Tabla 2 resume los equipos utilizados para los análisis y estudios realizados en el proyecto:

*Tabla 2 Equipos utilizados para la realización de este proyecto*

Equipo	Marca	Modelo	No. De serie
Balanza analítica	Ohaus®	Adventurer TM	1084 1225060407
Bomba de vacío	Vacuubrand®	IND	26860115
Destilador de agua	Elga Purelab®	Option-R7BP	OR07D227538BP
Difractómetro de rayos X	Bruker®	D2 Phaser 2 <sup>nd</sup> gen.	IND
Disolutor VARIAN	Varian®	VK 7010	1-6996-0404
Espectrofotómetro UV-visible	Varian®	Cary 50	EL0404350
Equipo Personal Reaction Station	J-KEM® Scientific	IND	IND
FTIR	Thermo Fisher Scientific®	IND	IND
Molino mezclador	Retsch®	MM 400	128210105
Parrilla térmica de agitación magnética	Thermolyne Cimarec®	SP46925	1069020320744
TGA-DSC	TA SDT®	Q600	IND

## 7.1 Cribado de las NFS por RxS

Se colocó la cantidad de cada materia prima dependiendo de la estequiometría determinada para cada cocrystal con un total de 50 mg en un vial de 3 mL. Se agregaron 50 µL de disolvente a la mezcla y se mantuvo una agitación continua por 45 minutos. Los polvos resultantes se analizaron por DRXP como cribado de nuevas fases para determinar la identidad de la fase sólida.

### 7.1.1 Cribado de la NFS MoHCl-DTA por RxS

Se utilizó la reacción de cristalización para el cribado de la NFS de MoHCl-DTA. Se agregaron 1 y 2 ml de MeOH en un vial de 10 ml. Se saturó el medio con aproximadamente 2 g de DTA. Se mantuvo el medio bajo agitación constante por 10 minutos. Se fue agregando MoHCl (240 mg) poco a poco a la solución, hasta ver la formación de un precipitado. Al cabo de 10 minutos se formó un gel, el cual se filtró y lavó con MeOH. Finalmente, el sólido se secó a 37°C por 12 horas y se analizó por DRXP.

### 7.1.2 Determinación de la estequiometría en los cocrystal

Basados en el reporte presentado anteriormente dentro del grupo de investigación, se demostró que la estequiometría más común para la síntesis de cocrystal con MoHCl es 1:1 fármaco coformador. Por lo tanto, se utilizó esta proporción como la inicial para todos los cocrystal. En algunos casos cuando se le consideró necesario, también se evaluaron proporciones con exceso de materia prima 2:1 y 1:2.

## 7.2 Molienda asistida por disolvente

Se utilizó un molino Retsch® para la síntesis de las NFS por medio de molienda. Se utilizaron contenedores y postas de acero inoxidable. Se agregó la cantidad determinada de acuerdo con la estequiometría molar de los componentes, añadiendo 50 µL de disolvente a la mezcla. La síntesis se realizó a 20Hz por 30 minutos. Los polvos obtenidos se analizaron por DRXP, TGA e IR.



### 7.2.1 Escalamiento

Para el escalamiento de las NFS se utilizaron contenedores de acero inoxidable de 1000 mg cada uno. Bajo condiciones de 20 Hz por 30 minutos de reacción, agregando 200  $\mu\text{L}$  de disolvente en el caso de la fase MoHCl – DLMA y 250  $\mu\text{L}$  en el caso de la fase MoHCl – 24DHB. Los polvos obtenidos se analizaron por DRXP, TGA e IR.

## 7.3 Caracterización física

Se realizaron pruebas de caracterización física para las materias primas y las NFS, por medio de las técnicas de DRXP, TGA, IR.

### 7.3.1 Difracción de Rayos X de Polvos (DRXP)

La Difracción de rayos X de polvos se realizó en dos equipos distintos, obteniendo dos tipos de difractogramas que se identifican de la siguiente manera: Difractograma de Polvos por Incidencia (DRXP-I) y Difractograma de Polvos por Transferencia (DRXP-T). Ambos equipos miden el desplazamiento del ángulo  $2\theta$  en un rango de 2 a  $40^\circ$ . Los experimentos se efectuaron a temperatura ambiente y el tiempo de obtención varía dependiendo de la calidad del difractograma obtenido en cada caso en particular.

### 7.3.2 Análisis termogravimétrico (TGA) acoplado a Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Se colocaron aproximadamente 2 mg de muestra en charolas abiertas de aluminio. Ambos termogramas (DSC y TGA) se adquirieron simultáneamente utilizando una rampa de temperatura de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , en el rango de 25 –  $400^\circ\text{C}$  y con un flujo de nitrógeno de 100 mL/min.

### 7.3.4 Infrarrojo

Las muestras se analizaron con un espectrofotómetro Nicolet 6700 de la marca Thermo Fisher Scientific® en un rango de 4000 a  $1000\text{ cm}^{-1}$ .

## 7.4 Preparación de soluciones buffer

Todas las soluciones buffer fueron preparadas con agua destilada y desionizada. Asimismo, al término de la preparación se desgasificaron todas las soluciones y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Se prepararon las cantidades necesarias de buffer para las pruebas y siempre se procuró no utilizar medios de disolución con una antigüedad mayor a 1 mes.

### 7.4.1 Solución de HCl 0.1 N

Para la elaboración de esta solución se utilizaron aproximadamente 4 mL de HCl concentrado para un volumen de agua destilada de 500 mL. Es importante mencionar que primero se agrega el agua desionizada al vaso de precipitados donde se prepara la solución y posteriormente se va agregando gota a gota la solución concentrada de ácido. Finalmente se afora la solución a 500 mL.

### 7.4.2 Solución de NaOH 0.1 M

Se disolvieron 4 g de hidróxido de sodio en 500 mL de agua desionizada, manteniendo la solución bajo agitación por 20 minutos. Posteriormente, se aforó la solución a 1 L y se almacenó en un frasco Pyrex® de 1 L.

### 7.4.3 Buffer de pH 1.2

Se utilizó un litro de agua desionizada, a la cual se le agregaron 1.9 mL de ácido clorhídrico concentrado. Se ajustó el pH a 1.2 con la solución de hidróxido de sodio. La solución fue degasificada por 20 minutos. Posteriormente se almacenó en un frasco Pyrex® de 1 L.

### 7.4.4 Buffer de acetatos pH 4.5

La solución fue preparada a una concentración 0.3 M. Se agregaron 8.82 g de acetato de sodio a 600 mL de agua desionizada, manteniendo bajo agitación por 15 minutos. Posteriormente, se agregaron 10.9 mL de ácido acético en una campana de flujo laminar y se aforó la solución a 1 L. Se degasificó y almacenó la solución en un frasco Pyrex® de 1 L.

#### 7.4.5 Buffer de fosfatos pH 6.5

La solución se preparó agregando 28.71 g de fosfato sodio dibásico heptahidratado a 500 mL de agua desionizada, manteniendo bajo agitación por 20 minutos. Posteriormente, se agregaron 26.58 g de fosfato de sodio monobásico hidratado a la solución, manteniendo la agitación por otros 20 minutos. Se agregaron 400 mL de agua desionizada, se ajustó el pH a 6.5 y la solución se aforó a 1 L. Se almacenó en un frasco Pyrex® de 1 L.

#### 7.5 Método de cuantificación

Para los estudios biofarmacéuticos se seleccionaron 3 medios acuosos, de pH 1.2, 4.5 y 6.5. El método de cuantificación consiste en la elaboración de curvas de calibración en el medio correspondiente, utilizando un espectrofotómetro UV-Carry® con un rango de medición entre 200 a 500 nm de longitud de onda.

Se realizó un barrido para cada medio con la finalidad de evaluar la longitud de onda óptima para realizar la cuantificación de MoHCl. Posteriormente, se preparó una solución stock de 200 µg/mL de MoHCl en medio de pH 1.2 y se prepararon curvas de 5 puntos con las concentraciones; 4.75 µg/mL, 9.50 µg/mL, 19.0 µg/mL, 28.5 µg/mL y 47.5 µg/mL. Las curvas se elaboraron en días distintos, se evaluó la linealidad para cada una y el error relativo entre 3 curvas seleccionadas. El coeficiente de variación (CV) se calculó de acuerdo con la NOM – 177-SSA1-2013, obteniendo el error relativo que existe entre el factor respuesta de cada punto de las curvas de cuantificación. El CV se calculó de acuerdo con la siguiente formula;

$$CV = \frac{DE}{\bar{x}} \times 100$$

También se prepararon las curvas de cuantificación de MoHCl en pH 4.5 y 6.5. En ambos casos se utilizaron 6 puntos, con las concentraciones 4.75 µg/mL, 9.50 µg/mL, 19.0 µg/mL, 28.5 µg/mL, 47.5 µg/mL y 66.5 µg/mL. Se agregó un punto de cuantificación extra a la curva para asegurar la interpolación de los datos

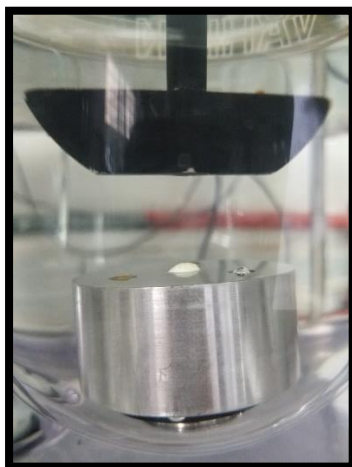
experimentales. También se utilizaron soluciones stock de 200  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{MoHCl}$ , preparadas con el medio correspondiente.

## 7.6 Determinación de la solubilidad de las NFS

La solubilidad de las NFS se determinó en una estación de reacción personalizado J-KEM® Scientific bajo las condiciones de 90 rpm a 37°C. Se utilizaron tubos de disolución de polvos adaptados para contener un volumen de 10 mL. Se agregaron 4 mL del medio de disolución (el que se pretenda evaluar) en cada tubo con un agitador magnético y se adicionó la cantidad de sólido suficiente para la saturación. Las muestras se tomaron a 1, 6, 24 y 48 horas. La toma de muestra se realizó con una jeringa, limitando el volumen máximo de esta a 500  $\mu\text{L}$ . Se filtró el volumen extraído y se almacenaron los sólidos obtenidos para posterior análisis de polvos. Finalmente, del medio remanente se tomaron 10  $\mu\text{L}$  y se diluyeron en un matraz aforado de 5 mL. El resto de la muestra se devolvió al tubo del experimento. Las diluciones se midieron en un espectrofotómetro UV-Carry. El estudio se realizó por duplicado.

## 7.7 Determinación de la velocidad de disolución intrínseca

Debido a la alta solubilidad de  $\text{MoHCl}$  se utilizó una adaptación del aparato de Wood, en conjunto con el Aparato II de la USP (Cordoba Villalobos, 2011). En la Figura 15 se observa que dicho cambio consiste en invertir la matriz de manera que se encuentre en el fondo del vaso de disolución. Esto permite que el fármaco comprimido no se fragmente al contacto con el medio, manteniendo un área constante a lo largo de la prueba. Esta metodología fue utilizada en todas las pruebas de disolución realizadas.



*Figura 15 Modificación del aparato de Wood que fue utilizada en las pruebas de disolución intrínseca de MoHCl y las NFS.*

La evaluación de la velocidad de disolución intrínseca se realizó por medio del uso de un disco estacionario. En primer lugar, se elaboraron comprimidos con el sólido de interés en una matriz del aparato de Wood, empleando una prensa hidráulica con una presión de  $60 \text{ Kg/cm}^2$  por 30 segundos. Posteriormente, para evitar que el comprimido se fracture hacia el interior de la matriz por la acción de la gravedad o la humedad, se rellenaron las matrices con alcohol estearílico fundido a  $60^\circ\text{C}$ . Se cubrieron las matrices con plástico auto adherible y se introdujeron en los vasos de disolución. Finalmente, se agregó el medio de disolución cuidadosamente para rellenar cada uno de los vasos.

Todas las pruebas se realizaron con 700 mL del medio de disolución (el que se pretenda evaluar) a  $37^\circ\text{C}$ . La agitación del sistema se hizo con las paletas (USP II) a 50 rpm. Las muestras se tomaron en intervalos establecidos de tiempo; 1, 3, 5, 7, 10, 13, 16, 20, 25, 30, 35, 40 minutos. En el caso de las pruebas que duraron más de 35 minutos se especifican las modificaciones en cada resultado.

## 7.8 Disolución de polvos

Las disoluciones de polvos se realizaron en la estación de reacción personalizado J-KEM® Scientific a 37°C utilizando una velocidad de agitación de aproximadamente 90 rpm. Se utilizó un solo tubo por experimento con un volumen de 4 mL de medio ácido a pH 1.2 y una muestra de 130 mg de sólido. El experimento daba inicio cuando se suspendía el sólido en el medio de disolución. La toma de muestras se realizó bajo los siguientes tiempos: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 minutos. Las muestras fueron de 1 mL, se filtraron (Whatman® #3) y se tomaron 20 µL que se diluyeron en un matraz aforado de 10 mL con medio ácido a pH 1.2. Posteriormente, el volumen restante de muestra filtrada se devolvía al tubo. Finalmente, todas las muestras sólidas obtenidas se secaron en el filtro sobre una toalla de papel a temperatura ambiente y se almacenaron en bolsas para los análisis posteriores.

## 7.9 Evaluación de la transformación de fase

En todas las pruebas biofarmacéuticas se recuperó sólido con la finalidad de evaluar si ocurre una transformación de fase de las NFS y el MoHCl. Para la prueba de solubilidad y disolución intrínseca se utilizaron cantidades grandes de cocrystal para obtener los resultados correspondientes. Sin embargo, se recuperaron cantidades pequeñas de sólido filtrado.

En la prueba de solubilidad, todas las muestras obtenidas fueron filtradas con un Whatman® #3 y el sólido fue secado a temperatura ambiente por 24 horas para su posterior análisis por DRXP.

En el caso de la prueba de disolución intrínseca, como se mencionó en la sección 7.10 se elaboraron comprimidos de 0.5 cm<sup>2</sup>. Al final del experimento se dejaron secar las matrices del aparato de Wood y se raspó la superficie del comprimido que

estuvo en contacto con el medio de disolución. El sólido recuperado fue almacenado para ser analizado posteriormente por DRXP.

7.9.1 Pruebas complementarias para la evaluación del grado de polimorfismo.

Las pruebas adicionales para evaluar el polimorfismo en las NFS se realizaron en viales utilizando 20 mg de sólido (MoHCl, MoHCl.DLMA o MoHCl.24DBA), en contacto con 50  $\mu$ L de disolvente (agua, metanol o etanol). Todas las muestras se mantuvieron en agitación durante 35 minutos. Posteriormente, se dejaron secar a temperatura ambiente para poder ser raspadas y analizadas por DRXP.

#### 7.10 Prueba de estabilidad indicativa

Se prepararon viales con 30 mg de muestra sólida, de cada una de las NFS y MoHCl por duplicado. Se etiquetaron de acuerdo con las condiciones específicas de humedad y temperatura, las cuales se mencionan a continuación:

Condición A: Temperatura de 40°C en seco.

Condición B: Temperatura de 50°C en seco.

Condición C: Temperatura de 40°C con humedad relativa del 75%.

Todas las muestras se prepararon por duplicado y se enviaron a Laboratorios Senosiain S.A de C.V, donde se mantuvieron en cámaras de atmósfera controlada durante un mes bajo las condiciones mencionadas. Una vez transcurrido el lapso se recibieron y evaluaron por DRXP.

## 8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Caracterización física de las materias primas

#### 8.1.1 Difracción de Rayos X de Polvos (DRXP)

Se analizaron las materias primas en el equipo de DRXP antes de iniciar los experimentos. Además de analizar cada materia prima sin modificaciones, posteriormente las materias primas se sometieron al proceso de *RxS* agregando 50  $\mu\text{L}$  de disolvente, agitando por 45 minutos. Todas las muestras se analizaron por DRXP. Este análisis ayudó a descartar la formación de un polimorfo o alguna fase sólida por el simple contacto de las materias primas con el disolvente. Eliminando este tipo de variación podemos asegurar que la comparación de resultados será más precisa.

En la Figura 16a se presentan los difractogramas de MoHCl y el producto MoHCl+MeOH. Resulta relevante señalar que algunos de los picos de la materia prima de MoHCl se mantienen en el producto obtenido después de ser expuesto a MeOH. Sin embargo, se observó la presencia de picos que no están en la materia de partida. Esto sugiere que MoHCl sufrió una transformación de fase mediada por el MeOH. Previamente, se reportó que MoHCl se transforma hacia el solvohidrato cuando se expone a metanol (Martínez-Alejo et al., 2014). Un análisis visual comparativo del patrón de DRXP indica que el sólido obtenido en este trabajo corresponde a la misma fase sólida.



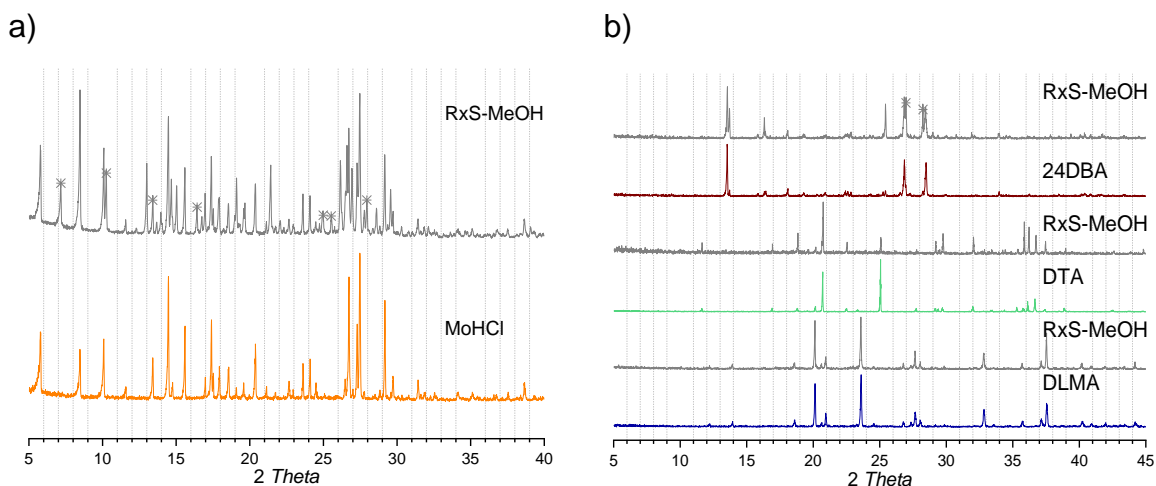


Figura 16 Análisis de DRXP-T de MoHCl (a) y de las materias primas (b) antes y después del experimento de formación de pasta con MeOH (RxS).

De igual forma se realizó el experimento control con los coformadores DLMA, DTA y 24DBA adicionando la cantidad de MeOH mencionada anteriormente. Se obtuvieron los difractogramas que se muestran en la Figura 16b. Se observó en primer lugar que DLMA no sufrió cambio alguno por el contacto con MeOH. En cambio, el DTA presentó una alteración en la intensidad de los picos observados, sin la presencia de nuevos picos. Finalmente, en el experimento con 24DBA se observó lo que parece la aparición de un pico nuevo a  $26^\circ$  2-*theta* y diferencias en la intensidad de sus picos. Esto indica que los cristales de 24DBA sufrieron una transformación de fase por la acción del disolvente utilizado.

