



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MORELOS  
FACULTAD DE FARMACIA



**“USO CONCOMITANTE DE COCRISTALES Y  
POLÍMEROS PARA MEJORAR EL DESEMPEÑO  
BIOFARMACÉUTICO DE TADALAFILO”**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN FARMACIA**

**PRESENTA:  
QFB. IRMA DELIA PÉREZ GUERRERO**

**CO-DIRECTORES DE TESIS  
DEA HERRERA RUIZ – FF UAEM (Co-tutor)  
HUGO MORALES ROJAS - CIQ UAEM (Co-tutor)**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**NOVIEMBRE 2020**



Este trabajo de tesis se desarrolló en el Laboratorio 2 de Farmacia Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la tutoría de la Dra. Dea Herrera Ruiz y en el Laboratorio 221 del Centro de Investigaciones Químicas bajo la tutoría del Dr. Hugo Morales Rojas.

**Se agradece a CONACyT por el proyecto de infraestructura  
INF-2015-251898 y la beca de Maestría  
2018-000012-01NACF-07886.**

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Dea Herrera y al Dr. Hugo Morales por abrirme las puertas a su grupo de investigación, a quienes sin su apoyo no hubiera sido posible realizar este trabajo.

Al Dr. Sergio Alcalá y al Dr. Herbert quienes fueron parte de mi comité asesor a lo largo de los años de la maestría, gracias siempre por sus valiosas aportaciones, tiempo y apoyo.

Al Dr. Ángel Herrera, Dr. José Luis Viveros, Dr. Sergio Alcalá, Dr. Julio Rivera y al Dr. Gabriel Navarrete, quienes forman parte de mi comité de jurado, por el tiempo otorgado a la lectura y revisión de mis tesis. Sus observaciones fueron de gran apoyo para la conclusión de este trabajo ¡Muchas gracias!

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

Un especial agradecimiento del Dr. Juan Martínez Alejo, quien fue de gran apoyo en la implementación del método de cuantificación por HPLC, quien siempre me motivó y me hizo pensar más allá de la caja. Que cumplas siempre tus objetivos en la vida.

A nuestros compañeros de doctorado del grupo de Investigación, Christian y Reynaldo, gracias por sus consejos, tiempo y apoyo durante mi estancia en el laboratorio ¡Les deseo el mejor de los éxitos!

A mi compañera de Laboratorio y Maestría, Flor Magali, quien además de ser mi amiga y confidente, me capacitó y me apoyo desde el primer día en el laboratorio. Magui espero y te deseo lo mejor siempre.

A Leo Romo, una de las grandes personas que conocí por medio del Laboratorio 2. Gracias por llenar mis días de pancitos, amor y la mejor compañía. Por motivarme a buscar siempre más allá y motivarme a emprender todo lo que me propusiera.

A mis compañeros con los que compartí seminarios, clases y mi estancia en el laboratorio, por haberse vuelto mi apoyo del día a día en Cuernavaca.

A mi amiga de la carrera ( y ahora de la vida) Amairani, quien me dio alojamiento y apoyo desde antes de iniciar la Maestría. Por ser mi compañera de súper, domingo familiar y ahora co-fundadora de “Mi Maestra Favorita” ¡Te deseo siempre lo mejor!

Muchas gracias todos los maestros que conocí en la Facultad y en la Universidad, tomando en cuenta los maestros de posgrado, de inglés, de francés y de tenis. Valoro mucho lo aprendido durante mis estancia en Cuernavaca.

¡Muchas gracias a mis padres! Siempre me dieron y me han dado su apoyo incondicional, y me impulsaron en la decisión de seguir estudiando un posgrado. Espero vean los frutos de todo su esfuerzo y guía con el paso de los años.

Muchas gracias a Dios por ser mi guía y luz en los momentos más oscuros.

Aparte de todo lo aprendido, espero con este proyecto seguir aprendiendo y formandome como profesional farmacéutico.

# ÍNDICE GENERAL

<b>1. Resumen .....</b>	<b>15</b>
<b>2. Abstract.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Introducción.....</b>	<b>17</b>
<b>4. Antecedentes.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Disfunción eréctil.....</b>	<b>18</b>
4.1.1 Tratamientos y rol de la fosfodiesterasa-5 (PDE-5) .....	19
4.1.2 Fármacos inhibidores de la PDE-5.....	21
<b>4.2 Tadalafilo .....</b>	<b>23</b>
4.2.1 Indicaciones terapéuticas.....	23
4.2.2 Propiedades fisicoquímicas de Tadalafilo. ....	24
<b>4.3 Clasificación Biofarmacéutica.....</b>	<b>25</b>
4.3.1 Permeabilidad de Tadalafilo.....	27
4.3.2 Solubilidad y velocidad de disolución de Tadalafilo. ....	28
<b>4.4 Sólidos Farmacéuticos.....</b>	<b>29</b>
4.4.1 Estado cristalino de Tadalafilo .....	32
4.4.1.1 Amorfización de Tadalafilo .....	33
<b>4.5 Cocristales.....</b>	<b>34</b>
4.5.1 Diseño de los cocristales.....	36
4.5.2 Selección de coformadores.....	37
4.5.2.1 Coformadores Nutracéuticos .....	42
4.5.3 Cribado de nuevas fases y síntesis de cocristales de Tadalafilo .....	44
4.5.3.1 Reacción de molienda mecano-química.....	46
4.5.4 Métodos generales de caracterización física y espectroscópica .....	48
4.5.4.1 Difracción de Rayos X .....	48