### 8.1.2 DSC/TGA

Esta prueba nos permite observar el comportamiento de los sólidos con respecto al aumento de la temperatura. Es posible determinar si el compuesto se encuentra hidratado, solvatado, sufre descomposición o si tiene alguna impureza.

El análisis de MoHCl se observa en la Figura 17a. En el experimento se colocaron 1.42 mg de masa inicial y se evaluó la pérdida de peso desde 25 a  $400^\circ\text{C}$ . Se observó una pérdida inicial de 2.812% entre 50 y  $125^\circ\text{C}$ , la cual corresponde a la presencia de agua dentro de la estructura cristalina del sólido. Esta pérdida equivale

a 0.6 moléculas de agua, de acuerdo con la literatura se considera un hemihidrato (Martínez-Alejo et al., 2014). La pérdida correspondiente al MoHCl se observó que comienza a 240°C y continúa después de los 400°C por lo que no se presenta en este gráfico. Se estima que esto ocurre debido a que se mantuvo una masa de sólido sin volatilizarse.

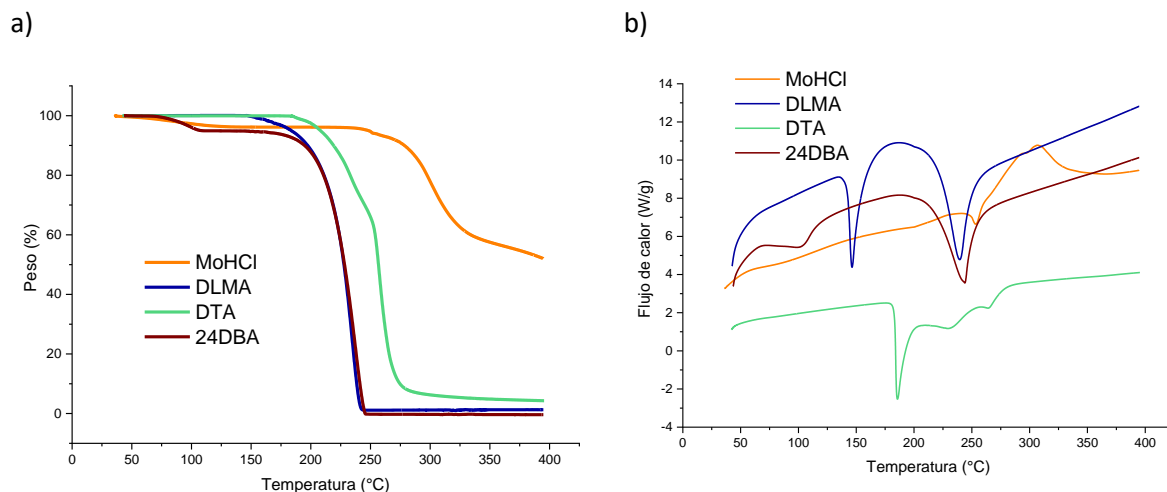


Figura 17 Análisis térmico de las materias primas. TGA (a) y DSC (b)

En la Figura 17b se presenta el análisis de DSC de MoHCl. Se observó el primer evento térmico a aproximadamente 250°C, este se relaciona al punto de fusión de MoHCl (240-248°C)(Sadeek, El-Shwiniy, & El-Attar, 2011). Esto se comprueba con el TGA, observando una pérdida de masa relacionada a la evaporación del líquido. Posteriormente, el segundo evento térmico que se observa a 300°C se correlaciona al TGA como una pérdida de masa más gradual conforme aumenta la temperatura.

En el caso del cocrystal MoHCl-DLMA se colocaron 2.105 mg en el equipo y se evaluó el cambio en la masa bajo las mismas condiciones de temperatura. En la Figura 17a se presentan los resultados. Se observó una única pérdida de masa del 98.84% a 148°C, siendo concluyente el análisis en cuanto a la pureza del reactivo y su estado anhidro. Para corroborar este resultado, se analizó el DSC en la Figura 17b donde se observa un primer evento térmico a 150°C, temperatura a la cual

funde el DLMA. El segundo evento térmico a 240°C corresponde a la evaporación del sólido, observando la pérdida total de masa en el TGA.

Para el caso del DTA se utilizaron 8.14 mg de sólido, se establecieron las mismas condiciones que en las pruebas anteriores. Se presentó una única pérdida de masa a 200°C, es relevante mencionar que sólo se pierde el 95.4% de la masa total del sólido. Esto es debido a sólido remanente que no es volatilizado por la temperatura. En el DSC (Figura 17b) el primer evento térmico ocurre a 180°C, temperatura que corresponde al punto de fusión del DTA. Posteriormente se observan variaciones en el flujo de calor que se pueden correlacionar al TGA como la volatilización del compuesto fundido.

Finalmente, para el análisis de 24DBA (Figura 17a) se colocaron inicialmente 2.581 mg del sólido y se establecieron las mismas condiciones de temperatura. Primeramente, se observó una pérdida de masa del 5% que corresponde a la presencia de agua en el sólido. Esta pérdida equivale a 0.49 moléculas de agua, indicando que el sólido es un hemihidrato. La segunda pérdida de masa equivale al 94.77%, la evaporación del 24DBA. En la Figura 17b se observó que el primer evento térmico a 100°C se correlaciona con la evaporación del agua contenida en el sólido. Posteriormente, el segundo evento térmico ocurre a 210°C, a esta temperatura el coformador sufre un cambio de estado sólido a líquido y al mismo tiempo se relaciona a la evaporación que se observa en el TGA.

## 8.2 Cribado de nuevas fases de las NFS

En la Tabla 3 se resumen los resultados de síntesis de las NFS, el detalle de los resultados se presenta en las secciones siguientes.

*Tabla 3 Resumen de resultados de la síntesis de los cocrisales bajo las diferentes condiciones evaluadas*

Cocrystal	MeOH	EtOH	H <sub>2</sub> O
MoHCl-DLMA	✓	✗	✗
MoHCl-24DBA	✓	✗	✗
MoHCl-DTA	✗	✗	✗

### 8.2.1 DLMA y 24DBA

Se procedió a la reproducción de las NFS tomando como base las condiciones establecidas anteriormente. Se procuró la obtención de difractogramas con una resolución adecuada, aumentando el tiempo de análisis de la muestra en caso de ser necesario. Se realizó una molienda con mortero previamente al análisis de estos, homogeneizando los polvos para evitar favorecer una conformación en particular.

Se seleccionaron los disolventes; agua, metanol y etanol para realizar las pruebas de cribado de NFS. Es importante la selección del mejor disolvente con el cual las fases pueden sintetizarse. En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos del cribado de las nuevas fases sólidas del cocrystal MoHCl-DLMA para cada caso con MeOH (a), EtOH (b) y H<sub>2</sub>O (c).

En la Figura 18a se presentan los resultados de las pruebas de cribado de nuevas fases realizadas con metanol. Se observó que en la proporción 1:1 (IFA:coformador) desaparecen picos importantes que caracterizan a las materias primas. Asimismo, la aparición de nuevos picos que se relacionan con la síntesis del cocrystal. Es importante determinar la proporción correcta para la optimización de la síntesis de

la NFS. Por ello, se procuró experimentar con las proporciones 2:1 y 1:2 IFA:coformador respectivamente. Sin embargo, en ambas condiciones es claro el exceso de materia prima. Por lo tanto, es posible sintetizar el cocrystal MoHCl:DLMA utilizando metanol en una proporción 1:1.

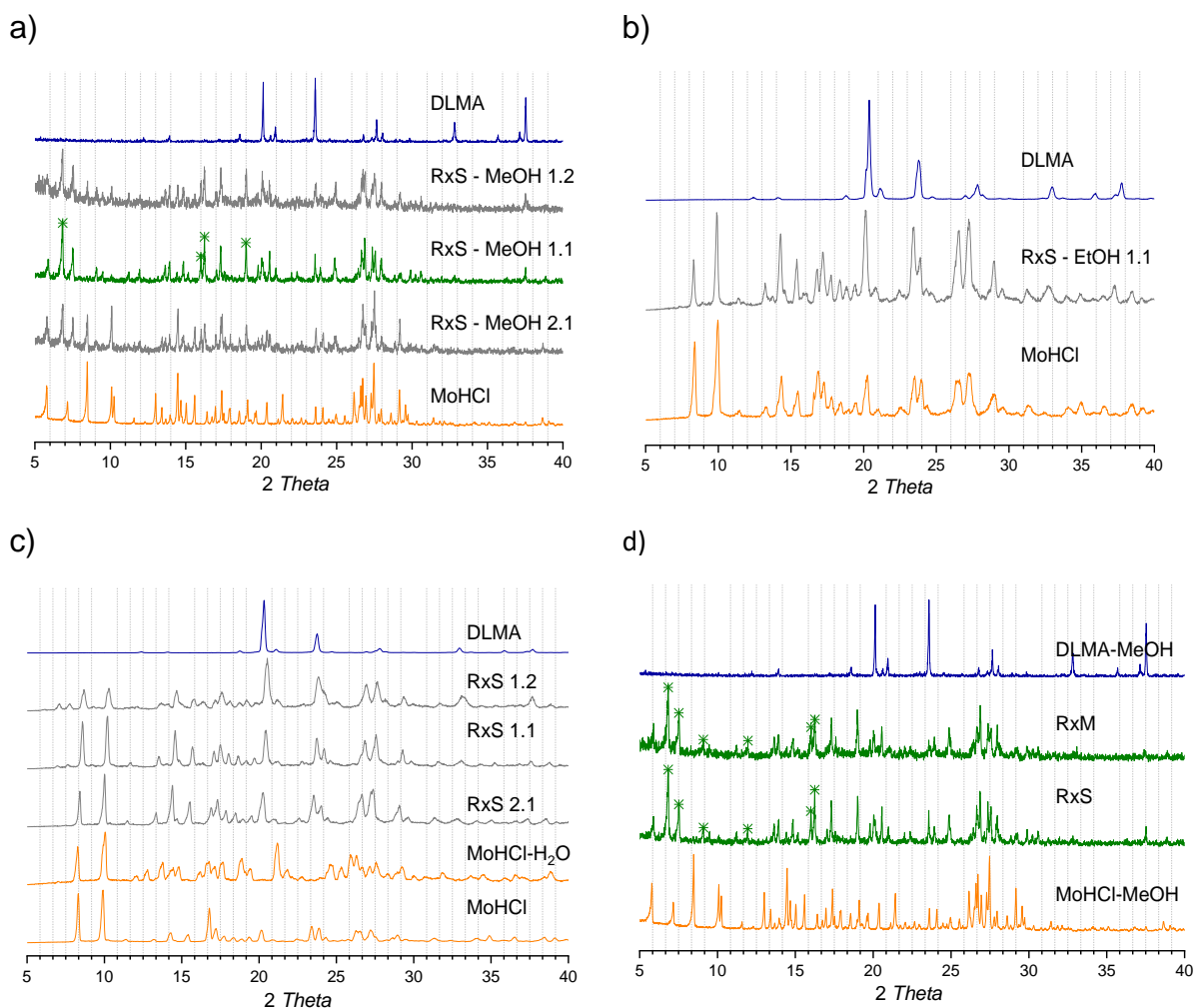


Figura 18 Análisis de DRXP-I del cribado de nuevas fases del cocrystal MoHCl-DLMA con los disolventes MeOH (a), EtOH (b) y agua desionizada (c). Por último, se observa la comparación de los resultados de la RxS y la RxM para sintetizar el cocrystal en proporción 1:1(d).

Para el caso de etanol, se presentan los resultados en la Figura 18b. En el difractograma de la reacción se observó la presencia de ambas materias primas, siendo descartada la formación de una NFS. En este caso no es necesaria la

experimentación con proporciones, debido a la nula interacción de ambas materias primas. Esto puede ser causado por el disolvente, al no proveer una buena solubilización de ambos compuestos. Limitando la interacción y formación del cocrystal.

En la Figura 18c se observa el resultado de la reacción de MoHCl-DLMA al utilizar agua desionizada como disolvente. En este caso sí se realizaron los experimentos de las 3 proporciones distintas entre IFA:coformador, por conveniencia de este disolvente siendo el más ecológico y seguro de las opciones. En los difractogramas se observó que no ocurre interacción entre las materias primas en las condiciones establecidas, ya que los picos característicos de ambas materias primas se mantienen. Esto indica que no es posible sintetizar este cocrystal utilizando agua desionizada.

Debido a que la NFS MoHCl-DLMA sólo se pudo sintetizar con MeOH, se procedió a escalar y caracterizar esta fase. En primer lugar, se hizo una prueba con 100 mg, una vez confirmada la formación del cocrystal se procedió a escalar a 750 mg. Esto se realizó con la finalidad de obtener la cantidad suficiente de muestra para la evaluación de las propiedades biofarmacéuticas, la NFS se reprodujo por medio de molienda mecanoquímica asistida por disolvente. Esta técnica nos permite obtener hasta 1 gramo de la NFS por experimento. Como se mencionó anteriormente, la reacción se llevó a cabo a 20 Hz por 30 minutos agregando 200  $\mu$ L de MeOH. En la Figura 18d se presentan los resultados de DRXP.

Podemos observar que comparando el resultado de la síntesis por RxS y por molienda, se obtuvo un patrón similar. Se observó un aumento en la intensidad de los picos en el producto de la síntesis por molienda. Es importante destacar que este efecto se relaciona a una mejor síntesis del cocrystal.

Una vez comprobada la síntesis del cocrystal MoHCl-DLMA por medio de molienda mecanoquímica, todas las pruebas posteriores harán uso del cocrystal sintetizado por esta técnica.

Los resultados de la evaluación de cribado de NFS de las pruebas realizadas con 24DBA se presentan en la Figura 19. Al evaluar el difractograma obtenido al utilizar MeOH (a) se observaron señales que podían pertenecer a ambas materias primas, como el pico que se encuentra a  $14^\circ 2\theta$  o la serie de picos entre  $25$  y  $28^\circ 2\theta$ . Esto nos condujo a evaluar las otras proporciones 2:1 y 1:2 MoHCl-24DBA respectivamente. Con la finalidad de descartar la presencia de picos correspondientes a las materias primas en el difractograma obtenido de la proporción 1:1. En el resultado de la proporción 2:1 se observan los picos característicos de MoHCl que se encuentran entre  $5$  y  $10^\circ 2\theta$ , esto nos indica un exceso de IFA en la reacción. Mientras tanto, en la proporción 1:2 se encuentra el pico característico de 24DBA a  $14^\circ 2\theta$ , indicando el exceso de coformador en la reacción. Estos resultados nos ayudaron a concluir que la proporción correcta para la síntesis del cocrystal es 1:1.

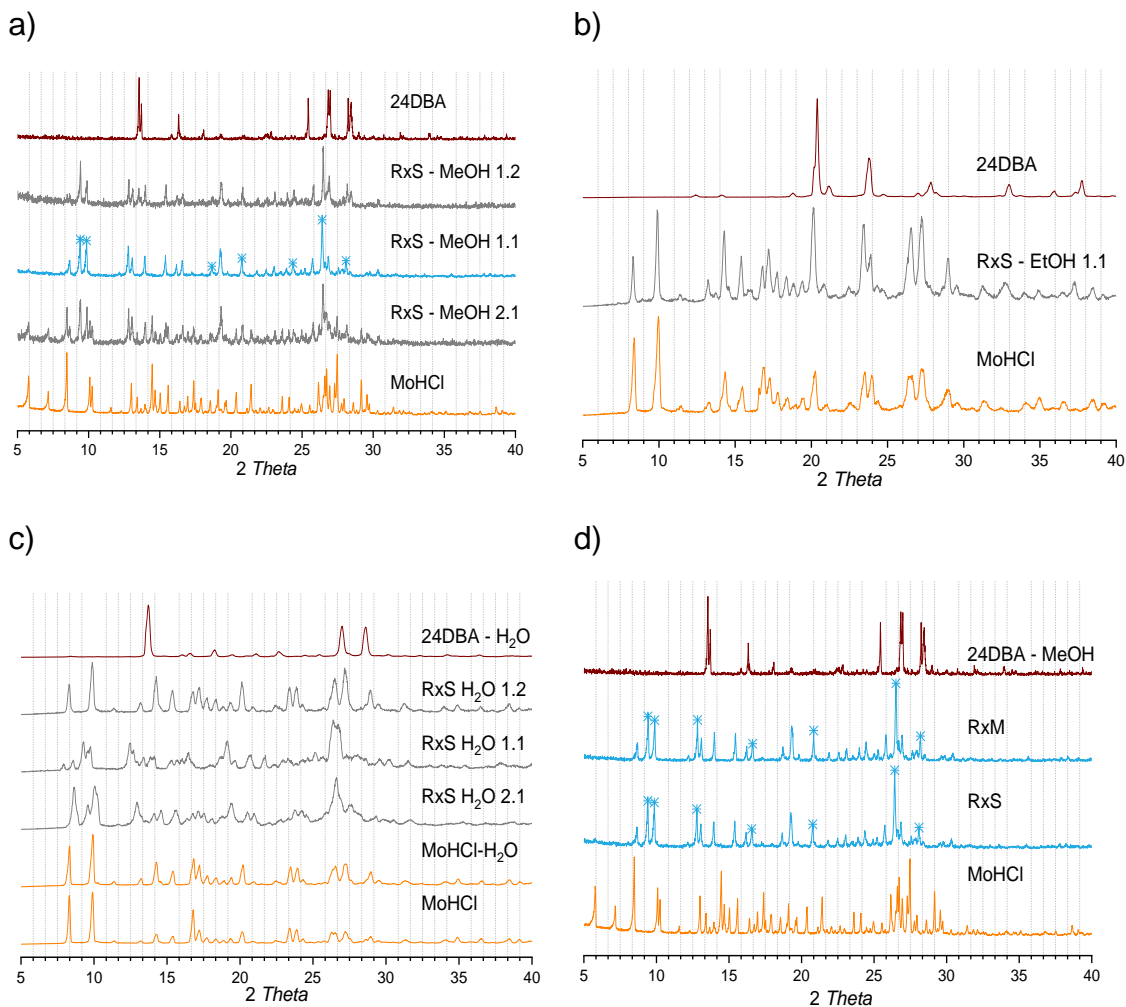


Figura 19 Análisis de DRXP-I del cribado de nuevas fases del cocrystal MoHCl-24DBA con los disolventes MeOH (a), EtOH (b) y agua desionizada (c). En el (d) se observa la comparación de los resultados de la reacción de RxS y la RxM para sintetizar el cocrystal.

Se procedió a realizar el experimento con EtOH (Figura 19b) con las mismas condiciones que se han utilizado anteriormente. Al evaluar el gráfico obtenido de la RxS se identificó claramente las señales de las materias primas. Esto descartó la formación de una NFS indicando que el disolvente no propicia la interacción entre ambos. Por lo tanto, el EtOH no es adecuado para la formación del cocrystal MoHCl-24DBA.