4.5.4.2	Análisis térmico (DSC y TGA) .....	50
4.5.4.3	Espectroscopía vibracional (Raman, IR) .....	52
<b>4.6</b>	<b>Propiedades biofarmacéuticas de Tadalafilo y las Nuevas Fases</b>	
	<b>Sólidas</b> .....	<b>53</b>
4.6.1	Supersaturación de las NFS cocrystalinas.....	54
4.6.2	Inhibición de la precipitación de NFS cocrystalinas .....	56
<b>5.</b>	<b>Justificación</b> .....	<b>61</b>
<b>6.</b>	<b>Hipótesis</b> .....	<b>62</b>
<b>7.</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>62</b>
7.1	Objetivo general.....	62
7.2	Objetivos específicos .....	62
<b>8.</b>	<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>64</b>
<b>8.1</b>	<b>Materiales</b> .....	<b>64</b>
8.1.1	Reactivos.....	64
8.1.2	Equipos .....	64
<b>8.2</b>	<b>Métodos</b> .....	<b>65</b>
8.2.1	Análisis estructural de Tadalafilo y coformadores.....	66
8.2.3	Síntesis de Nuevas Fases Sólidas de Tadalafilo .....	66
8.2.4	Caracterización .....	67
8.2.4.1	Difracción de Rayos X de Polvos .....	67
8.2.4.2	Espectroscopía Infrarroja.....	68
8.2.4.3	Análisis Térmico (DSC y TGA) .....	68
8.2.5	Escalamiento de cocrystalos farmacéuticos .....	68
8.2.6	Estudios de estabilidad de fase.....	69
8.2.7	Desarrollo y evaluación de un método de cuantificación de Tadalafilo por HPLC.....	70
8.2.8	Evaluación Biofarmacéutica.....	72
8.2.8.1	Estudio de solvent-shift para la selección de polímeros de prueba. ....	72

8.2.8.2 Disolución de Polvos .....	73
8.2.8.3 Solubilidad al equilibrio y aparente .....	74
<b>9. Resultados y Discusión .....</b>	<b>75</b>
<b>9.1 Análisis estructural de Tadalafilo.....</b>	<b>75</b>
<b>9.2 Síntesis de NFS de Tadalafilo.....</b>	<b>77</b>
<b>9.3 Caracterización de las NFS .....</b>	<b>84</b>
9.3.1 Caracterización por IR.....	84
9.3.2 Análisis Térmico: DSC y TGA .....	85
<b>9.4 Escalamiento.....</b>	<b>90</b>
<b>9.5 Estudios de estabilidad de fase .....</b>	<b>92</b>
9.5.1 Estabilidad de fase en estado sólido.....	92
9.5.2 Transformación de fase inducida por el disolvente .....	95
<b>9.6 Desarrollo del método de cuantificación por HPLC .....</b>	<b>100</b>
<b>9.7 Estudios biofarmacéuticos.....</b>	<b>101</b>
9.7.1 Estudios de <i>solvent shift</i> .....	101
9.7.2 Estudios de disolución de polvos y solubilidad .....	103
<b>10. Conclusiones .....</b>	<b>112</b>
<b>11. Perspectivas .....</b>	<b>114</b>
<b>12. Referencias .....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>127</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>128</b>
<b>ANEXO V .....</b>	<b>131</b>
<b>ANEXO VI .....</b>	<b>132</b>
<b>ANEXO VII .....</b>	<b>135</b>
<b>ANEXO VIII .....</b>	<b>136</b>
<b>ANEXO IX .....</b>	<b>137</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