Posteriormente, se evaluó la posible síntesis de la NFS con el uso de agua desionizada como disolvente. En la Figura 19c se presentan los difractogramas obtenidos de las pruebas de DRXP. Se observó que se sintetizó una NFS en la



proporción 1:1, ya que presentó picos de difracción diferentes a los de las materias primas. Sin embargo, al variar la proporción de materia prima no se observan claramente los excesos de estas. En ambos casos (2:1 y 1:2) se presenta un exceso de MoHCl, siendo incongruente el resultado. Por lo tanto, se descartó la formación de una NFS al utilizar agua desionizada como disolvente.

Con los resultados obtenidos se seleccionó al MeOH como el disolvente adecuado para la síntesis del cocrystal MoHCl-24DBA en una proporción 1:1. Bajo estas condiciones se procedió a escalar y caracterizar la NFS. En la Figura 19d se presenta la comparación entre los difractogramas de los polvos obtenidos por RxS y molienda. Se observó la aparición de los picos característicos de la NFS en ambos casos, asegurando que es posible la síntesis de la NFS por ambos métodos. Con ello, se confirma el uso de la técnica de molienda como herramienta para el escalamiento de esta fase.

#### 8.2.2 Con el coformador DTA

En la Figura 20 se presentan los resultados de los experimentos con el coformador ácido D-tartárico. Se inició utilizando al MeOH como disolvente (a) con una proporción 1:1 entre las materias primas. En el difractograma se observó la presencia de picos correspondientes al coformador principalmente. Debido a que se observó la desaparición de las señales correspondientes al MoHCl, inferimos que está ocurriendo una interacción entre ambas moléculas y la posible síntesis de una NFS. Se procedió con la evaluación de las otras proporciones 2:1 y 1:2. Los resultados obtenidos no fueron acertados, la presencia de las señales de las materias primas se observa en ambas proporciones descartando la formación de una NFS. Finalmente, se evaluó una proporción no convencional de 1.5:1, donde se observó el mismo comportamiento y la presencia de los picos correspondientes a ambas materias primas. Debido a esto se descartó la posibilidad de sintetizar esta NFS por medio de la RxS utilizando metanol como disolvente.

Se procedió a evaluar la síntesis de la NFS MoHCl-DTA utilizando EtOH (Figura 20b). La proporción de cada materia prima fue modificada debido a que inicialmente se observó un cambio en el patrón de difracción del experimento 1:1. Sin embargo, en todos los resultados posteriores se observan los picos de las materias primas, indicando que existe un exceso o que incluso no se está llevando a cabo la cocrystalización. Por lo tanto, se descarta el EtOH como disolvente para la síntesis del cocrystal MoHCl-DTA.

Finalmente, en la Figura 20 (c) se presentan los resultados obtenidos de los experimentos utilizando agua desionizada como disolvente. En este caso se evaluaron 3 proporciones molares entre las materias primas debido al cambio en el patrón de difracción de la RxS 1:1. Sin embargo, como se observó en los resultados que se obtuvieron al experimentar con EtOH, el cambio detectado no es relevante para confirmar la formación de la NFS MoHCl-DTA. Solo se observan dos picos diferentes a 5 y 12.5°2θ de muy baja intensidad. Por lo tanto, se descarta también al agua desionizada como disolvente para obtener esta NFS.

Debido a que ningún disolvente puesto a prueba durante el cribado de la NFS MoHCl-DTA fue exitoso en la síntesis de la fase, se descarta el escalamiento bajo estas condiciones. Se decidió no continuar con la búsqueda de condiciones adecuadas para la síntesis de esta fase, y avanzar en la caracterización de las otras ya obtenidas.

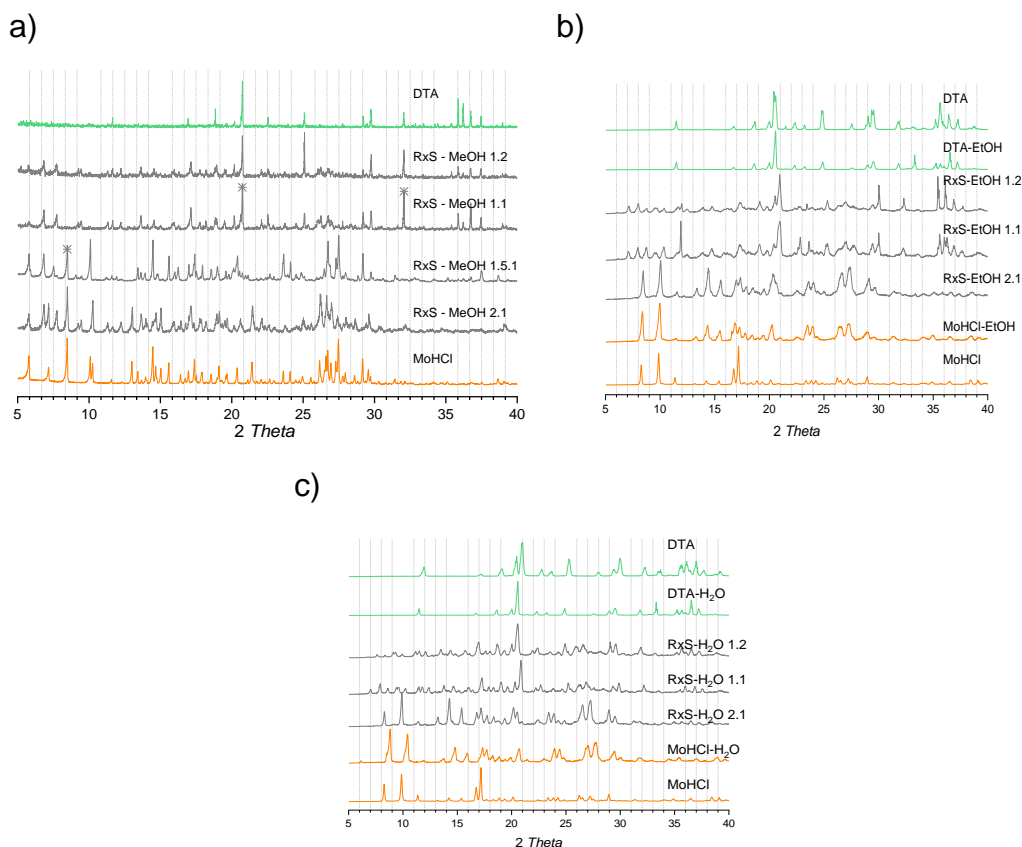


Figura 20 Análisis de DRXP-T del cribado de nuevas fases del cocrystal MoHCl-DTA con los disolventes MeOH (a), EtOH (b) y agua desionizada (c).

Debido a que no se pudo obtener la NFS sin presencia de materia prima por medio de la RxS, se procedió a utilizar la RxC. Se obtuvo un sólido con una consistencia parecida a un gel (Figura 37), el cual después de 24 horas se filtró utilizando un Whatman® #3. El polvo obtenido se evaluó por DRXP (Figura 38). Se comparó el difractograma obtenido de los productos de ambas reacciones. Se observó que MoHCl-DTA se obtiene con mayor pureza por medio de la RxC. En el caso de la RxS, se obtuvieron combinaciones de cocrystal con las materias primas.

Se procedió a lavar el sólido obtenido de la RxC con MeOH para observar el efecto sobre la pureza del cocrystal obtenido. En la Figura 39 se presenta el difractograma de los polvos obtenidos de la RxC con 1 mL, 2 mL y 2mL con lavado. Se observó que al aumentar el volumen de la reacción se obtiene un sólido con presencia de

coformador. También, observó claramente el exceso de DTA en el difractograma del producto lavado. Por ello, se dedujo que el lavado del producto no tiene un efecto sobre su pureza. La cantidad obtenida de cocrystal al final de la RxC fue de aproximadamente 25 mg.

Debido a que se obtuvo un rendimiento del 10% en la RxC no se consideró viable continuar con los experimentos de esta NFS.

### 8.3 Caracterización física de las NFS sintetizadas

#### 8.3.1 MoHCl-DLMA

Posteriormente, se realizó el análisis térmico de la NFS. Se colocaron inicialmente 2.612 mg del sólido y se procedió con el experimento. Se obtuvo el TGA presentado en la Figura 21a. Se observaron tres pérdidas de masa, la primera comienza desde los 40°C se debe al agua presente en el sólido, con un 2.031% que equivale a 0.67 moléculas de agua. La pérdida paulatina de masa se debió a que la muestra no se secó a peso constante de manera adecuada. La siguiente pérdida a 190°C se debe al DLMA con un 22.83% que es equivalente a 0.91 moléculas. Finalmente se observa la pérdida de masa correspondiente al MoHCl, siendo una descomposición incompleta como se mencionó anteriormente. En el caso del DSC presentado en la Figura 21b, se observó que no ocurren claramente los eventos térmicos de la NFS. Sin embargo, el cambio en el flujo de calor comienza a aproximadamente 200°C, temperatura a la cual comienza la descomposición del cocrystal en el TGA.

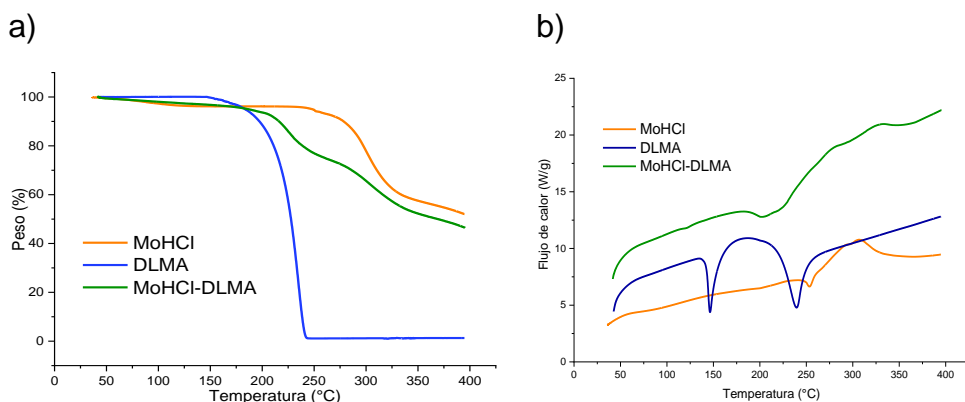


Figura 21 Caracterización física del cocrystal MoHCl-DLMA y las materias primas, análisis de TGA (a) y análisis de DSC (b).

Otra técnica utilizada para la caracterización de las NFS fue la espectrofotometría de infrarrojo. En el caso de la fase con DLMA los resultados se muestran en la Figura 22. En el espectro de MoHCl (color naranja) podemos identificar las bandas de absorción que corresponden a los grupos funcionales más representativos, como el H<sub>2</sub>O (3530 cm<sup>-1</sup>), O–H (3200 cm<sup>-1</sup>), +NH<sub>2</sub> (2524 cm<sup>-1</sup>), O=C (1658 cm<sup>-1</sup>) y COOH (1709 cm<sup>-1</sup>). En el caso de DLMA, se detecta el estiramiento del grupo OH en la zona de 3000 a 3500 cm<sup>-1</sup>. Asimismo, los ácidos carboxílicos se pueden detectar a 1682 cm<sup>-1</sup>. Para la NFS se observa que ocurre un cambio en las bandas de absorción de las materias primas. Comparando a MoHCl con el cocrystal, se identificó que la banda de absorción del grupo COOH (1709 cm<sup>-1</sup>) sufrió un ligero cambio a 1713 cm<sup>-1</sup>. También, ocurrió un cambio importante en la zona de 3000 a 3500 cm<sup>-1</sup> donde se observó la desaparición de la banda correspondiente al H<sub>2</sub>O (3530 cm<sup>-1</sup>). Mientras que al comparar DLMA, se observó una modificación en la banda de absorción del grupo O=C (1682 cm<sup>-1</sup>) la cual se desplazó a 1624 cm<sup>-1</sup>. Todos los cambios observados en las bandas de las muestras analizadas son indicativos de una interacción entre los grupos funcionales que componen a las materias primas, confirmando la presencia de una NFS.

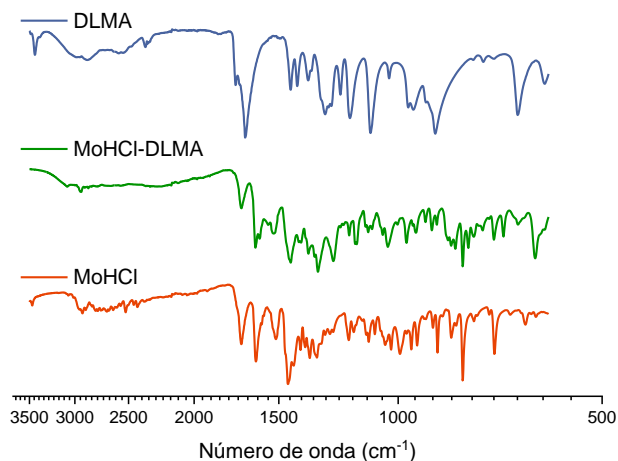


Figura 22 Caracterización física del cocrystal MoHCl-DLMA y las materias primas por medio de Infrarrojo.

### 8.3.2 MoHCl-24DBA

Para el análisis térmico se colocaron 1.681 mg y se analizó la muestra de 25 a 400°C, el resultado se observa en la Figura 23a. Desde 40°C se observó la pérdida inicial de masa, correspondiente la humedad absorbida que se encuentra en la materia prima y la NFS. Este cambio de masa equivale a 1 molécula de agua. Si revisamos la caracterización de las materias primas, ambas presentan una alta higroscopicidad. Por lo tanto, el agua presente en los análisis fue absorbida del medio ambiente. Este resultado se confirmó al analizar el DSC de los sólidos (Figura 23b). Se observó que el primer evento térmico del TGA se presenta también en el DSC del coformador y el cocrystal. En ambas gráficas se presentó un cambio paulatino en el flujo de calor desde 50°C. Posteriormente, se observó otra pérdida a los 175°C de 25.28% que equivale a 1 molécula de 24DBA. Esto nos ayudó a confirmar la proporción correcta de la NFS como 1:1. En el DSC del cocrystal se observó el segundo evento térmico comienza a los 174°C, lo cual coincide con la pérdida de masa observada en el TGA. Finalmente, se observó la pérdida de masa y el cambio en el flujo de calor que corresponde a la descomposición de MoHCl.

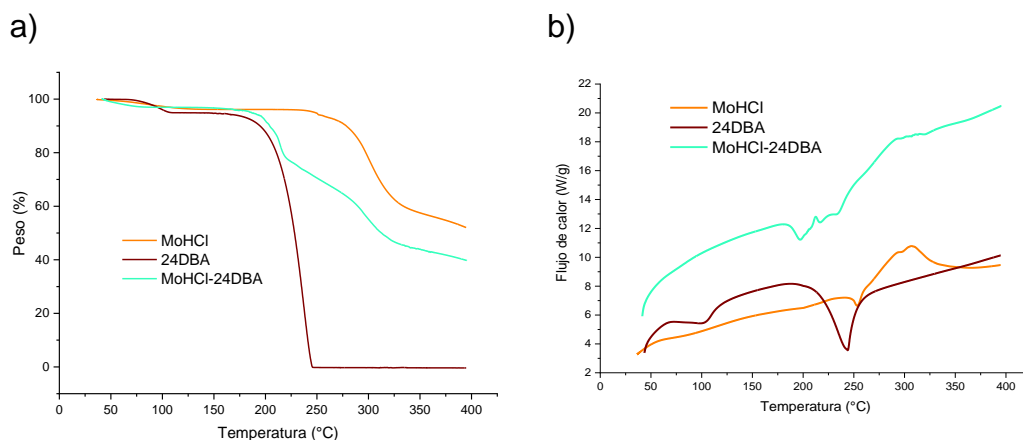


Figura 23 Caracterización física del cocrystal MoHCl-24DBA y las materias primas, análisis de TGA (a) y análisis de DSC (b).

En la Figura 24 se muestran los espectros de IR de la NFS MoHCl-24DBA y las materias primas. Como se mencionó anteriormente, MoHCl presentó varias bandas relevantes en  $3200$ ,  $2524$ ,  $1658$  y  $1709$   $\text{cm}^{-1}$  para los grupos O–H,  $^+\text{NH}_2$ , O=C y COOH respectivamente. En cambio, para el 24DBA se pueden identificar los grupos funcionales en los siguientes números de onda;  $2849$   $\text{cm}^{-1}$  (O–H),  $1616$   $\text{cm}^{-1}$  (Ph) y  $1705$   $\text{cm}^{-1}$  (COOH). En el caso de la NFS se observaron modificaciones en las bandas reportadas, la zona de  $3000$  a  $3500$   $\text{cm}^{-1}$  de ambas materias primas se ve modificada. Mientras que las bandas de los grupos  $^+\text{NH}_2$  ( $2,524$   $\text{cm}^{-1}$ ) y COOH ( $1709$   $\text{cm}^{-1}$ ) se ven desplazadas a  $2300$   $\text{cm}^{-1}$  y  $1658$   $\text{cm}^{-1}$  respectivamente. Al comparar el espectro de 24DBA con la NFS, se observó un ligero cambio en la banda del grupo Ph de  $1616$   $\text{cm}^{-1}$  a  $1619$   $\text{cm}^{-1}$ . También, se identificó una modificación en la señal del grupo O–H ( $1436$   $\text{cm}^{-1}$ ) el cual se desplazó a  $1440$   $\text{cm}^{-1}$ . Todos estos cambios indicaron la interacción entre las materias primas, lo cual afirmó la presencia de una NFS.

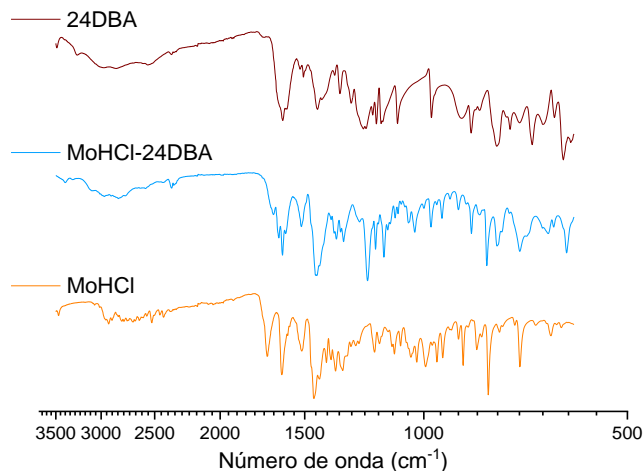


Figura 24 Espectros de IR de MoHCl-24DBA y materias primas.

#### 8.4 Evaluación biofarmacéutica

La evaluación biofarmacéutica de las NFS sintetizadas contempló la determinación de la solubilidad y la disolución intrínseca en diferentes medios que emularan condiciones específicas del tracto gastrointestinal. Estos experimentos se realizaron con la finalidad de obtener un perfil biofarmacéutico de las NFS. En general, la industria farmacéutica también los utiliza como un parámetro de control de calidad que debe cumplirse previo al inicio de la formulación de un medicamento.

Se realizó la validación de ciertos parámetros del método de cuantificación de MoHCl de acuerdo con lo establecido en la NOM 177. Posteriormente, se realizaron los estudios mencionados en cada uno de los medios de disolución. También, se buscó probar la especificidad del método de cuantificación para los formadores de cocrystal, evaluando los espectros de absorción y la interacción con el fármaco. Lo anterior con la finalidad de comparar ambos perfiles de disolución y determinar si se liberan en la misma cantidad al momento de tener contacto con el medio de disolución.



#### 8.4.1 Espectros de absorción

Con el fin de cuantificar la cantidad de MoHCl en solución derivado de los estudios de disolución y solubilidad, se desarrolló un método de cuantificación por espectroscopía Uv-Vis. Aunque el método es rápido y directo, no es necesariamente selectivo para mezclas de analitos, particularmente si estos presentan espectros de absorción superponibles. Debido a esto, el primer objetivo del estudio fue verificar si los espectros de absorción de los agentes coformadores utilizados en la generación de cocrystalos de MoHCl (i.e., DLMA y 24DBA) podían interferir para realizar una cuantificación selectiva de MoHCl.

La Figura 25a muestra el espectro de UV-Vis de MoHCl (5  $\mu\text{g/mL}$ ), DLMA (60  $\mu\text{g/mL}$ ) y 24DBA (4  $\mu\text{g/mL}$ ). MoHCl muestra un espectro de absorción significativo en el rango de 200 – 400 nm, con un máximo de absorbancia a 295 nm. El coformador DLMA presenta un máximo de absorción a 215 nm y su absorbancia es nula a longitudes de onda mayores a 250 nm. En el caso del espectro de 24DBA, éste presentó una absorbancia significativa en el rango de 200 a 315 nm, con máximos de absorción a 210 nm, 255 nm y 290 nm.

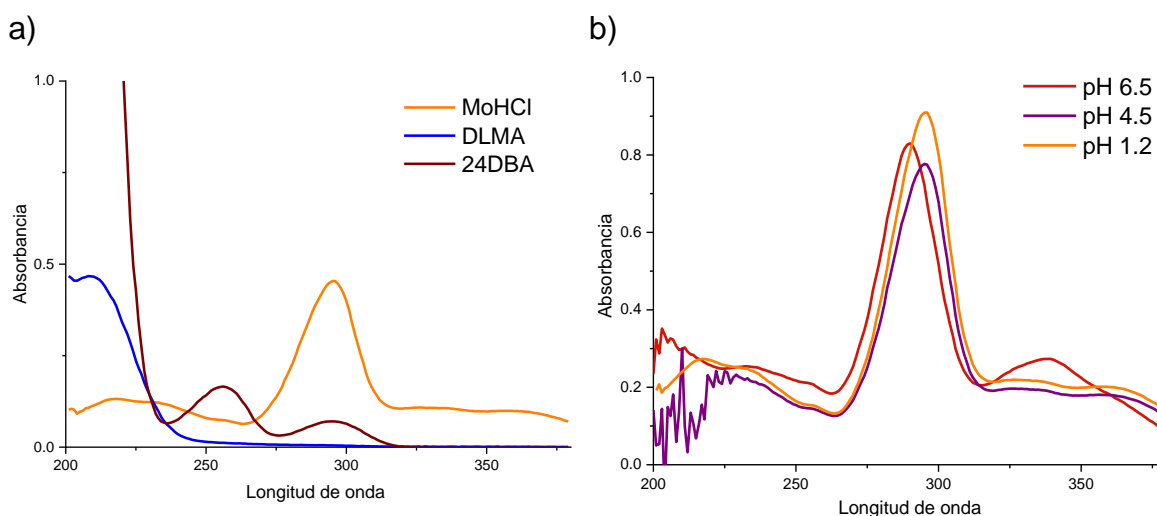


Figura 25 a) Espectro de absorción UV-vis de MoHCl (5  $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de DLMA (60  $\mu\text{g/mL}$ ) y 24DBA (4  $\mu\text{g/mL}$ ) en el medio de disolución de solución de ácido HCl pH 1.2, b) Comparación del espectro de absorción de MoHCl (en los medios de disolución de solución de HCl pH 1.2, buffer de acetatos pH 4.5 y buffer de fosfatos pH 6.5).

Las concentraciones definidas para el experimento se obtuvieron de evaluar de manera individual a cada analito. Observando la intensidad de la señal con respecto a su concentración. Se seleccionaron las concentraciones que reportaron una absorción muy similar con la finalidad de facilitar la comparación de los resultados en la curva que se realizó posteriormente.

Los resultados obtenidos fueron alentadores ya que muestran que es posible realizar una cuantificación selectiva de MoHCl en muestras que contengan a DLMA si se utilizan longitudes de onda mayores a 250 nm. Sin embargo, en aquellas muestras que contengan a MoHCl y 24DBA solo se puede cuantificar selectivamente a MoHCl a longitudes de onda superiores a 320 nm, aunque esta zona no corresponda a máximos de absorción de MoHCl. Esto puede ocasionar errores en la detección del espectrofotómetro, debido a que el compuesto presenta una señal más débil.

Debido a que la evaluación biofarmacéutica se realizó en medios de disolución de pH 1.2, buffer de acetatos pH 4.5 y buffer de fosfatos pH 6.5, se evaluó si el cambio en el pH modificaba el espectro de absorción de MoHCl (Figura 25b). El análisis permite observar que el espectro de MoHCl varía dependiendo del medio utilizado. Por ejemplo, el espectro a pH 1.2 y 4.5 tienen la misma forma, aunque se nota un ligero cambio en la intensidad y longitudes de onda de máxima absorción. Sin embargo, la mayor diferencia se muestra a pH 6.5 donde se observan variaciones significativas en el espectro a longitudes de onda mayores a 300 nm. El máximo de absorción a 340 nm no se tomó en cuenta para la cuantificación debido a que se pretendió seguir la metodología previamente reportada por E. Fitz en el 2012.

Los resultados indicaron que era necesario realizar una curva de cuantificación de MoHCl que sea específica para cada medio a utilizar. Se decidió utilizar 320 nm como longitud de onda de cuantificación de MoHCl. A pesar de no encontrarse en los máximos de absorción, se tenían datos que afirmaban la cuantificación de MoHCl con este método (E. Fitz, 2012).

Un experimento adicional fue verificar si la presencia del coformador en el medio de disolución (i.e., DLMA, 24DBA) modificaba la absorbancia de MoHCl a 320 nm. Para esto, a una solución con MoHCl de concentración determinada se le adicionaron alícuotas conteniendo al coformador, de forma tal que la concentración del coformador en la celda se incrementara gradualmente mientras que la concentración de MoHCl se mantuviera constante. En la Figura 26 se muestran los espectros de absorción UV-Vis derivados de estos experimentos. Tal como se puede observar, la absorbancia de MoHCl a 320 nm no se ve modificada por la presencia y concentración de ambos agentes coformadores, lo cual garantiza la exactitud en las mediciones de MoHCl a dicha longitud de onda.

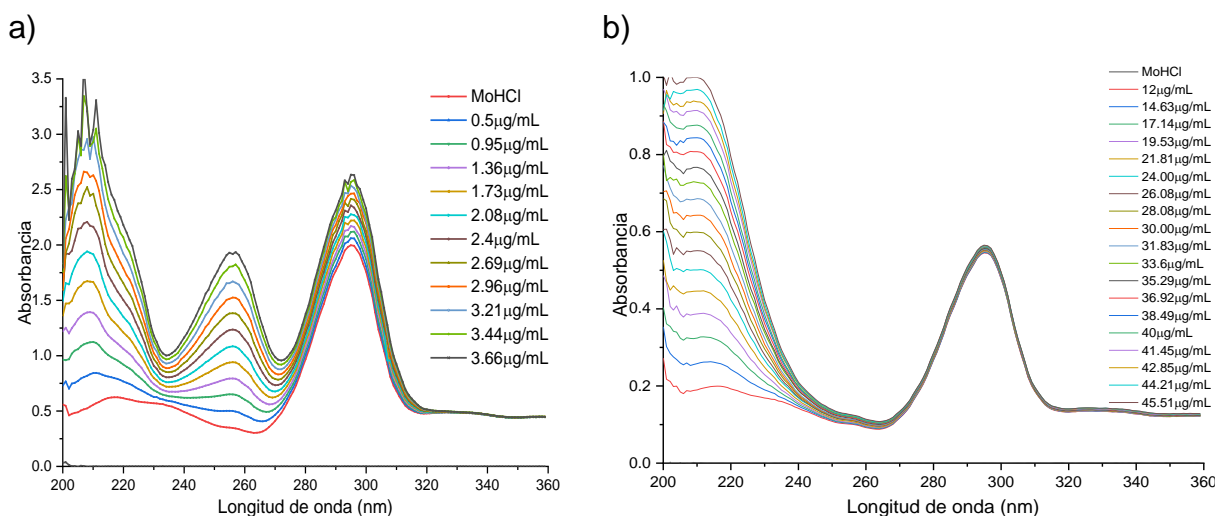


Figura 26 Titulación sobre soluciones de MoHCl disuelto en solución pH 1.2. a) Titraciones con 24DBA; b) titraciones con DLMA.

Es relevante resaltar el máximo de absorción de 24DBA observado a 265 nm, el cual coincide con un mínimo de absorción de MoHCl. Esta característica se utilizó para desarrollar un método indirecto de cuantificación de 24DBA en muestras que contenían simultáneamente a ambos compuestos. Se siguió un procedimiento basado en la ley de Lambert-Beer, considerando la fórmula:  $Absorbancia = abc$ ; donde  $a$  corresponde a la absorptividad molar de la muestra a la longitud de onda deseada;  $b$  corresponde al ancho de la celda de UV (1 cm), y  $c$  que se refiere a la

concentración de la muestra. La determinación indirecta de 24DBA se realizó como se describe a continuación:

- a. Determinar la absorptividad molar de 24DBA y de MoHCl, ambos a 256 nm.
- b. Realizar la cuantificación de MoHCl en la muestra problema a 320 nm (zona de absorptancia específica para MoHCl).
- c. A partir del dato de concentración de MoHCl medido a 320 nm, determinar la absorptancia teórica que dicha concentración de MoHCl presenta a 256 nm. Esto se realiza con la fórmula de Lambert-Beer, considerando que en este punto ya se conoce la absorptividad molar de MoHCl a 256 nm (paso a), y la concentración (paso b).
- d. La absorptancia teórica de 24DBA en la muestra problema se puede entonces calcular por medio de la substracción de la absorptancia teórica de MoHCl a 256 nm a la absorptancia total de la muestra a 256 nm ( $Abs_{total}^{256nm} = Abs_{MoHCl}^{256nm} + Abs_{24DBA}^{256nm}$ )
- e. Determinar la concentración de 24DBA a partir de la absorptancia calculada.

#### 8.4.2 Método de cuantificación de MoHCl

Siguiendo la metodología establecida en la sección 7.9, se obtuvieron los datos que se presentan en la Tabla 4. Las pruebas de linealidad se realizaron a partir del cálculo del Factor Respuesta de cada concentración, en cada uno de los triplicados. Podemos observar que la linealidad en los 3 medios de disolución fue adecuada ya que presentó valores mayores a 0.99 de Factor de correlación. Sin embargo, se presentó un ligero aumento en el coeficiente de variación conforme aumenta el pH, ocasionando que sea mayor al 2% establecido en los parámetros de validación de la NOM-177.

Tabla 4 Valores obtenidos de la validación de las curvas de cuantificación de MoHCl en los medios acuosos de pH 1.2, 4.5 y 6.5.

PARÁMETRO DE VALIDACIÓN	PH 1.2	PH 4.5	PH 6.5
FR	0.0248	0.0239	0.0209
DE	0.0004	0.0006	0.0005
R <sup>2</sup>	0.9999	0.9958	0.9999
CV	1.610%	2.31%	2.89%

Abreviaturas: FR – Factor de retención. DE – Desviación estándar. R<sup>2</sup> – Coeficiente de correlación. CV – Coeficiente de variación.

Con estos resultados se aseguró lo siguiente del método de cuantificación de MoHCl en el medio de disolución de pH 1.2:

- Es lineal – El Coeficiente de correlación es de 0.999
- Es preciso y reproducible – El coeficiente de variación es menor al 2%

En el caso de los medios de disolución de pH 4.5 y 6.5 solo aseguramos la linealidad y precisión de los métodos. Esto se debió a que el coeficiente de variación supera el 2% que establece la NOM 177.

Para los experimentos posteriores se realizó una curva de cuantificación específica para el día en que se llevan a cabo las pruebas, asegurando que la cuantificación de MoHCl es correcta.

#### 8.4.3 Pruebas de solubilidad

Las pruebas de solubilidad al equilibrio se realizaron en medios de pH 1.2, solución amortiguadora de acetatos pH 4.5 y de fosfatos pH 6.5 a 37°C. Para esto, se tomaron alícuotas de las muestras a determinados tiempos y se filtraron utilizando filtro Whatman® #3 El líquido filtrado se diluyó apropiadamente para realizar la cuantificación por UV-Vis, mientras que el sólido se recuperó para su análisis por DRXP.

Las solubilidades de MoHCl, MoHCl-DLMA y MoHCl-24DBA en los tres medios analizados se muestran en la Figura 27. En medio de HCl pH 1.2, MoHCl presentó una solubilidad de 12 mg/mL.<sup>i</sup> Por su parte, MoHCl-DLMA mostró una solubilidad promedio de 12.9 mg/mL. A su vez, la solubilidad de MoHCl-24DBA fue de 7.5 mg/mL. Las solubilidades de estas fases sólidas a pH 1.2 contrastan con la alta solubilidad reportada para el cocrystal MoHCl-4HBA (37.8 mg/mL). (Martínez-Alejo et al., 2014).

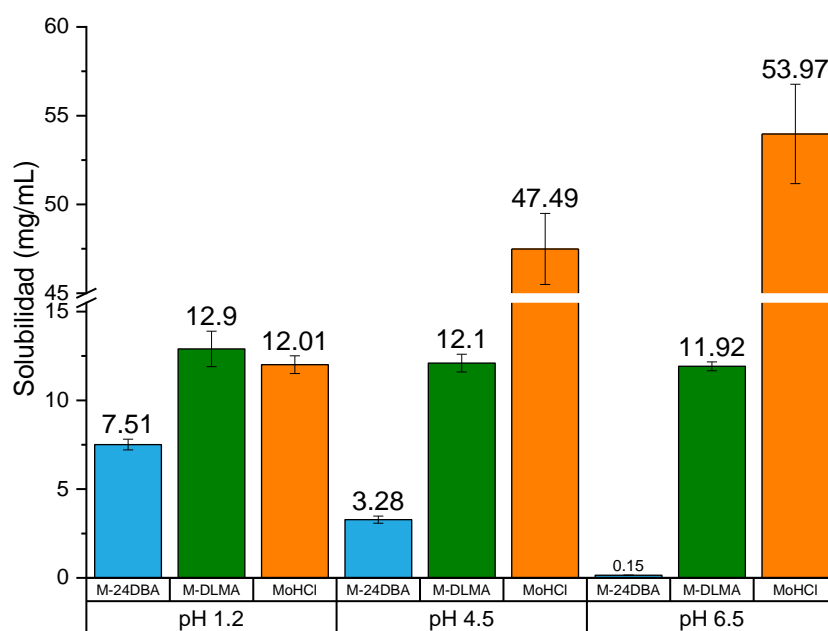


Figura 27 Resultados de las pruebas de solubilidad realizadas en los 3 medios de disolución para MoHCl y los cocristales. Los valores mostrados corresponden a  $t=1h$  de iniciado el experimento. 37 °C,  $n=3$ ,  $\pm DE$ .

Con respecto a los resultados en pH 4.5, la solubilidad de MoHCl fue de 47.5 mg/mL. Por su parte, dicha propiedad en MoHCl-DLMA fue de 12.1 mg/mL, mientras que MoHCl-24DBA tuvo una solubilidad de 3.3 mg/mL.

En medio de pH 6.5, la solubilidad de MoHCl, MoHCl-DLMA y MoHCl-24DBA fue de 54 mg/mL, 12 mg/mL y 0.15 mg/mL respectivamente. Estos resultados demostraron

<sup>i</sup> La solubilidad de MoHCl también se analizó a 25 °C, dando un resultado de 8.5 mg/mL.

la capacidad de la cocrystalización para modificar la solubilidad de un IFA, y que esto ocurre en diferentes niveles dependiendo del pH del medio evaluado. No es posible definir el impacto de este efecto en el presente proyecto ya que depende del resultado al que se pretende llegar. Nosotros no pretendíamos aumentar o disminuir la solubilidad de MoHCl, sino comprobar la posibilidad de hacerlo a través de la cocrystalización.

En el caso de MoHCl, la solubilidad mostró ser pH dependiente, observando un aumento congruente entre el pH y la solubilidad. En cambio, la cantidad de MoHCl en solución producida por MoHCl-DLMA mostró valores similares en los tres medios de disolución probados, sugiriendo la generación de un sistema cuya solubilidad es independiente al pH. En contraste, la solubilidad de MoHCl-24DBA mostró ser también pH dependiente. Sin embargo, en este sólido se observa un efecto contrario con respecto al de MoHCl, ya que la solubilidad disminuyó a medida que el pH aumentó. Estos resultados pueden ser relevantes para el diseño de sistemas avanzados de liberación de fármacos, los cuales en ocasiones buscan una liberación controlada de fármacos que no se vea modificada por las condiciones fisiológicas intrínseca de un organismo vivo (e.g., pH del medio). Sin embargo, la particularidad es que este tipo de comportamiento se obtuvo en una etapa de preformulación a través de la modificación del estado sólido, lo que indica que la cantidad en solución está limitada por parámetros termodinámicos (solubilidad). Adicionalmente, demuestra la necesidad de realizar estudios de caracterización biofarmacéutica que contemple diferentes medios de disolución.

El análisis de los sólidos aislados durante los experimentos de solubilidad se muestra en la Figura 28. Con respecto a MoHCl, se observó que el patrón de rayos X fue similar en todos los medios, y que coincide con el de la materia prima de partida. Esto indicó que la fase sólida no sufre una transformación por la exposición al pH de los diferentes medios de disolución.