– Figura 1. Cuerpo cavernoso del pene.....	18
– Figura 2. Diagrama esquemático del mecanismo de acción de los inhibidores de la PDE-5 (Wright, 2006). .....	21
– Figura 3 Estructura química de tadalafilo.....	24
– Figura 4. Estructuras químicas de estereoisómeros de Tadalafilo (Fejós et al., 2011). .....	25
– Figura 5. Efecto de la solubilidad y la permeabilidad en la absorción y biodisponibilidad, tras la administración oral de IFAs (Editada de Di y Kerns, 2015).....	26
– Figura 6. Clases de IFAs dentro del SCB basadas en su solubilidad y permeabilidad.....	27
– Figura 7. Formas en las que se puede clasificar el estado sólido; a) Forma cristalina, b) Forma amorfa. ....	30
– Figura 8. Patrón de difracción de Rayos X de Tadalafilo (polimorfo I). Condiciones: step 0.05°, rango 2-40 (DEG), velocidad 5.00 DEG/min. (Shlomit et al., 2006)β.....	32
– Figura 9. (a) Puente de hidrógeno en la estructura cristalina de TDF (IQUMAI). (b) Cadenas supramoleculares de TDF extendido en el eje b (Weyna et al., 2012). .....	33
– Figura 10. Sistema multicomponente de un cocrystal farmacéutico (Modificado de Bavishi y Borkhataria, 2016). ....	35
– Figura 11. Publicaciones de cocrystal del 2001 al 2018, con base en datos científicos PubMed (barras negras), y en la base de datos de la oficina de patentes y marcas de E.U.A. (barras blancas) (Kavanagh et al., 2019).....	36
– Figura 12. Mapa de interacciones alrededor de la conformación molecular de Sulfatiazol (Modificada de Wood et al., 2013). ....	37

– Figura 13. Homosintones y heterosintones más comunes en conjuntos supramoleculares (Bond, 2011). .....	38
– Figura 14. Sintones supramoleculares en cocristales farmacéuticos. (A) Homosinton de ácido carboxílico-ácido carboxílico en la aspirina; (B) Heterosinton de ácido carboxílico-nitrógeno en el cocrystal aspirina:meloxicam; (C) Heterosinton de ácido carboxílico-amida en el cocrystal de aspirina:carbamazepina (Almarsson et al., 2012). .....	39
– Figura 15. Estructuras cristalinas de los cocristales: a) TDF-Dmal y b)TDF-MOA (Carlos-Martínez, 2017; Shimpi et al., 2018). .....	42
– Figura 16. Estructuras clásicas de los nutracéuticos.....	44
– Figura 17. Proceso de cristalización a partir de una solución saturada (Modificada de Bernardes et al., 2014) .....	45
– Figura 18. Diagrama de la reacción de Slurry.....	46
– Figura 19. Diagrama de molienda mecano-química asistida con disolvente, A) Utilizando mortero con pistilo, B) Utilizando molino de bolas.....	47
– Figura 20. Representación esquemática de la difracción de rayos X.....	49
– Figura 21. Difractómetros de Rayos X de marca Bruker a) Polvos b) Monocristal. ....	50
– Figura 22. Termograma de DSC de Tadalafil (TDF); ácido malónico (MOA); y cocrystal TDF-MOA (Shimi et al., 2018) .....	51
– Figura 23. Termograma de DSC/TGA de cocrystal TDF-MOA, tomado de Shimpi et al., 2018. ....	52
– Figura 24. Representación esquemática del proceso de solubilización de un cocrystal (Roy et al., 2012).....	54
– Figura 25. Concepto spring-parachute para alcanzar la solubilidad de fármacos insolubles. (1) Forma cristalina poco soluble; (2) Cocrystal cuya solubilidad cae rápidamente; (3) Forma del fármaco soluble que se mantiene en la zona metaestable. ....	56
– <i>Figura 26. Disolución in vitro y concentración del plasma in vivo del IFA danazol y el cocrystal, mostrado A) sin formulación y B) formulado con 1% TPGS y 2% HPC (Childs et al., 2013).</i> .....	57

– Figura 27. Perfil de velocidad de disolución de diferentes formas sólidas de TDF en buffer de fosfatos pH 6.8. $\pm$ DE, n=3. Modificada de Shimpi <i>et al.</i> , 2018. ....	58
– <i>Figura 28. Perfiles</i> de disolución de TDF y cocrystal TDF-DMAL $\pm$ DE, en pH 1.6, utilizando una concentración de 0.5% de los polímeros a)PVP; b) HPC 370; c)MC. Tomado de la Tesis de Carlos-Martínez, 2017. ....	60
– Figura 29. Contenedores de acero inoxidable de Molino Restch <sup>®</sup> de capacidad de 100 mg. ....	67
– Figura 30. Portamuestra con acabado de fondo bajo utilizado para DRXP. ....	68
– Figura 31. Contenedores de acero inoxidable del Molino Restch. a) Capacidad de 1.5 mL, b) Capacidad de 5 mL. ....	69
– Figura 32. Celda de cuarzo con precipitado observado en punto de saturación de TDF, por método de solvent shift. ....	72
– Figura 33. Estación de reacción personalizada J-KEM <sup>®</sup> Scientific para prueba de disolución de polvos. ....	74
– Figura 34. Tadalafilo: a) Estructura que muestra el crecimiento cristalino; b) grupos formadores de puente de hidrógeno. (REFCODE IQUMAI). ....	75
– Figura 35. Patrones de DRXP correspondientes a Rsv, TDF y TDF-Rsv 1:1 bajo diferentes condiciones. ....	79
– Figura 36. Patrones de DRXP correspondientes a Cafeína, TDF y TDF-Caf 1:1 bajo diferentes condiciones. ....	80
– Figura 37. Patrones de DRXP correspondientes a Res, TDF y TDF-Res 1:1 bajo diferentes condiciones. ....	81
– Figura 38. Patrones de DRXP correspondientes a LPro, TDF y TDF-LPro 1:1 bajo diferentes condiciones. ....	81
– Figura 39. Patrones de DRXPs de diferentes relaciones molares de TDF-Res y las materias primas. ....	83
– Figura 40. Patrones de DRXP de diferentes relaciones molares de TDF-LPro y las materias primas. ....	83
– Figura 41. Espectros de IR de: a)TDF-Res y materias primas; b) TDF-LPro y materias primas. ....	84
– Figura 42. Termogramas de DSC y TGA de TDF-Res . ....	86

– Figura 43. Termogramas correspondientes a TDF-Res y materias de partida. a) DSC; b) TGA.....	87
– Figura 44. Termogramas correspondientes a TDF-Res y materias de partida.	88
– Figura 45. Termogramas correspondientes a TDF-LPro y materias de partida; a) DSC; b) TGA.....	89
– <i>Figura 46. Patrones de DRXPs correspondientes a TDF, Res, TDF-Res y su escalamiento</i> .....	91
– Figura 47. Patrones DRXPs correspondientes TDF, LPro, TDF-LPro y su escalamiento.....	91
– Figura 48. Patrones DRXPs correspondientes a los productos de estabilidad de: a) Tadalafilo (TDF); b) Resorcinol (Res).....	92
– Figura 49. Patrones de DRXPs correspondientes a los productos de estabilidad de TDF-Res. ....	93
– Figura 50. DRXPs correspondientes a los productos de estabilidad de: a) LPro; b) TDF-LPro.....	94
– Figura 51. Estudios de estabilidad de Fase de TDF: a) en solución de HCl, pH 1.6 (con Bruker D8-Advance) b) en solución de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 6.5 (con Bruker D2-Phaser).....	96
– Figura 52. Estudios de estabilidad de fase en solución de TDF-Res a) en solución de HCl, pH 1.6 b) en solución de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 6.5.....	97
– Figura 53. Estudios de estabilidad de fase en solución de TDF-LPro a) en solución de HCl, pH 1.6 b) en solución de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 6.5 ...	98
– Figura 54. Cromatograma correspondiente a Resorcinol ( $T_R = 1.6$ min) y Tadalafilo ( $T_R = 3.7$ min).....	100
– Figura 55. Determinación de punto de saturación de TDF sin y con el polímero Methocel A15 al 0.5%. ....	102
– Figura 56. Perfil de disolución de polvos en solución HCl (pH 1.6) (media $\pm$ DE) .....	103
– Figura 57. Perfil de disolución de polvos en buffer de fosfatos 1 M (pH 6.5) (media $\pm$ DE).....	104

- Figura 58. Perfil de disolución de polvos de TDF, TDF-Res y MF TDF-Res, con y sin polímero Methocel A15: a) en solución HCl 0.1 M pH 1.6 b) en buffer de fosfatos 0.1M pH 6.5 (media  $\pm$  DE)..... 105
- Figura 59. Perfil de disolución de polvos de TDF, TDF-LPro y MF TDF-LPro, con y sin polímero Methocel A15: a) en solución HCl 0.1 M pH 1.6 b) en buffer de fosfatos 0.1M pH 6.5 (media  $\pm$  DE)..... 106
- Figura 60. Promedio de ABC de TDF, TDF-LPro y TDF-Res en diferentes medios de disolución..... 108
- Figura 61. Patrones de DRXPs de TDF-Res obtenidos de la prueba de disolución de polvos con Methocel A15: a) pH 1.6, b) pH 6.5. .... 109
- Figura 62. Patrones de DRXPs de TDF-LPro obtenidos de la prueba de disolución de polvos con Methocel A15. a) pH 1.6, b) pH 6.5..... 110
- Figura 63. Solubilidad y solubilidad aparente de TDF y las NFS respectivamente, en diferentes medios de disolución, con y sin Methocel A-15 al 0.5%. (media  $\pm$  DE). .... 111