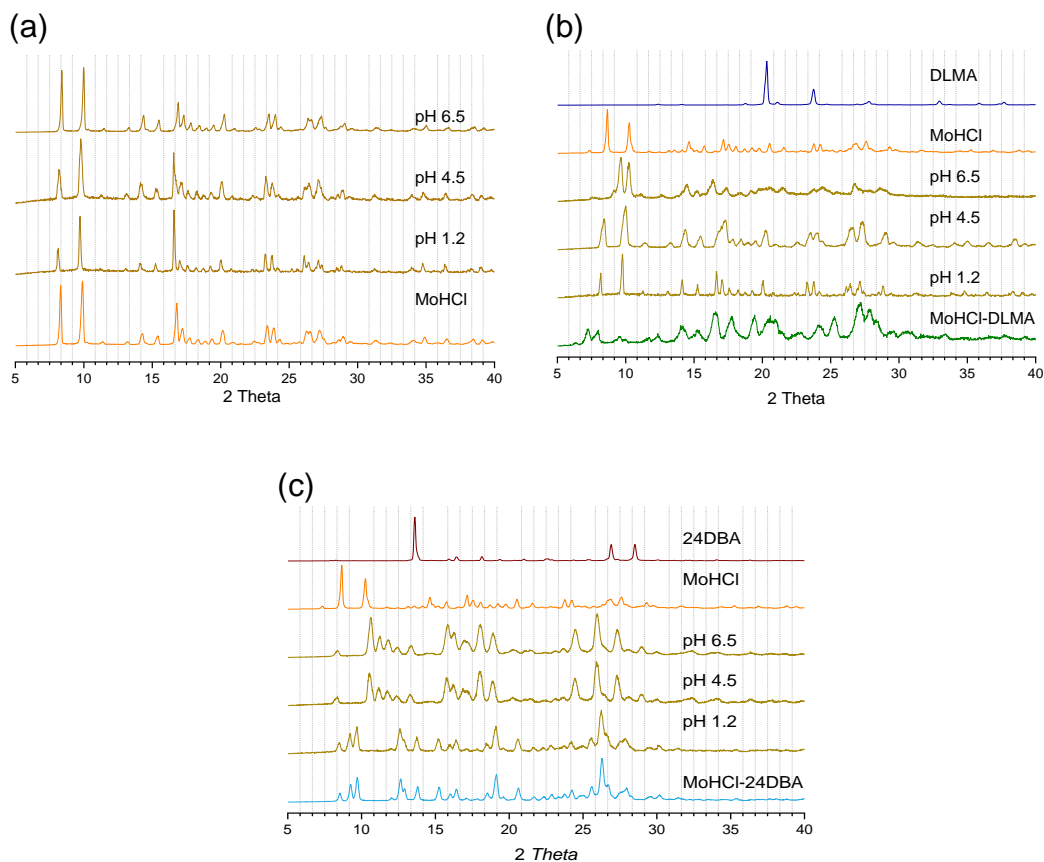


Figura 28. Análisis de DRXP-I de las muestras obtenidas de las pruebas de disolución de MoHCl (a), MoHCl-DLMA (b), MoHCl-24DBA (c), realizadas en medio de disolución pH 1.2 a 37°C. Todas las muestras fueron obtenidas a 1 hora de iniciado el experimento.

Con respecto a los resultados de MoHCl-DLMA, el patrón de DRXP de estos se muestra en la Figura 28b. Se observó que el patrón de los sólidos recuperados en los 3 medios es diferente al del cocrystal de partida, lo que indicó que el cocrystal sufre transformación de fase mediada por los medios de disolución. Es de destacar que el patrón de los sólidos obtenidos en los medios con pH 1.2 y 4.5 son similares y coinciden con el patrón de MoHCl, lo que indicó que el cocrystal se transforma hacia MoHCl. En el caso del sólido obtenido a pH de 6.5, el análisis mostró un nuevo patrón de DRXP que es diferente al de las materias primas.

La Figura 28c presenta el patrón de los sólidos recuperados de los experimentos con MoHCl-24DBA. El patrón del sólido a pH 1.2 coincidió con el del cocrystal de partida, lo que indicó que la fase es estable en fluido gástrico simulado. En cambio,



las muestras de pH 4.5 y 6.5 presentaron un nuevo patrón de DRXP que es diferente al del cocrystal de partida y a las materias primas. Esto indicó que se transforma en una nueva fase sólida inducida por el pH del medio.

No se realizaron estudios para conocer la identidad de las NFS aisladas de los experimentos de MoHCl-DLMA en pH 6.5, y del sólido obtenido de MoHCl-24DBA en pH 4.5 y 6.5, ya que se delimitaron los objetivos del presente proyecto, pero es sin duda una incógnita relevante.

Los cambios en solubilidad de MoHCl con respecto al cambio en el pH del medio pueden ser explicados considerando las especies en solución. La molécula de moxifloxacino tiene dos pKa asociados, uno a 5.69 atribuido al ácido carboxílico, y el otro a 9.42 asociada a la amina heterocíclica (Al Omari et al., 2014). Por lo tanto, las especies en solución con respecto al pH son tres, las cuales se ejemplifican en la Figura 29a. La primera (ácido neutro, amina protonada,  $H_2Mo^+$ ) predomina a valores de pH menores a 6.4. La segunda especie (ácido en forma aniónica y amina protonada, i.e., forma zwitteriónica), predomina en valores intermedios a los dos valores de pKa. La última especie (carboxilato y amina neutra) predomina a valores de pH superiores a 9.42. De estas especies, son relevantes las primeras dos ya que son las que se generan durante el tránsito del fármaco en el tracto gastrointestinal. Cabe señalar que estas especies en solución determinan la solubilidad dependiente del pH. La primer especie descrita presenta una mayor solubilidad que la especie zwitteriónica, tal como se ejemplifica en el diagrama mostrado en la Figura 29b. El diagrama utilizado corresponde a un estudio realizado con ciprofloxacino, ya que ambos compuestos presentan un comportamiento muy similar en solución (Florence A. 2004). La mayor solubilidad observada a pH de 4.5 con respecto a pH 1.2 puede atribuirse al efecto del ión común (i.e., ión cloruro, presente en el sólido y en el medio de disolución). Sin embargo, la mayor solubilidad observada a pH 6.5 no es posible explicarla al momento, ya que no existió transformación de fase sólida, por lo que la solubilidad debería ser en teoría la misma que la determinada a pH de 4.5. Una posibilidad es que no se haya alcanzado el equilibrio durante la determinación de la solubilidad, ya que ese pH se encuentra muy cercano al valor de pKa y

probablemente también al valor de  $\text{pH}_{\text{max}}$  (pH de transición sólido-sólido entre la sal y el zwitterion). Este fenómeno se ha observado en estudios de solubilidad de diversas sales, tal como se muestra en el diagrama de la Figura 29c. Esta figura corresponde a el diagrama de solubilidad de la papaverina reportado por Serajuddin en el 2007. En este artículo se discute el comportamiento que algunas sales presentan cuando su solubilidad no sigue un comportamiento ideal con respecto al cambio en el pH. Esto ocurre por la asociación de las especies en el medio, por lo que se produce una solución supersaturada del fármaco. Estas desviaciones en la solubilidad ya han sido observadas con otros fármacos zwitterionicos con aminas presentes en su estructura (Bergstrom K. *et. al.*, 2004). Por lo tanto, esto puede estar ocurriendo con MoHCl. Sin embargo, se requieren de más estudios para comprobar qué es lo que ocasionó el cambio en la solubilidad del fármaco.

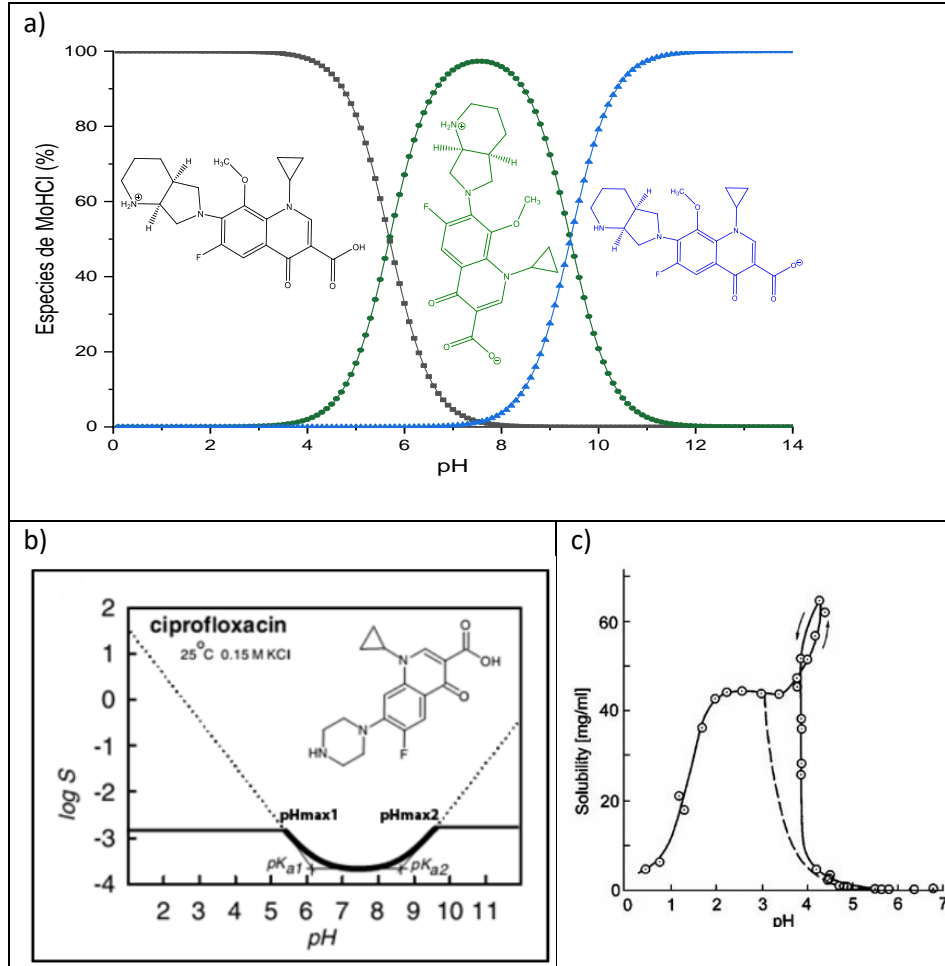


Figura 29 a) Diagrama de especiación de MoHCl, utilizado para ilustrar como cambian las especies presentes en el medio de disolución conforme cambia el pH de este; b) Diagrama de solubilidad de las diferentes especies existentes en solución para ciprofloxacino -con un comportamiento semejante a MoHCl-, se observa como las formas ionizadas de la molécula presentan un mayor grado de solubilidad que la especie zwitterionica. (Modificado de Florence A. 2004); y c) Estudio realizado sobre el cambio en solubilidad del clorhidrato de papaverina en un rango de pH de 1 a 7, donde se observa la supersaturación cerca del  $pH_{max}$  y el efecto del ion común en un pH bajo. La línea punteada muestra el perfil de solubilidad teórico que se determinó basándose en la solubilidad intrínseca del fármaco neutro y su  $pK_a$ , la desviación positiva indica una agregación del sólido. (Modificado de Serajuddin A., 2007).

#### 8.4.4 Pruebas de disolución intrínseca

En la Figura 30 se presenta la comparación de los perfiles de disolución intrínseca entre las NFS y MoHCl. Las constantes de disolución intrínseca calculadas se muestran en la Tabla 5. En el caso del medio de HCl (Figura 30a), se observó que los tres sólidos presentaron una cinética lineal. MoHCl-DLMA demostró una mayor constante de disolución en comparación con el valor obtenido de MoHCl (2.09 mg/cm<sup>2</sup>\*min y 1.85 mg/cm<sup>2</sup>\*min, respectivamente). En cambio, MoHCl-24DBA disminuyó la constante de disolución a 0.49 mg/cm<sup>2</sup>\*min.

*Tabla 5 Resumen de los resultados obtenidos de las pruebas biofarmacéuticas de MoHCl y las NFS en los diferentes medios empleados a 37°C. n=3, ±DE.*

Fase sólida	Constante de disolución intrínseca (mg/cm <sup>2</sup> min)			Solubilidad (mg/mL)		
	pH 1.2	pH 4.5	pH 6.5	pH 1.2	pH 4.5	pH 6.5
<b>MOHCL</b>	1.85±0.18	5.97±0.21	5.97±0.14	12.01±0.48	47.49±2.3	53.97±3.3
<b>MOHCL-DLMA</b>	2.09±0.13	7.64±1.5	6.2±0.16	12.9±0.89	12.1±0.9	11.92±0.98
<b>MOHCL-24DBA</b>	0.49±.05	6E <sup>-2</sup> ±8E <sup>-3</sup>	0.1±3E <sup>-3</sup>	7.51±0.23	3.28±0.15	0.15±0.09

En la Figura 30b se presentan los perfiles de disolución intrínseca de MoHCl y las NFS en medio de acetatos pH 4.5. Las velocidades de disolución de MoHCl, MoHCl-DLMA y MoHCl-24DBA fueron de 5.97 mg/cm<sup>2</sup>min, 7.64 mg/cm<sup>2</sup>min y 0.069 mg/cm<sup>2</sup>min, respectivamente. La tendencia en disolución fue similar a la observada en el medio de HCl, siguiendo el orden de MoHCl-DLMA > MoHCl > MoHCl-24DBA, aunque es de resaltar que la velocidad de disolución de MoHCl-24DBA fue 86 veces menor que la de MoHCl.

La disolución intrínseca en medio de fosfatos pH 6.5 se muestra en la Figura 30 – c. Se observó una pequeña diferencia entre la velocidad de disolución de MoHCl y MoHCl-DLMA. El cocrystal MoHCl-24DBA se mantuvo como la fase de menor velocidad de disolución (0.10 mg/cm<sup>2</sup>min).

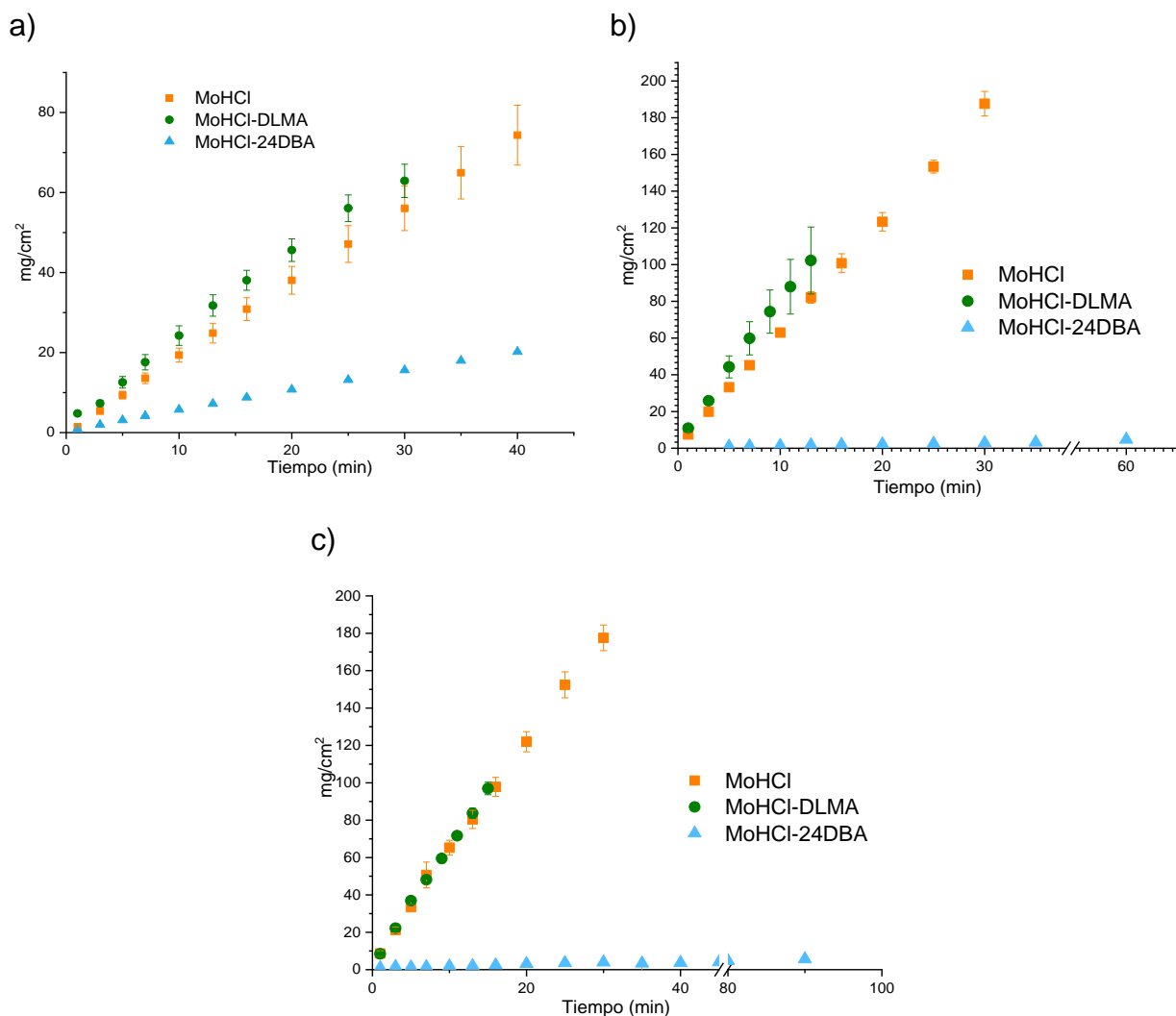


Figura 30 (a) Comparación del perfil de disolución intrínseca de MoHCl y las NFS en medio de pH 1.2, (b) en solución amortiguadora de pH 4.5 y (c) en solución amortiguadora de pH 6.5 Media  $\pm$  D.E. n=3. T = 37 °C.

Al término de los experimentos de disolución intrínseca, la cara del comprimido expuesto al medio de disolución se raspó para analizarlo por DRXP. El análisis de estos se muestra en la Figura 31. En el caso de MoHCl (Figura 31a), el patrón mostró diferencias en las intensidades de los picos, pero no se aprecia la aparición de picos nuevos. Esto indicó que la fase es estable en los tres medios de disolución. En el caso de los sólidos de MoHCl-DLMA (Figura 31b), el patrón observado corresponde al del cocrystal de partida. Este resultado es contradictorio con respecto a los resultados observados previamente en el análisis de los sólidos de solubilidad,

donde se observó transformación de fase de esta muestra. Una posibilidad por la cual no se observó la transformación de fase en la muestra de disolución es que se haya “raspado de más el comprimido”, por lo que predominó el patrón de difracción del cocrystal (que no estuvo en contacto con el medio de disolución) por encima del patrón de MoHCl (sólido que se transforma). En el caso del sólido analizado a partir de los pellets de MoHCl-24DBA (Figura 31c), solo se observó un nuevo patrón de difracción en el sólido a pH 4.5. Dicho patrón es similar al que se observó en el experimento de solubilidad a dicho pH, que corresponde a una fase de composición e identidad desconocida. A pH de 6.5 se observó el patrón del cocrystal de partida, aunque durante el estudio de solubilidad se confirmó que esta NFS sufrió transformación de fase en dicho medio. La razón por la cual no se observó dicha transformación puede deberse a un excesivo raspado durante la toma de muestra.

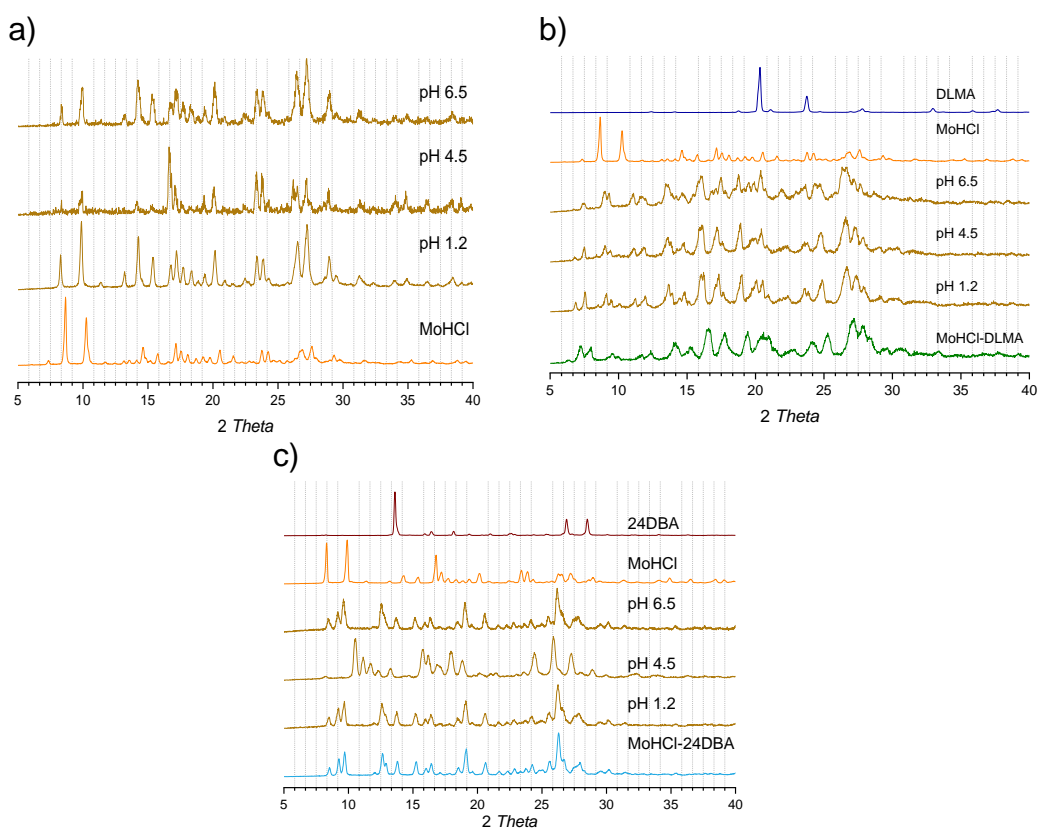


Figura 31. Análisis de DRXP-I de las muestras obtenidas de las pruebas de disolución intrínseca de MoHCl (a), MoHCl-DLMA (b), MoHCl-24DBA (c), realizadas en medio de disolución pH 1.2 a 37°C. Todas las muestras fueron obtenidas al término del experimento.

En general se observó que el perfil biofarmacéutico de MoHCl incrementa conforme aumenta el pH (su solubilidad y velocidad de disolución aumentan). En el caso de los cocristales es claro que el rendimiento biofarmacéutico del IFA es modificado considerablemente, particularmente con respecto a la fase de MoHCl-24DBA cuya disminución en solubilidad y disolución fue muy contrastante.

#### 8.4.5 Disolución de polvos

Los experimentos de disolución de polvos se realizaron bajo condiciones no-sink solamente en medio de HCl pH 1.2. Los estudios se realizaron sin replicas para optimizar recursos y poder mostrar solo el comportamiento en disolución. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de muestreo y se filtró con papel Whatman® # 3. El sólido se analizó por DRXP y el filtrado se diluyó apropiadamente para su cuantificación por UV-Vis.

En la Figura 32 se presentan los resultados de la prueba de disolución de polvos de las 3 fases sólidas. El perfil de MoHCl muestra que la concentración se mantiene constante durante todo el experimento (15 – 20 mg/mL). Por su parte, MoHCl-DLMA mostró valores cercanos a 40 mg/mL en los primeros minutos del experimento; posteriormente la concentración disminuyó a valores entre 30 y 35 mg/mL después de 20 minutos y se mantuvo sin cambios significativos hasta el final del experimento. En el caso de MoHCl-24DBA, las concentraciones alcanzadas fueron de aproximadamente 5 mg/mL durante prácticamente todo el experimento.

Debido a la gran cantidad de materia prima necesaria para este experimento, solo se realizó un ensayo. Los resultados de la prueba fueron incongruentes con los observados en las pruebas de solubilidad, ya que se alcanzan concentraciones mucho mayores que las reportadas al equilibrio de la reacción. Por lo tanto, se dedujo que el perfil observado no es concluyente y se requieren de más repeticiones para determinar el comportamiento en solución de estos cocristales.

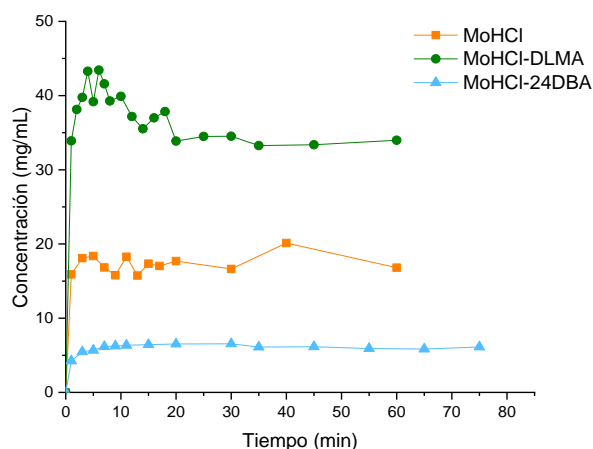


Figura 32 Prueba de disolución de polvos de MoHCl y las NFS en medio ácido pH 1.2.

Para las muestras obtenidas de la disolución de polvos de MoHCl se obtuvieron los difractogramas que se presentan en la Figura 33a. Solo se incluye el análisis de las muestras tomadas a los siguientes tiempos: 1, 9, 11, 15, 25, 30 y 60 minutos para fines comparativos. El patrón de DRXP se mostró inalterado, de forma similar a los observados durante la determinación de la solubilidad y disolución. En el caso de MoHCl-DMLA (Figura 33b), el patrón de DRXP correspondió al de MoHCl, debido a la transformación de fase mediada por el medio de disolución. Es importante señalar que, aunque la transformación de fase se observó de forma inmediata en el sólido (desde el minuto 1), el perfil de disolución mostró mayores concentraciones durante los primeros minutos en comparación a los valores observados a los últimos minutos del experimento. Esta supersaturación ha sido objeto de estudio en los últimos años en fases sólidas que sufren transformación de fase mediadas por el medio de disolución. Ejemplos de estas son las fases amorfas y fases cocrystalinas. Si se prolonga la supersaturación producida por la transformación de fase durante un tiempo considerable puede conferir una ventaja significativa en biodisponibilidad (Kuminek G., *et. al.*, 2016).



En el caso de MoHCl-24DBA (Figura 33c) no se observaron cambios en el patrón de difracción, lo que indicó que el sólido no sufre una transformación de fase al ser expuesto a medio de disolución de pH 1.2.

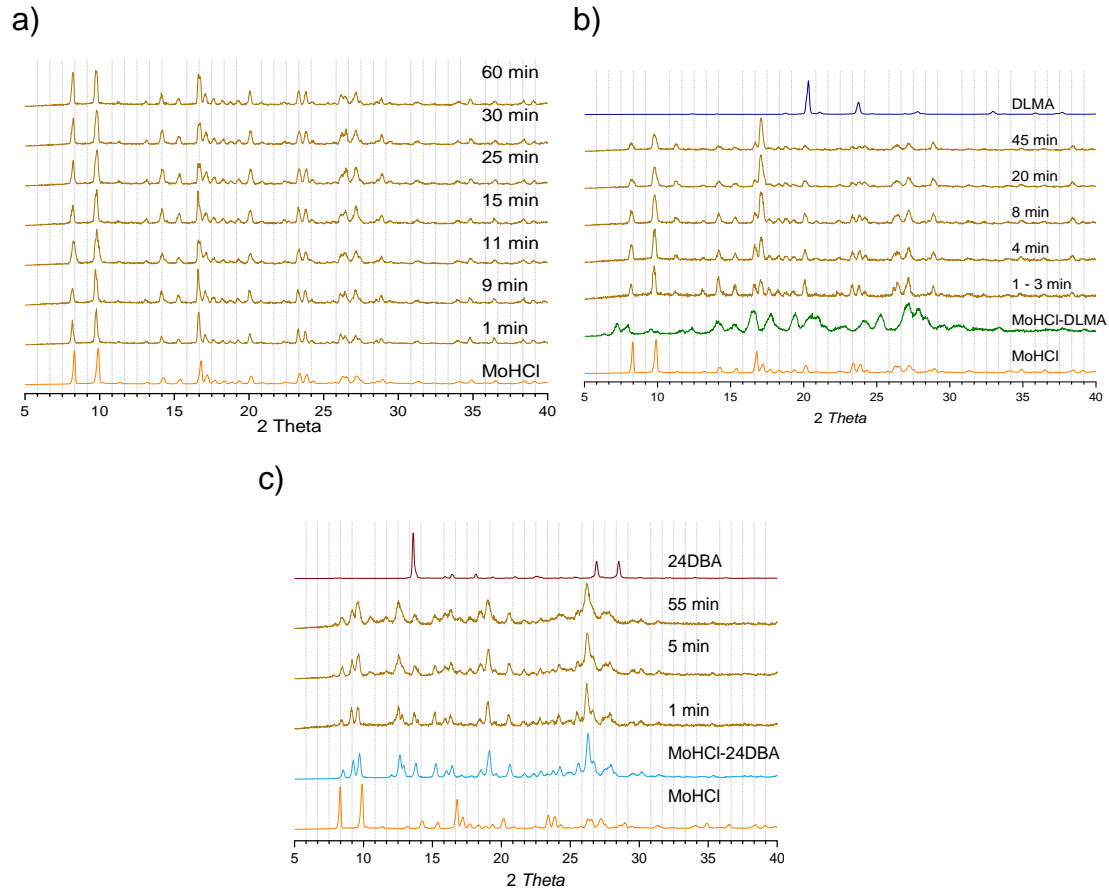


Figura 33 Análisis de DRXP-I de las muestras obtenidas de las pruebas de disolución de polvos de MoHCl (a), MoHCl-DLMA (b), MoHCl-24DBA (c), realizadas en medio de disolución pH 1.2 a 37°C. Todas las muestras fueron obtenidas al término del experimento.

#### 8.4.6 Cuantificación del coformador 24DBA

La cuantificación del coformador en las pruebas de disolución fue objetivo que se consideró como una posibilidad a lo largo del proyecto. Esto con la finalidad de observar el comportamiento de ambas especies en solución y comparar su velocidad de disolución. A pesar de que se establecieron las condiciones y curvas de cuantificación del coformador DLMA, no se le pudo cuantificar. Esto se debió a que la concentración obtenida en las pruebas de disolución y solubilidad fue muy baja. Por lo que no fue posible detectar la presencia del coformador con el espectrofotómetro.

En el caso del coformador 24DBA ocurrió lo mismo en las pruebas de disolución y solubilidad. La concentración de esta molécula fue tan baja que no era posible discernir entre la señal de fármaco y coformador con el espectrofotómetro. Sin embargo, al analizar las muestras obtenidas de la prueba de disolución de polvos se pudo identificar la señal del coformador. Por lo tanto, se procedió a cuantificar al 24DBA en la prueba de disolución de polvos del cocrystal MoHCl-24DBA (Figura 34). Se observó que ambas moléculas comparten un perfil de disolución similar. Esto es lo esperado ya que el cocrystal se compone por fármaco:coformador en una proporción 1:1. Por lo tanto, al comparar la cantidad de moles disueltos en la solución de ambas moléculas, deberíamos obtener un valor muy similar. En este caso, se observa una ligera diferencia que puede estar siendo ocasionada por el tratamiento matemático de los datos. También, se debe considerar el efecto de la desviación estándar de los datos. La cual no se toma en consideración por que el ensayo de disolución de polvos sólo se realizó una vez.

El comportamiento observado en la Figura 34 demuestra la congruencia con la que se disuelven ambos fármaco:coformador en una prueba de disolución de polvos. Pudimos observar claramente como la concentración de ambas moléculas fluctúa de la misma forma. Esto es relevante ya que se han reportado muy pocos casos en los que se cuantifican ambos componentes del cocrystal de manera simultánea. Lo cual, nos ayuda a comprender mejor como interactúan ambos componentes en solución.

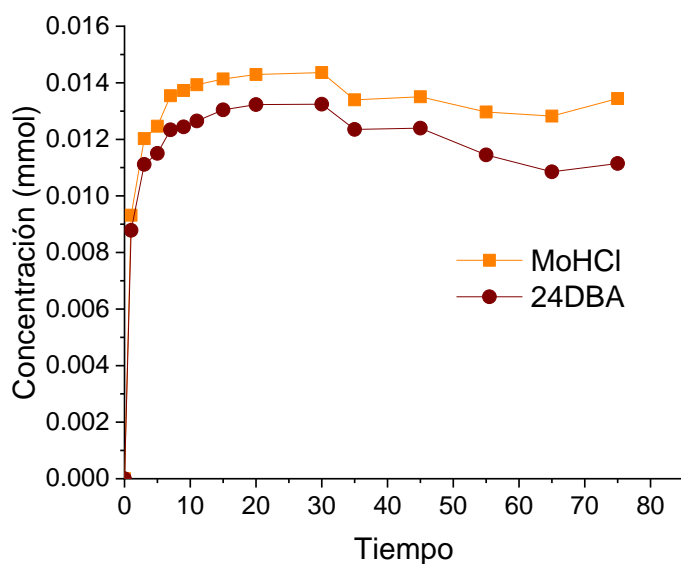


Figura 34 Cuantificación del coformador 24DBA en la prueba de disolución de polvos del cocrystal MoHCl-24DBA en medio de pH 1.2. n=1. 37°C.

## 8.5 Pruebas de estabilidad indicativa

La estabilidad indicativa se evaluó a 3 condiciones, variando la temperatura y humedad relativa a la cual se incuban las muestras. Las condiciones utilizadas se presentan en el capítulo 7.14.

Los polvos se prepararon de manera individual y por duplicado para cada prueba, se analizaron por DRXP una vez que fueron sometidos a las condiciones establecidas.

En la Figura 35a se presentan los análisis de estabilidad indicativa de MoHCl. Se observan los difractogramas de la materia prima y las 3 condiciones a las cuales se expusieron los sólidos. Se observó que MoHCl sufre una transformación cuando es expuesto a dos condiciones; 40°C y 40°C/75% HR. Se desconoce la NFS a la cual se transforma el sólido, por lo que se requieren estudios posteriores para identificarlo. MoHCl no sufrió una transformación de fase al ser expuesto a 50°C.

El patrón de DRXP de MoHCl-DLMA (Figura 35b) y MoHCl-24DBA (Figura 35c) se observaron sin cambios bajo las condiciones de estudio. Esto indicó que las fases sólidas no sufren una transformación de fase bajo las condiciones de estrés y humedad probadas.

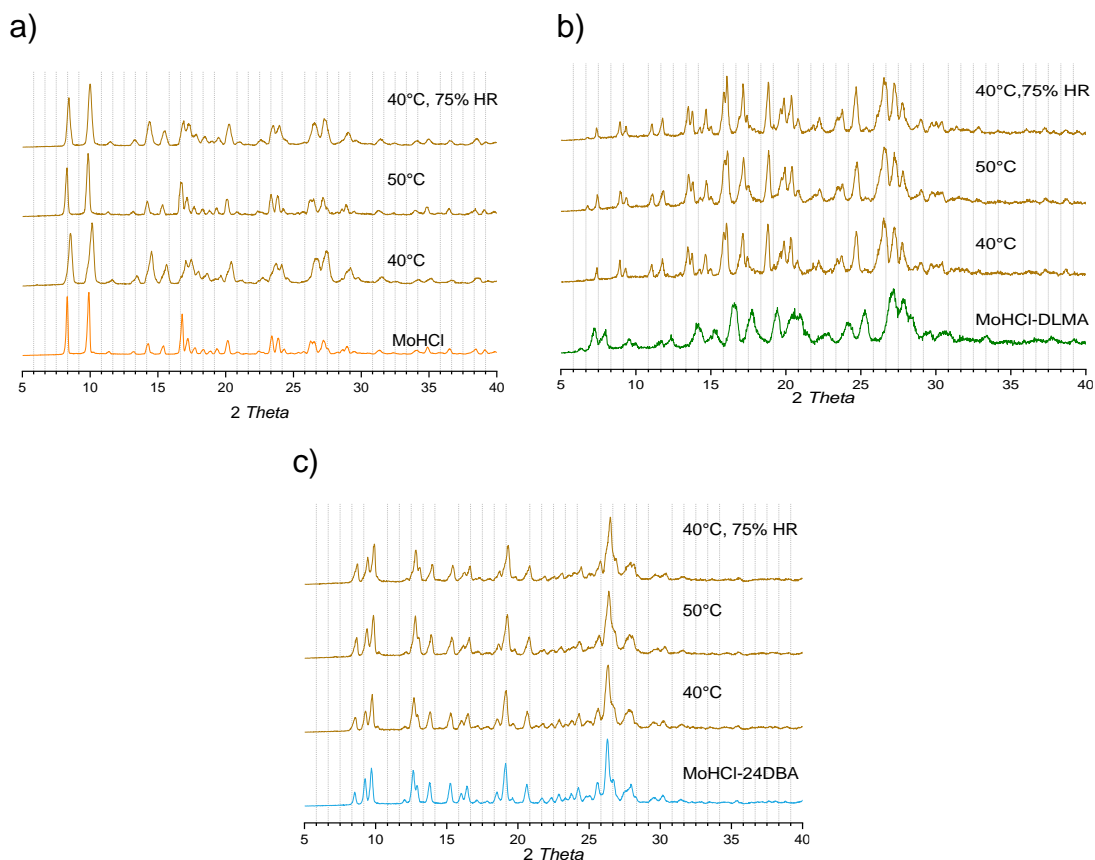


Figura 35 Pruebas de estabilidad indicativa por DRXP-I de MoHCl (a), cocrystal MoHCl-DLMA (b) y cocrystal MoHCl-24DBA (c).

## 8.6 Estudios de estabilidad de fase sólida en diferentes disolventes de relevancia farmacéutica.

Como complemento a las pruebas anteriores, se evaluó la posible transformación de fase por el contacto con disolventes. Se seleccionaron los disolventes utilizados durante la fase de cribado por la idoneidad de estos para interactuar con los conformadores y ocasionar una transformación de fase.

Los resultados de las pruebas complementarias de estabilidad de fase para MoHCl se presentan en la Figura 36a. La prueba con MeOH nos ayudó a confirmar que moxifloxacino sufre una transformación de fase a un hemihidrato. Esto se dedujo al comparar de manera visual el difractograma obtenido y los resultados reportados previamente (Martínez-Alejo et al., 2014).

En los difractogramas de las pruebas con metanol y agua se observaron cambios en los picos de MoHCl. En ambos casos, en la zona de  $25$  a  $30^\circ 2\theta$  se observó un aumento en la intensidad de los picos. En el caso de la prueba con etanol, se observó la modificación de los picos de  $5$  a  $10^\circ 2\theta$  esto implica que MoHCl sufre una transformación de fase al contacto con etanol. En cambio, el patrón de difracción que se obtuvo de la prueba con agua desionizada no sufrió modificaciones. Por lo tanto, se asume que MoHCl no sufre una transformación de fase por el contacto con agua desionizada.