## Abreviaturas

**ABC**

Área bajo la curva

**Caf**

Cafeína

**CCDC**

Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge

**DAD**

Detector de arreglo de diodos

**DE**

Desviación estándar

**DRXP**

Difracción de Rayos X de Polvos

**DSC**

Calorimetría de Barrido Diferencial

**ED**

Disfunción eréctil

**HPC**

Hidroxipropil celulosa

**HPLC**

Cromatografía de líquidos de alta resolución

**HR**

Humedad Relativa

**IFA**

Ingrediente Farmacéutico Activo

**IR**

Infrarrojo

**LD**

Límite de detección

**LPro**

L-Prolina

**LQ**

Límite de cuantificación

**MA 15**

Methocel A15

**MeOH**

Metanol

**MF**

Mezcla Física

**NFS**

Nuevas Fases Sólidas

**NO**

Óxido Nítrico

**PBS**

Buffer de fosfatos

**PDE-E**

Fosfodiesterasa tipo 5

**Res**

Resorcinol

**RSV**

Resveratrol

**SA**

Ventaja en solubilidad

**SCB**

Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

**TDF**

Tadalafilo

**TGA**

Análisis termogravimétrico

**UV-Vis**

Espectrofotometría UV-Visible

# 1. Resumen

En esta tesis se buscó mejorar las propiedades biofarmacéuticas de tadalafilo (TDF) a través de la formación de nuevas fases sólidas (NFS), *cocristales*, y el uso de sistemas poliméricos. TDF es un ingrediente farmacéutico activo (IFA) utilizado como medicamento de primera línea para el tratamiento de la disfunción eréctil y la hipertensión arterial pulmonar, sin embargo, a pesar de su vida media larga y selectividad específica, es prácticamente insoluble, lo que ocasiona un  $T_{max}$  retardado y una absorción variable.

En este trabajo se demostró la formación de dos NFS de TDF usando los nutracéuticos resorcinol (Res) y L-prolina (LPro) como coformadores, caracterizándolas a través de diferentes técnicas (DRXP, IR, DSC y TGA). La evaluación biofarmacéutica de las fases mostró que las NFS obtenidas generan una solubilización muy rápida del IFA con su inmediata precipitación al primer minuto de prueba en los medios evaluados (pH 1.6 y 6.5). Para estabilizar la supersaturación de TDF en solución generada por las fases cocrystalinas, se empleó el polímero Methocel A15. Los perfiles de disolución en ausencia y presencia del polímero mostraron un incremento significativo en la concentración de TDF tras el uso del polímero en los sistemas cocrystalinos, con concentraciones hasta 30 veces mayores que las del fármaco de partida. Asimismo, se demostró que la formación del cocrystal es fundamental para el incremento de la solubilidad ya que las mezclas físicas tuvieron concentraciones disueltas menores.

Finalmente, con este trabajo de investigación se demostró que la cocrystalización de TDF, administrado junto con Methocel A15, modifica favorablemente las propiedades biofarmacéuticas de TDF en solución, manteniéndolo solubilizado por un tiempo adecuado para promover su adecuada absorción.

## 2. Abstract

This project sought to improve the biopharmaceutical properties of tadalafil (TDF), through the synthesis of new solid phases (NSP), *cocrystals*, and polymeric systems. TDF is an active pharmaceutical ingredient (API) used as first line treatment for erectile dysfunction and pulmonary arterial hypertension, however, despite its large half-life and specific selectivity, it is practically insoluble in water, which causes a delayed  $T_{max}$ .

This work showed the formation of two NSP of TDF, through the nutraceuticals resorcinol (Res) and *L*-proline (LPro) as cofomers, characterizing them through several techniques (DRXP, IR, DSC and TGA). The biopharmaceutical analysis of the NSP showed a very rapid solubilization of the API, followed by its precipitation since the first minute in the dissolution media (pH 1.6 and 6.5). For the stabilization of TDF supersaturation in solution, generated by the NSF, the polymer Methocel A15 was employed. The dissolution profiles studied showed a significantly improvement of TDF concentration when the dissolution media contained the polymer, with concentrations up to 30 times higher than the starting API. Likewise, it was demonstrated that the cocrystal is fundamental in the enhancement of the solubility, since the physical mixtures showed lower TDF concentrations

Finally, this investigation demonstrated that cocrystallization of TDF, in combination with Methocel A15 in the dissolution media, favorably modifies the biopharmaceutical properties of TDF, sustaining supersaturated concentrations of TDF enough time to improve its absorption.



### 3. Introducción

Tadalafilo (TDF) es ingrediente farmacéutico activo (IFA) inhibidor de la fosfodiesterasa-5 (PDE-5) utilizado para el tratamiento de la disfunción eréctil (ED) y la hipertensión pulmonar arterial. TDF es altamente selectivo y exhibe una semivida de hasta 36 horas (Weyna *et al.*, 2012), superior a la de los otros IFAs inhibidores de la PDE-5, *Sildenafil* y *Vardenafilo*. Sin embargo, TDF tarda aproximadamente de 0.5 a 6 h en alcanzar la concentración plasmática máxima ( $C_{\text{máx}}$ ), efecto no deseado para el tratamiento de la ED. El alto  $T_{\text{max}}$  que presenta TDF se debe a su baja solubilidad en agua (3.2  $\mu\text{g/mL}$ ) (Wlodarski *et al.*, 2015), puesto que al no estar disuelto el fármaco, no puede ser absorbido en el tracto gastrointestinal.