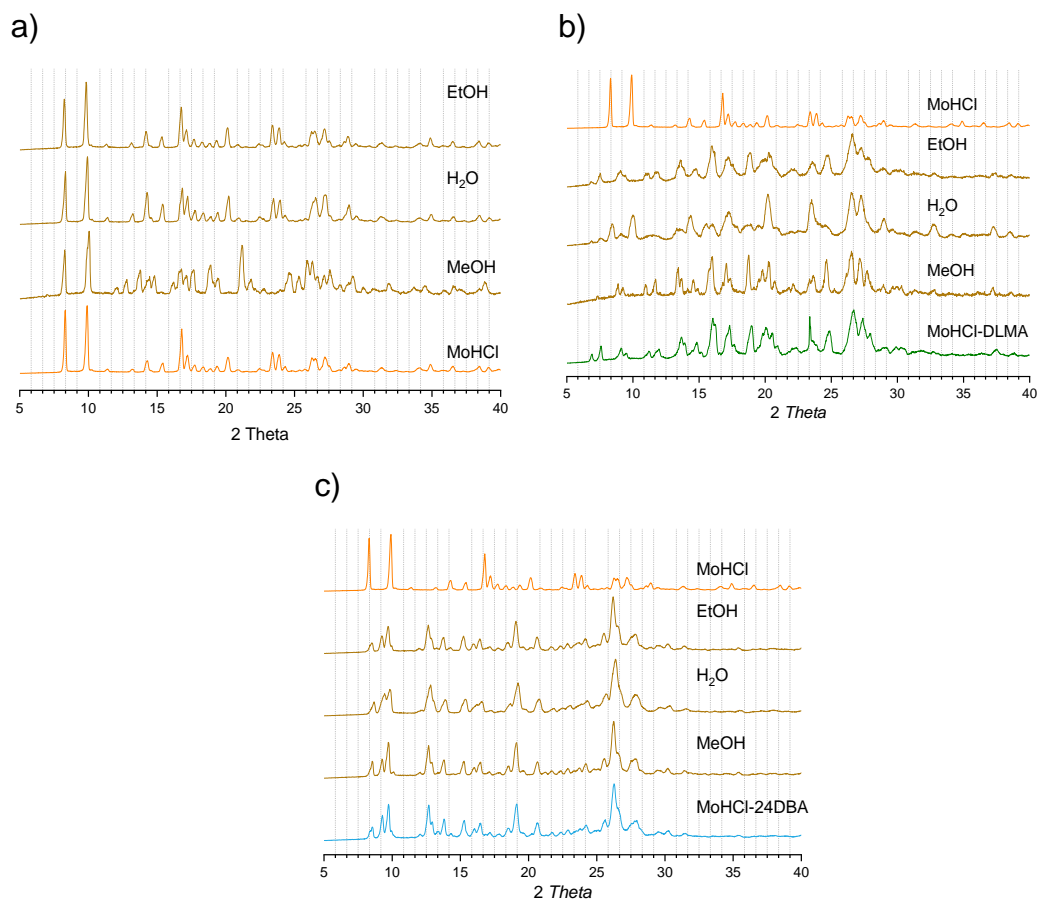


Figura 36 Pruebas complementarias de transformación de fase por DRXP-I de MoHCl (a), MoHCl:DLMA (b) y MoHCl:24DBA (c). Todas realizadas con MeOH, EtOH y H<sub>2</sub>O. Los sólidos fueron obtenidos después de 30 minutos de la RxS.

La prueba complementaria de estabilidad de fase para el cocrystal MoHCl-DLMA se presenta en la Figura 36b. En el caso de la prueba con MeOH, se observó la disminución en intensidad de algunos picos en la zona de 5 a 10° 2θ. Asimismo, en la zona de 20 a 30°2θ se observaron cambios en la intensidad de algunos picos. Debido a que no se observó la aparición de picos que correspondan a las materias primas, el cocrystal no sufre una transformación de fase al contacto con MeOH. Analizando la prueba con agua desionizada se observó la aparición de los picos característicos de MoHCl (5 a 10°2θ), indicando la transformación de fase del cocrystal a las materias primas.

Finalmente, el difractograma de la prueba con EtOH no presentó cambios que indiquen una transformación de fase. Por ello, se dedujo que el cocrystal MoHCl-DLMA mantiene su fase sólida al contacto con EtOH.

Los análisis de las pruebas complementarias con MoHCl-24DBA (Figura 36c), indicaron que no ocurre un cambio de fase cuando se expone a los disolventes utilizados. En este caso también se observó una mejoría en la estabilidad de fase en comparación con MoHCl (Figura 36a), el cual presentó polimorfismo al contacto con algunos disolventes.

## 8.7 Resumen de estabilidad de fase de MoHCl y los cocristales

Como se estableció en los objetivos específicos del proyecto, se evaluó el impacto de la cocrystalización sobre la estabilidad de fase de MoHCl. Para comprender mejor dichos resultados, se elaboró la siguiente tabla donde se resume lo obtenido en los diferentes estudios que abordaron esta característica. Se colocaron las condiciones evaluadas en la parte superior de esta y la fase sólida en la parte lateral izquierda. Para indicar que la fase no sufrió transformación al término de la prueba se utilizaron estrellas. Cuando la fase si presenta transformación, pero esta es una disociación a las materias primas de partida, se utiliza un triángulo y, cuando la fase presentó una posible transformación a una NFS diferente (e.g. hidrato) se utilizó un círculo.

Es importante mencionar que los resultados reportados a cada pH son de las muestras obtenidas de la prueba de solubilidad, estas se seleccionaron debido a que se obtuvo una buena cantidad de sólido para analizar y se realizó por triplicado.

Tabla 6 Resumen de los resultados de estabilidad de fase de MoHCl y cocristales bajo las condiciones evaluadas

Fase sólida	pH 1.2	pH 4.5	pH 6.5	MeOH	EtOH	H <sub>2</sub> O	40°	50°	40°-75HR
MoHCl	★	●	●	●	★	●	●	★	●
MoHCl-DLMA	▲	▲	▲	★	★	▲	●	●	●
MoHCl-24DBA	★	●	●	★	★	★	★	★	★

★ Sin transformación de fase     
▲ Transformación de fase a materias primas     
● Posible NFS

Analizando los resultados obtenidos de MoHCl se estableció que el fármaco mantiene estable su fase sólida solo en tres condiciones: En medio de disolución pH 1.2, en contacto con etanol y cuando se expone a 50°C sin humedad relativa. Bajo las demás condiciones evaluadas el fármaco sufrió una transformación de fase, lo cual puede deberse por un cambio químico (en las pruebas de estabilidad indicativa) o la generación de posibles NFS o polimorfos. Se considera necesario realizar análisis adicionales que permitan determinar la identidad de estos sólidos obtenidos.

En el caso del cocrystal MoHCl-DLMA observamos que en todas las pruebas que involucran contacto con un medio acuoso o humedad relativa, el sólido sufrió transformación de fase mediada por el disolvente, generando las materias primas de partida. En cambio, si las fases se someten a una temperatura de 40 o 50°C en el experimento, el sólido sufrió un cambio a una posible NFS. La fase sólida del cocrystal solo se mantuvo en todo momento cuando fue expuesta al contacto con metanol o etanol.

Con base en los resultados anteriores podemos establecer que la diferencia de comportamiento entre MoHCl y MoHCl-DLMA es que el último no sufre un cambio de fase al contacto con metanol.



En el caso del cocrystal MoHCl-24DBA se observó un comportamiento muy distinto al del fármaco. Este cocrystal mantuvo su fase sólida en casi todos los experimentos. Los resultados sugieren que el cambio en pH ocasiona que este cocrystal presente una transformación de fase mediada por el disolvente a una posible NFS, dicho efecto se obtuvo en las pruebas realizadas con medio acuoso de pH 4.5 y 6.5. Se desconoce la identidad de esta NFS sólida generada, por lo que también se requieren estudios adicionales para este cocrystal.

Los resultados obtenidos de MoHCl y MoHCl-24DBA demostraron claramente la modificación del comportamiento del fármaco ocasionado por la cocrystalización. El cocrystal no sufre un cambio de fase al contacto con disolventes o una temperatura y humedad relativa alta. Por lo tanto, la cocrystalización es un método por el cual se puede reducir la probabilidad de que un fármaco presente un cambio no deseado en la fase sólida.

Finalmente, se debe mencionar la diferencia en el comportamiento entre ambos cocrystalales, lo cual se debe solamente al tipo de coformador utilizado. Los resultados obtenidos por Martínez-Alejo en el 2014, resaltan la importancia en la selección de esta molécula cuando sintetizamos un cocrystal. En el artículo se reporta que la solubilidad y velocidad de disolución intrínseca de MoHCl aumentan al utilizar el coformador 4-HBA (Martínez-Alejo et al., 2014). En la presente investigación se encontró el efecto contrario. Una razón por la que esto puede haber ocurrido es por el empaquetamiento cristalino de los sólidos, el cual afecta el grado de solubilidad y velocidad de disolución de los cocrystalales. Bajo este panorama el empaquetamiento del cocrystal con el coformador DLMA mantiene un perfil biofarmacéutico similar al de MoHCl. Mientras que el empaquetamiento del cocrystal con 24DBA dificulta la interacción de los componentes con el medio de disolución.

## 9 CONCLUSIONES

Se caracterizaron cocristales de Clorhidrato de Moxifloxacino que fueron sintetizados con solo dos de los coformadores propuestos, el ácido DL-málico y el ácido 2,4-dihidroxibenzoico. Es importante mencionar que se requieren estudios posteriores a este proyecto para sintetizar el cocrystal con el ácido D-tartárico.

La técnica de formación de pasta nos permitió sintetizar ambos cocristales. Mientras que el escalamiento es posible por medio de molienda asistida por disolvente en una cantidad de 500 mg por contenedor. Los cocristales obtenidos presentan propiedades físicas y biofarmacéuticas modificadas con respecto a MoHCl. La fase MoHCl-DLMA presentó un aumento en la velocidad de disolución y la solubilidad de MoHCl, mientras que la fase MoHCl-24DBA las disminuyó. Las dos fases presentaron propiedades físicas distintas, lo cual se relaciona con el tipo de coformador utilizado.

Algunas observaciones adicionales para resaltar son:

- Se confirmó la síntesis de dos cocristales de MoHCl utilizando la misma proporción molar fármaco-coformador establecida anteriormente en el grupo de investigación. También, se descubrió que la RxS puede ser utilizada como técnica de cribado y que es posible escalar estos cocristales por medio de molienda mecanoquímica asistida con disolvente.
- Los resultados de la caracterización física de los cocristales sintetizados por medio de las técnicas establecidas, comprobó que la cocrystalización puede ser utilizada para manipular varias propiedades físicas del fármaco, como su punto de fusión, degradación térmica e higroscopicidad.
- Con los resultados obtenidos de las pruebas biofarmacéuticas se comprobó que la cocrystalización tiene potencial para ser utilizada como herramienta para adaptar el perfil biofarmacéutico de un fármaco a las

necesidades tecnológicas de la industria farmacéutica o terapéuticas que tenga el paciente. Sin embargo, el efecto que la cocrystalización tendrá sobre las propiedades de un fármaco no es predecible. Como se observó en el proyecto, los dos cocrystalales presentaron propiedades biofarmacéuticas distintas. Lo cual, nos reafirma la importancia que tiene el tipo de coformador y sus propiedades fisicoquímicas al momento de sintetizar un cocrystal.

- Las pruebas de transformación de fase demostraron que la cocrystalización es una herramienta útil para la modificación de la estabilidad de fase de un fármaco. Se observó que los cocrystalales se comportaban de manera particular con respecto a la presencia de temperatura, humedad y disolventes. Sin embargo, se requieren mayores pruebas para comprobar la posible generación de polimorfos de uno de los cocrystalales. Por lo tanto, si bien se percibe una tendencia a estabilizar al MoHCl cocrystalizado, no es posible todavía afirmar que la cocrystalización con DLMA o 24DBA evita la formación de fases polimórficas de MoHCl.

## **10 PERSPECTIVAS**

- Establecer las condiciones óptimas de síntesis y escalamiento del cocrystal MoHCl-DTA.
- Estudiar las condiciones a las cuales se pueden cristalizar las NFS sintetizadas, con la finalidad de obtener monocristales que faciliten la determinación del empaquetamiento cristalino para apoyar un análisis más detallado a los resultados obtenidos.
- Determinar la identidad de los sólidos en que se transformaron MoHCl-DLMA y MoHCl-24DBA durante los experimentos de solubilidad.

## 11 REFERENCIAS

- Aakeröy, C. (2015). Is there any point in making co-crystals?. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science, Crystal Engineering and Materials*, 71(4), 387-391.
- Al Omari, M. M., Jaafari, D. S., Al-Sou'od, K. A., & Badwan, A. A. (2014). Moxifloxacin hydrochloride. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* (Vol. 39, pp. 299-431). Academic Press.
- Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., & Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical research*, 12(3), 413-420.
- Babu, N. J., & Nangia, A. (2011). Solubility advantage of amorphous drugs and pharmaceutical cocrystals. *Crystal Growth & Design*, 11(7), 2662-2679.
- Bergstrom, K. Luthman, P. Artursson, Accuracy of calculated pH dependent aqueous solubility, *Eur. J. Pharm. Sci.* 22 (2004) 387–398.
- Biswas, S., Bose, P., & Kumar, Y. (2006). *U.S. Patent Application No. 10/533,246*. Caballero, E., Cardenas, E., Gurucharri, N., Rodrigo, A., & Honorato, J. (2000). Moxifloxacin. *Revista de medicina de la Universidad de Navarra*, 53-60.
- Chapman, O. L. (1963). Spectrometric Identification of Organic Compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 85(20), 3316-3316.
- Charsley, E. L., & Warrington, S. B. (Eds.). (1992). *Thermal analysis: techniques and applications* (Vol. 59). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Cruz, L. A., & Hall, R. (2005). Enantiomeric purity assay of moxifloxacin hydrochloride by capillary electrophoresis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 38(1), 8-13.
- Cui, Y. (2007). A material science perspective of pharmaceutical solids. *International*

- journal of pharmaceutics*, 339(1-2), 3-18.
- Cordoba Villalobos, J. A., & Arriola Peñalosa, M. A. (2011). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
- Dabir, T. O., Gaikar, V. G., Jayaraman, S., & Mukherjee, S. (2018). Thermodynamic modeling studies of aqueous solubility of caffeine, gallic acid and their cocrystal in the temperature range of 303 K–363 K. *Fluid Phase Equilibria*, 456, 65-76.
- Dann, S. E. (2000). *Reactions and characterization of solids* (Vol. 2). Inglaterra, Cambridge. Royal Society of Chemistry.
- Desiraju, G. R. (2003). Crystal engineering. From molecules to materials. *Journal of molecular structure*, 656(1-3), 5-15.
- Desiraju, G. R. (2007). Crystal engineering: a holistic view. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(44), 8342-8356.
- Dokoumetzidis, A., & Macheras, P. (2006). A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. *International journal of pharmaceutics*, 321(1-2), 1-11.
- Douroumis, D., Ross, S. A., & Nokhodchi, A. (2017). Advanced methodologies for cocrystal synthesis. *Advanced drug delivery reviews*, 117, 178-195.
- Duggirala, N. K., Perry, M. L., Almarsson, Ö., & Zaworotko, M. J. (2016). Pharmaceutical cocrystals: along the path to improved medicines. *Chemical communications*, 52(4), 640-655.
- Elder, D. P., Holm, R., & de Diego, H. L. (2013). Use of pharmaceutical salts and cocrystals to address the issue of poor solubility. *International journal of pharmaceutics*, 453(1), 88-100.
- Florence, A. T., & Attwood, D. (2015). *Physicochemical principles of pharmacy: In manufacture, formulation and clinical use*. Inglaterra, Cambridge. Pharmaceutical press.

- Forsingdal Harlei, T. Öbrink-Hansen, K., Hardlei, T. F., Brock, B., Jensen-Fangel, S., Thomsen, M. K., Petersen, E., & Kreilgaard, M. (2015). Moxifloxacin pharmacokinetic profile and efficacy evaluation in empiric treatment of community-acquired pneumonia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(4), 2398-2404.
- Gao, P. Dahan, A., & Miller, J. M. (2012). The solubility–permeability interplay and its implications in formulation design and development for poorly soluble drugs. *The AAPS journal*, 14(2), 244-251.
- Giron, D., Mutz, M., & Garnier, S. (2004). Solid-state of pharmaceutical compounds. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 77(2), 709-747.
- Gupta, K. R., Askarkar, S. S., Joshi, R. R., & Padole, Y. F. (2015). Solid state properties: Preparation and characterization. *Der Pharmacia Sinica*, 6(4), 45-64.
- Grunenberg, A., & Bosche, P. (1998). *U.S. Patent No. 5,849,752*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Hilfiker, R. (Ed.). (2006). *Polymorphism in the pharmaceutical industry* (Vol. 2, pp. 1-20). Weinheim: Wiley-Vch.
- Horosanskaia, E., Seidel-Morgenstern, A., & Lorenz, H. (2014). Investigation of drug polymorphism: Case of artemisinin. *Thermochimica Acta*, 578, 74-81.
- Issa, M. G., & Ferraz, H. G. (2011). Intrinsic dissolution as a tool for evaluating drug solubility in accordance with the biopharmaceutics classification system. *Dissolut. Technol*, 18(3), 6-11.
- Jalil, M. E. R., Baschini, M., & Sapag, K. (2015). Influence of pH and antibiotic solubility on the removal of ciprofloxacin from aqueous media using montmorillonite. *Applied Clay Science*, 114, 69-76.
- Jernberg, E., Moghaddam, A., & Moi, H. (2008). Azithromycin and moxifloxacin for microbiological cure of Mycoplasma genitalium infection: an open study. *International journal of STD & AIDS*, 19(10), 676-679.

- Júlio, T. A., Garcia, J. S., Bonfilio, R., Araújo, M. B. D., & Trevisan, G. G. (2015). Solid-state stability and solubility determination of crystalline forms of moxifloxacin hydrochloride. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(12), 5263-73.
- Kalinkova, G. N. (1999). Infrared spectroscopy in pharmacy. *Vibrational spectroscopy*, 19(2), 307-320.
- Karki, S., Friščić, T., Fábrián, L., Laity, P. R., Day, G. M., & Jones, W. (2009). Improving mechanical properties of crystalline solids by cocrystal formation: new compressible forms of paracetamol. *Advanced materials*, 21(38-39), 3905-3909.
- 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.
- Kuminek, G., Cao, F., da Rocha, A. B. D. O., Cardoso, S. G., & Rodríguez-Hornedo, N. (2016). Cocrystals to facilitate delivery of poorly soluble compounds beyond-rule-of-5. *Advanced drug delivery reviews*, 101, 143-166.
- Lerner, K. L., & Lerner, B. W. (2004). *Gale Encyclopedia of Science. Volume 6*. Gale.
- Lichtenstein, L., Heyde, M., & Freund, H. J. (2012). Crystalline-vitreous interface in two dimensional silica. *Physical Review Letters*, 109(10), 106101.
- Martinez, M. N., & Amidon, G. L. (2002). A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42(6), 620-643.
- Martínez-Alejo, J. M., Domínguez-Chávez, J. G., Rivera-Islas, J., Herrera-Ruiz, D., Höpfl, H., Morales-Rojas, H., & Senosiain, J. P. (2014). A twist in cocrystals of salts: changes in packing and chloride coordination lead to opposite trends in the biopharmaceutical performance of fluoroquinolone hydrochloride cocrystals. *Crystal growth & design*, 14(6), 3078-3095.
- Mehta, M. U., Uppoor, R. S., Conner, D. P., Seo, P., Vaidyanathan, J., Volpe, D. A.,

- ... & Mandula, H. (2017). Impact of the US FDA “Biopharmaceutics Classification System”(BCS) guidance on global drug development. *Molecular pharmaceutics*, 14(12), 4334-4338.
- Miller, D. (2008). Review of moxifloxacin hydrochloride ophthalmic solution in the treatment of bacterial eye infections. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)*, 2(1), 77.
- Newman, A., Wenslow, R. Solid form changes during drug development: good, bad, and ugly case studies. *AAPS Open* 2, 2 (2016).
- Orpen, A. G. (2002). Applications of the Cambridge Structural Database to molecular inorganic chemistry. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*, 58(3), 398-406.
- Qiao, N., Wang, K., Schlindwein, W., Davies, A., & Li, M. (2013). In situ monitoring of carbamazepine–nicotinamide cocrystal intrinsic dissolution behaviour. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 83(3), 415-426.
- Qiao, N., Li, M., Schlindwein, W., Malek, N., Davies, A., & Trappitt, G. (2011). Pharmaceutical cocrystals: an overview. *International journal of pharmaceutics*, 419(1-2), 1-11.
- Rodgers, J., Thibobeaux, D., Cui, X., Martin, V., Watson, M., & Knowlton, J. (2008). Instrumental and operational impacts on spectrophotometer color measurements. *The Journal of Cotton Science*, 12(1), 287–297.
- Rodríguez-Spong, B., Price, C. P., Jayasankar, A., Matzger, A. J., & Rodríguez Hornedo, N. (2004). General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. *Advanced drug delivery reviews*, 56(3), 241-274.
- Sadeek, S. A., El-Shwiniy, W. H., & El-Attar, M. S. (2011). Synthesis, characterization and antimicrobial investigation of some moxifloxacin metal complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular*



*Spectroscopy*, 84(1), 99-110.

- Sanphui, P., Devi, V. K., Clara, D., Malviya, N., Ganguly, S., & Desiraju, G. R. (2015). Cocrystals of hydrochlorothiazide: solubility and diffusion/permeability enhancements through drug-coformer interactions. *Molecular pharmaceutics*, 12(5), 1615-1622.
- Saravolatz, L. D., & Leggett, J. (2003). Gatifloxacin, gemifloxacin, and moxifloxacin: the role of 3 newer fluoroquinolones. *Clinical infectious diseases*, 37(9), 1210-1215.
- Sareen, S., Mathew, G., & Joseph, L. (2012). Improvement in solubility of poor water-soluble drugs by solid dispersion. *International journal of pharmaceutical investigation*, 2(1), 12.
- Sarma, B., Chen, J., Hsi, H. Y., & Myerson, A. S. (2011). Solid forms of pharmaceuticals: Polymorphs, salts and cocrystals. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28(2), 315-322.
- Serajuddin, A. T. (2007). Salt formation to improve drug solubility. *Advanced drug delivery reviews*, 59(7), 603-616.
- Schultheiss, N., & Newman, A. (2009). Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties. *Crystal growth and design*, 9(6), 2950-2967.
- Shan, N., & Zaworotko, M. J. (2008). The role of cocrystals in pharmaceutical science. *Drug discovery today*, 13(9-10), 440-446.
- Stass, H., Dalhoff, A., Kubitz, D., & Schühly, U. (1998). Pharmacokinetics, safety, and tolerability of ascending single doses of moxifloxacin, a new 8-methoxy quinolone, administered to healthy subjects. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(8), 2060-2065.
- Stroman, D. W., Dajcs, J. J., Cupp, G. A., & Schlech, B. A. (2005). In vitro and in vivo potency of moxifloxacin and moxifloxacin ophthalmic solution 0.5%, a new topical fluoroquinolone. *Survey of ophthalmology*, 50(6), S16-S31.

- Stuart, Barbara H. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. J. Australia, Sidney. Wiley & Sons.
- Sugano, K., Okazaki, A., Sugimoto, S., Tavornvipas, S., Omura, A., & Mano, T. (2007). Solubility and dissolution profile assessment in drug discovery. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 22(4), 225-254.
- Sullivan, J. T., Woodruff, M., Lettieri, J., Agarwal, V., Krol, G. J., Leese, P. T., ... & Heller, A. H. (1999). Pharmacokinetics of a once-daily oral dose of moxifloxacin (Bay 12-8039), a new enantiomerically pure 8-methoxy quinolone. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 43(11), 2793-2797.
- Vioglio, P. C., 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.
- Xu, W., Li, S., Whitely, N., & Pan, W. P. (2005). Fundamentals of TGA and SDT. *Thermal Analysis Laboratory, Materials Characterization Center*. Western Kentucky University, Bowling Green, Vol. 1, pp. 1-10.
- Yu, L. X., Amidon, G. L., Polli, J. E., Zhao, H., Mehta, M. U., Conner, D. P., ... & Hussain, A. S. (2002). Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharmaceutical research*, 19(7), 921-925.
- Yu, L., Reutzel, S. M., & Stephenson, G. A. (1998). Physical characterization of polymorphic drugs: an integrated characterization strategy. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1(3), 118-127.
- Yu Lawrence, X., Carlin, A. S., Amidon, G. L., & Hussain, A. S. (2004). Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *International journal of pharmaceutics*, 270(1-2), 221-227.
- Zur, M., Hanson, A. S., & Dahan, A. (2014). The complexity of intestinal permeability: Assigning the correct BCS classification through careful data interpretation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61, 11-17.

## 12. ANEXOS

### Anexo 1. Polimorfos de MoHCl

Tabla 7 Polimorfos de MoHCl, su síntesis y las técnicas utilizadas para su caracterización. Modificada de (Al Omari, Jaafari, Al-Sou'od, & Badwan, 2014).

Polimorfo	Preparación	Caracterización
Forma I (Forma cristalina del anhidro de MoHCl básico)	Se suspende el hidrocloruro de moxifloxacina y/o sus hidratos en un disolvente polar adecuado. El pH se ajusta en un rango de 7 - 8 con NaOH o NH <sub>4</sub> OH a 25-30°C. La mezcla de reacción se extrae con solventes de cloro o éster adecuados, el solvente es completamente destilado a presión reducida por debajo de 60°C. La mezcla de reacción se enfría a 25-35°C, el producto es tratado con un solvente orgánico adecuado como ceto solvente, el producto se aísla por filtración y opcionalmente se lava con agua, y luego se seca para obtener la forma I.	DRXP, FT-IR, DSC, microscópica.
Forma I (Anhidro cristalino).	La forma anhidra es la única modificación cristalina conocida en el estado de la técnica.	DRXP, DSC, TGA, <sup>13</sup> CNMR, Raman, FT-IR, microscópica.
Forma II (Monohidrato cristalino)	La forma anhidra se suspende en medio acuoso y se mantiene la agitación hasta que se hidrate. También se puede disolver en etanol con o sin presencia de agua. El agua se destila y el producto es secado en condiciones húmedas para obtener cristales de prisma o aguja.	DRXP, DSC, TGA, <sup>13</sup> CNMR, Raman, FT-IR, microscópica.
Hidrato cristalino	La forma anhidra cristalina o el monohidrato de MoHCl o una mezcla, se colocan en un ambiente con humedad controlada del 60% - 80% HR a 30°C por 18 y 16 h respectivamente.	DRXP
Amorfo	MoHCl cristalino se disuelve en un disolvente orgánico. Se somete a secado por aspersión y se continúa secando el producto.	DRXP, FT-IR

Forma A (cristalina)	MoHCl se suspende en un solvente orgánico, el cual es tratado con HCl seco. El producto se seca bajo condiciones controladas para obtener la forma A de MoHCl con un contenido de humedad del 2%.	DRXP, FT-IR, DSC.
Forma X (Anhidro cristalino)	MoHCl se somete a un reflujo azeotrópico en un disolvente orgánico. Se enfría, filtra y seca.	DRXP.
Forma Y (Anhidro cristalino)	MoHCl se disuelve en disolventes alcohólicos utilizando calor. Se ajusta el pH en un rango entre 7.5 y 8.5 con una solución acuosa alcalina. Se vuelve a ajustar el pH por debajo de 0.5 con HCl acuoso a una temperatura de <15°C. La reacción se mantiene por un periodo de 30 a 60 minutos. Se seca el producto.	DRXP.
Forma III (Anhidro cristalino)	MoHCl se somete a un reflujo azeotrópico con ésteres de cadena corta o un disolvente orgánico alifático o aromático. La reacción se enfría bajo agitación hasta la formación de un sólido cristalino. Se seca el sólido.	DRXP, DSC, TGA, <sup>13</sup> CNMR, Raman, FT-IR, microscópica.
Nueva forma cristalina	MoHCl se disuelve en una mezcla de MeOH/H <sub>2</sub> O con calentamiento y reflujo. Se agrega acetona y la solución se calienta a 40-45°C. Se enfría a 15-25°C, se filtra y se seca.	DRXP, FT-IR.
Forma cristalina de MoHCl base	MoHCl se suspende en medio acuoso de pH >11 ajustado con NaOH. La solución se lava con tolueno y se ajusta el pH a 8.0-8.2 con HCl. La reacción es extraída con cloruro de metileno y la fase orgánica se seca a presión reducida. El sólido obtenido se recrystaliza con acetonitrilo.	DRXP, DSC, TGA, <sup>13</sup> CNMR, Raman, FT-IR.
Forma A (Hidrato cristalino)	MoHCl se suspende en un disolvente seleccionado. Pueden ser mezclas de alcoholes con un contenido promedio de agua de 0.01% y 2.5% en peso. Se	DRXP, DSC, TGA, <sup>13</sup> CNMR, Raman, FT-IR.

	mantiene en reflujo, se enfría y se aísla la forma.	
Forma B (Anhidro cristalino)	El mismo procedimiento que la forma A, pero con la forma aislada se forma una pasta con un solvente alcohólico y reflujo. El producto tiene un contenido de humedad entre 0.01 y 2.5% del peso. La forma es aislada.	DRXP, DSC, TGA, <sup>13</sup> CNMR, Raman, FT-IR.
Forma IV (Anhidro cristalino)	MoHCl se disuelve un solvente orgánico, se enfría y mantiene por 2 horas la reacción. Se extrae el disolvente con vacío y el residuo se suspende de nuevo en el mismo disolvente. Se enfría la mezcla a 0-10°C. Los cristales formados se separan por filtración. Se lava y se seca el producto obtenido hasta obtener un peso constante.	DRXP, <sup>13</sup> CNMR, FT-IR.
Forma α1 (Hidrato cristalino)	MoHCl se suspende en una mezcla de agua y HCl concentrado. Se disuelve a una temperatura de 100°C y se enfría a 20°C. El sólido formado se filtra y lava con agua, se seca con presión reducida a 95°C. Se obtiene la forma con un contenido de agua de 3.64%.	DRXP, DSC
Forma α2 (Hidrato cristalino)	MoHCl se suspende en N-metil-2-pirrolidinona y agua a 130°C. Se enfría la mezcla a 20°C. El sólido obtenido se filtra, lava con acetona y seca a presión reducida a 60°C. Se obtiene la forma con un contenido de agua de 4.02%.	DRXP, DSC
Forma IV (monohidrato cristalino)	MoHCl se suspende en MeOH y agua. Se ajusta el pH a 1.0-2.0 con HCl concentrado a 25°C. Se enfría a 5°C. El sólido obtenido se filtra y seca a 60-65°C.	
Forma β (Monohidrato cristalino) y Forma γ (Anhidro cristalino)	Moxifloxacino básico es suspendido en una mezcla de metanol y agua. Se añaden HCl y EDTA, se calienta la mezcla a 34-38°C por 1 hora. Se enfría a 0-5°C por 1 hora. Se filtra y se lava con MeOH frío. El sólido se calienta de nuevo con metanol y	DRXP, DSC.

	<p>agua a 55°C para obtener una solución traslúcida. Se enfría lentamente a 40-45°C (20-25°C para la forma <math>\gamma</math>) se añade HCl (solo para la forma <math>\beta</math>). Se enfría lentamente a 0-5°C se mantiene por 1 h, se filtra y lava con metanol frío y agua tres veces (para forma <math>\gamma</math> solo con metanol). Se seca a 50-55°C por 2 horas (80-85°C para la forma <math>\gamma</math>). Se tamiza y seca el producto con vacío a 45°C por 30 horas (80°C y 36 h para la forma <math>\gamma</math>)</p>	
Forma F	<p>MoHCl se suspende en agua y etanol, se calienta a 75-85°C bajo agitación. Se filtra y se lava con etanol. Se agrega etanol por gotas al sólido a 70-80°C, se enfría lentamente a 20-30°C. Se cristaliza por 120 minutos, se filtra y se lava con etanol absoluto. Se añaden etanol absoluto y HCl al cristal húmedo. Se agita a una temperatura de 40-50°C por 1 a 2 horas. Se enfría a 10-20°C bajo agitación por 2 a 3 horas. Se lava con etanol absoluto, se seca por vacío para obtener un contenido de agua menor al 1%.</p>	DRXP, FT-IR. DSC, TGA
Hidrato cristalino	<p>MoHCl anhidro se disuelve en un disolvente orgánico mezclado con agua, se calienta a 50 – 150°C. El pH se ajusta a 1-2 y se mantiene bajo agitación por 5 a 60 minutos. Se deja enfriar para obtener cristales.</p>	DRXP.
Forma C (Cristalina)	<p>MoHCl se agita en presencia de MeOH y trietil amina a 25-30°C. La masa de la reacción se concentra parcialmente. Se añade más MeOH y el pH se ajusta a 1.0-2.0 utilizando HCl gaseoso en metanol a 20-25°C. El contenido es enfriado a 0-5°C y se mantiene por 2 horas. El sólido resultante se filtra y lava con MeOH. Se seca bajo vacío a 80-90°C.</p>	DRXP, FT-IR, Raman.

## Anexo 2. Análisis de DRXP de los polvos obtenidos de la RxC de MoHCl-DTA

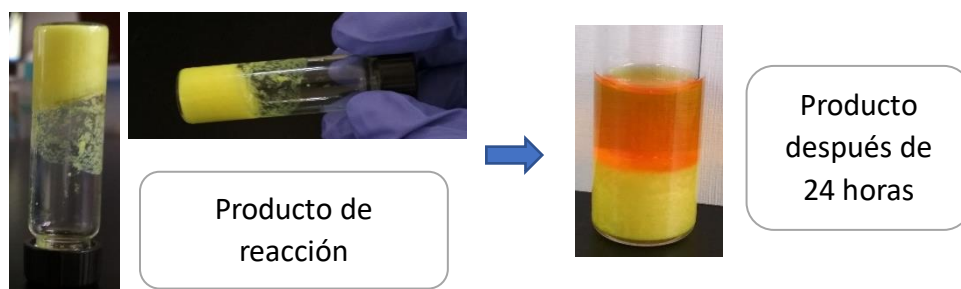


Figura 37 Sólido obtenido al final de la reacción cristalización de MoHCl-DTA. Se observó una consistencia parecida a un gel (derecha). Después de 24 horas el producto precipitó y se obtuvo un sobrenadante de coloración anaranjada (izquierda).

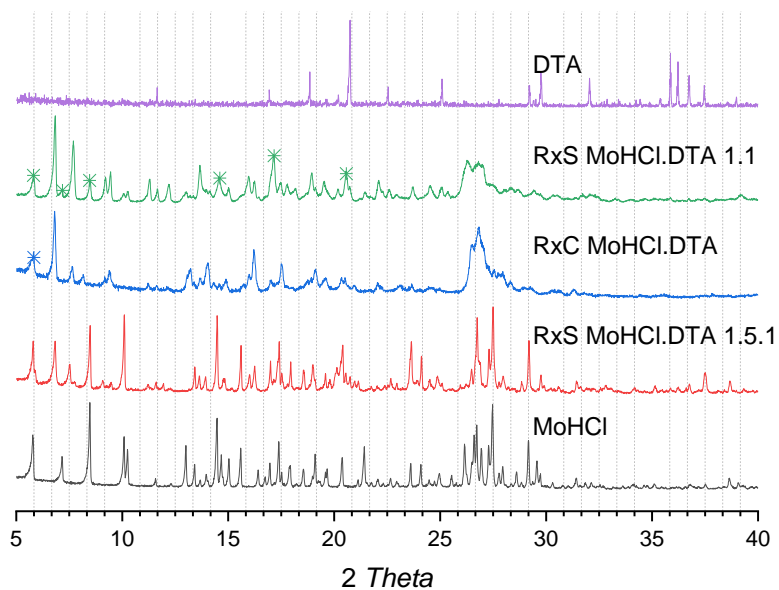


Figura 38 Comparación del análisis de DRXP de los sólidos obtenidos de la RxC y la RxS de MoHCl-DTA.

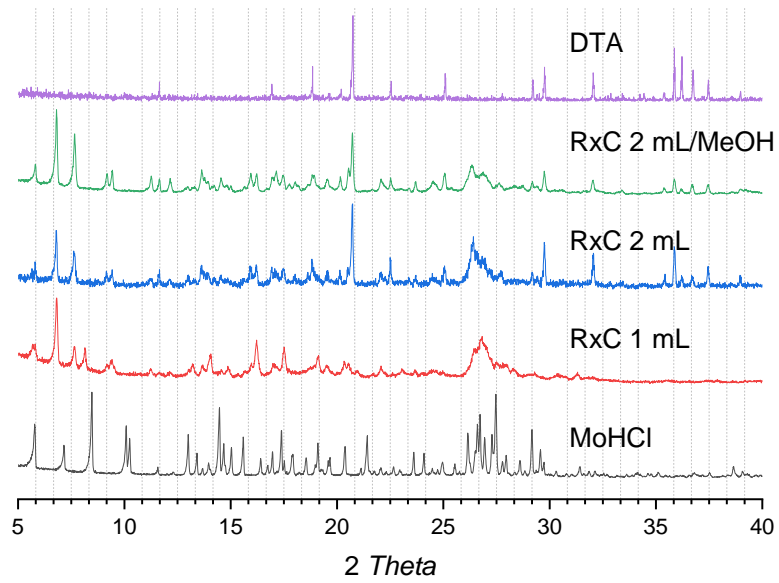


Figura 39 Comparación de los análisis de DRXP del sólido obtenido de la RxC de 1 mL, 2 mL y 2 mL con lavado de MeOH.