Debido a esto, diversas técnicas de formulación se han utilizado para mejorar la solubilidad de TDF, tales como las nanosuspensiones o formulaciones transdérmicas, con poco éxito reportado (Shimpi *et al.*, 2018). Recientemente, se ha demostrado que la modificación de la forma cristalina puede mejorar la solubilidad de los IFAs. TDF es un fármaco con grupos no ionizables y no es factible a formar sales como estrategia para mejorar su solubilidad, sin embargo los cocristales han surgido como una alternativa novedosa para la modificación del arreglo cristalino, a través de enlaces débiles, como enlaces de hidrógeno.

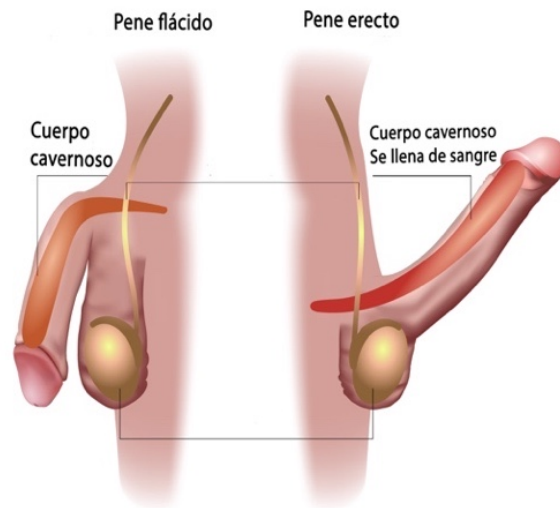
La formación de cocristales de TDF es factible utilizando moléculas pequeñas, llamadas coformadores. Se ha propuesto la síntesis de cocristales de TDF utilizando nutracéuticos como coformadores, debido a las ventajas en salud adicionales que pueden brindar. No obstante, la supersaturación que presentan los cocristales de TDF, cuando se disuelven en soluciones acuosas, es uno de los mayores retos en su formulación por la pronta precipitación al IFA. Por lo que se han propuesto estrategias para enfrentar esta problemática, como la adición polímeros en la solución que inhiben la pronta precipitación del cocrystal (Carlos-Martínez, 2017)

Por lo que el objetivo de este trabajo fue la modificación de la forma cristalina de TDF, mediante la formación de cocristales, y el uso concomitante de polímeros inhibidores de la precipitación, los cuales podrían ofrecer una alternativa prometedora para mejorar la solubilidad de TDF.

## 4. Antecedentes

### 4.1 Disfunción eréctil

La erección del pene es una función compleja que incluye una transformación del tejido eréctil y vascularización, pasando de un estado de flacidez con poca irrigación sanguínea a un estado de congestión altamente irrigado (Figura 1).



*Figura 1. Cuerpo cavernoso del pene*

En 1992, el Instituto Nacional de Salud de los E.U.A (NIH, por sus siglas en inglés) definió a la disfunción eréctil (ED) como la incapacidad de conseguir o mantener la erección del pene lo suficiente como para permitir una relación sexual satisfactoria (Montague *et al.*, 2005). La ED está clasificada como un padecimiento de naturaleza psicogénica, orgánica (*i.e.*, neurogénico, hormonal, arterial, cavernosal o inducido por fármacos) o una mezcla de ambas (Shamloul y Ghanem, 2013). No se debe confundir el término de ED con el de impotencia, ya que en la segunda hay trastornos en el libido, disfunción eyaculatoria y esterilidad (Rodríguez *et al.*, 2003); mientras que en la ED el deseo sexual y la capacidad de tener el orgasmo y eyacular se encuentran intactas (Montague *et al.*, 2005). Con el fin de descartar trastornos temporales, el problema debe tener una duración mínima de 3 meses, salvo en los casos de traumatismo o posquirúrgica.

Aproximadamente 150 millones de hombres a nivel mundial presentan ED, y debido al rápido crecimiento del padecimiento, se espera que dentro de 10 años la cifra aumente a 300 millones (Coward y Carson, 2008); datos del MMAS (Massachusetts Male Aging Study) en un estudio realizado a 1,290 varones entre 40 y 70 años, demostraron que la prevalencia de disfunción eréctil de cualquier grado era del 52%, etiquetándose de disfunción mínima el 17%, moderada el 25% y completa el 10% (Laumann *et al.*, 1999) (Sánchez *et al.*, 2002). Las causas de la ED relacionadas con la edad son las más citadas, incluyendo trastorno hormonal, diabetes, insuficiencia vascular, daño neuronal ocasionado por cirugía, efectos secundarios por fármacos y radiación, y factores psicogénicos. La ED es un padecimiento que afecta tanto a los pacientes como a sus parejas, teniendo como consecuencia un deterioro en su calidad de vida y en sus relaciones. (Curran y Keating, 2003). Aunado a esto, el incremento en el flujo de presión requerido para la erección es comparable con el requerido por el corazón para ejercicios vigorosos, por lo tanto, la disfunción eréctil puede ser análoga a la enfermedad cardíaca coronaria (Feldman *et al.*, 2000).

Por lo cual, la ED ha sido descrita como un problema de salud importante según el Panel de Conceso de los NIH, el cual identificó la necesidad urgente de una base de datos sobre la prevalencia, los factores determinantes y las consecuencias de este trastorno en la población (Laumann *et al.*, 1999). Diversos factores de riesgo han sido descritos para adultos jóvenes mexicanos, tales como diabetes mellitus, obesidad, fumar, hiperlipidemia, hipertensión y baja actividad física, con una prevalencia de ED del 33.7%, siendo en la mayoría de los casos moderada (Villeda-Sandoval *et al.*, 2015). Por lo cual el uso de tratamientos seguros y efectivos es una necesidad actual.

#### **4.1.1 Tratamientos y rol de la fosfodiesterasa-5 (PDE-5)**

Los objetivos de los tratamientos de la ED son restaurar la calidad de vida y permitir al paciente tener una vida sexual satisfactoria como la tenía anteriormente. En un inicio los tratamientos disponibles incluían: dispositivos de vacío, supositorios, fármacos inyectables, prótesis inflables implantadas por cirugía, y una amplia

variedad de remedios caseros. Sin embargo, estos eran invasivos, molestos y poco efectivos, por lo que el desarrollo de medicamentos orales revolucionó el tratamiento de la ED (Feldman *et al.*, 2000) (Selvin *et al.*, 2007). Estos no son invasivos, son fáciles de administrar, efectivos y bien tolerados, debido a esto la Organización Mundial de la Salud (OMS) los recomienda como tratamiento de primera elección (Wright, 2006).

Anteriormente, las opciones terapéuticas orales usadas para el tratamiento de la ED se basaban en fármacos de acción sobre el sistema nervioso central (SNC), como la apomorfina, los cuales han caído en desuso por su baja efectividad. Actualmente, los fármacos de inhibidores de la PDE-5 (fosfodiesterasa-5) son el tratamiento de primera línea de elección, debido a que tienen un impacto en la fisiología de la erección del pene.

La erección inicia con un estímulo sexual el cual libera óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés), un neurotransmisor en estado gaseoso, que actúa como el principal mediador. El NO atraviesa la membrana celular de forma pasiva, y activa a la guanidil ciclasa soluble (sGC), la enzima que convierte el guanosín trifosfato (GTP) a guanosín monofosfato cíclico (cGMP). El aumento en la concentración de cGMP activa a la proteína kinasa G que, a través de la fosforilación de los canales iónicos, abre los canales de potasio e inhibe los canales de calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) (Wright, 2006). La disminución en la concentración de calcio citosólico favorece la relajación del músculo liso, lo que ocasiona la dilatación de los vasos sanguíneos del cuerpo cavernoso del pene y por ende la erección. La PDE-5 tiene una alta afinidad con la cGMP y va ser responsable de su hidrólisis a 5'-GMP. Los inhibidores de la PDE-5 actúan al retardar la hidrólisis enzimática de cGMP, y por ende seguir la vía para la relajación del músculo liso (Rotella, 2002). Este proceso se puede observar en la figura 2.

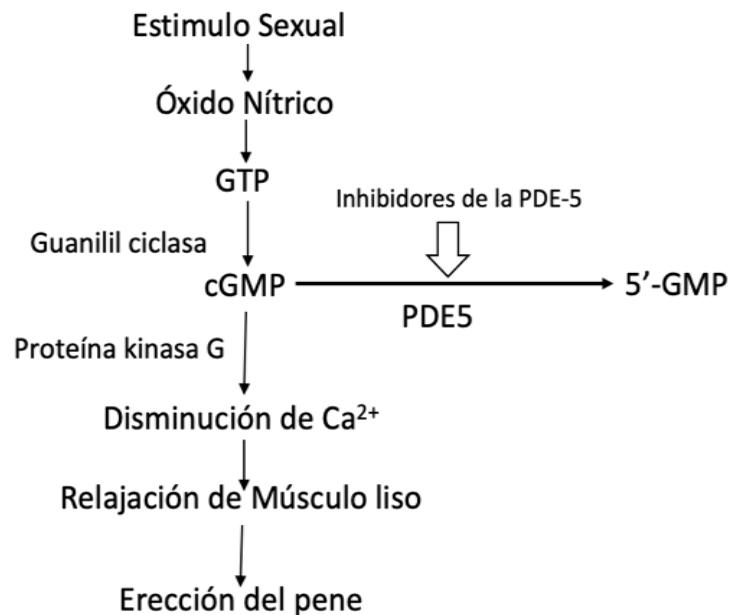


Figura 2. Diagrama esquemático del mecanismo de acción de los inhibidores de la PDE-5 (Wright, 2006).

#### 4.1.2 Fármacos inhibidores de la PDE-5

Los fármacos inhibidores de la PDE-5 comercializados hasta el momento son: sildenafil (Viagra®), vardenafilo (Levitra®) y tadalafilo (Cialis®) (Curran y Keating, 2003). Además, en algunos países se encuentran comercializados urdenafilo y mirodenafilo, y se encuentran en desarrollo avanafil, lodenafil y SLX-2101 (Eardley *et al.*, 2010). Los fármacos ya comercializados han demostrado ser efectivos y seguros, los efectos secundarios reportados se muestran en la Tabla 1, los cuales tienen una prevalencia alrededor del 1%, y son de leves a moderados (Wright, 2006).

**Tabla 1. Efectos secundarios comunes de fármacos inhibidores de la PDE-5 (Wright, 2006).**

<i>Sildenafil</i>	<i>Vardenafilo</i>	<i>Tadalafilo</i>
Dolor de cabeza	Rubor	Dolor de cabeza
Rubor	Dolor de cabeza	Dispepsia
Mareos	Dispepsia	Mareos
Dispepsia	Náusea	Rubor
Congestión Nasal	Mareos	Congestión Nasal
Problemas de visión	Visión borrosa	Dolor de espalda

Las anomalías en la visión es uno de los efectos secundarios más graves y prevalentes en sildenafil y vardenafilo, generando una visión azulada. Esto se debe a que inhiben la PDE-6, la cual es la responsable de la fototransducción en la retina, ocasionando la discapacidad para discriminar entre los colores azul y verde. Tadalafilo no inhibe a la PDE-6, debido a su alta selectividad por la PDE-5 (Coward y Carson, 2008).

Además, los inhibidores de la PDE-5 presentan diferentes parámetros farmacocinéticos (Tabla 2), tales como el tiempo (Tmax) que tardan en alcanzar su concentración plasmática máxima (Cmax) y su tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ). Cabe destacar que tadalafilo (TDF) presenta algunas ventajas en comparación con los demás fármacos inhibidores de la PDE-5. Tales como su administración en dosis menores, su mayor  $t_{1/2}$  (hasta 17.5 horas) y su alta selectividad para la PDE-5 ( $IC_{50}$  de 0.94 nm). Así mismo, la absorción de TDF no resulta alterada tras la ingesta de bebidas o alimentos (Morales y Chicharro, 2010). Por ende, TDF resalta y es un fármaco de interés para estudios posteriores, por la serie de ventajas que conlleva el uso de este IFA.

**Tabla 2. Comparación de los parámetros farmacocinéticos de los fármacos inhibidores de la PDE-5 (Gupta et al., 2005)**

Parámetro	Sildenafil	Vardenafilo	Tadalafilo
Dosis (mg)	25, 50, 100	5, 10, 20	5, 10, 20
Clase según SCB	1	2	2
Absorción oral (%)	92	ND	36
Tmax (h)	1 (0.5-2)	0.7 (0.25-3)	2 (0.5-6)
t <sub>1/2</sub> (h)	3-5	4-5	17.5
IC <sub>50</sub> por PDE-5 (nm)	3.9	0.1-0.7	0.94

\*ND: No definida

## 4.2 Tadalafilo

### 4.2.1 Indicaciones terapéuticas

Tadalafilo es un inhibidor de la PDE-5 del tipo  $\beta$ -carbolina con un anillo piperazinediona, el cual es análogo al de cGMP y permite la unión competitiva del fármaco con la PDE-5 en su sitio catalítico (Francis et al., 2001). Se comercializa bajo el nombre *Cialis* (Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, E.U.A.) y fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en el año 2003 para el tratamiento de la ED. En el año 2009 se aprobó bajo el nombre comercial *Adcirca*, para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar primaria, con una dosis por día de 20 mg. En el 2011 la FDA aprobó a *Cialis* para el tratamiento de los signos y síntomas de la hiperplasia prostática benigna. TDF se comercializa en forma de tabletas en dosis de 2.5, 5, 10 y 20 mg, para administración oral. TDF no está indicado para mujeres en ninguna de las dosis.

TDF ha demostrado ser seguro, bien tolerado y eficaz para el tratamiento de ED, en cualquiera de sus etapas, y cuando se ve acompañada de otras enfermedades, tal como la diabetes mellitus (Coward y Carson, 2008).

#### 4.2.2 Propiedades fisicoquímicas de Tadalafilo.

TDF tiene un punto de fusión alrededor de los 301-302 °C, una fórmula empírica de  $C_{22}H_{19}N_3O_4$  y un peso molecular de 389.41 g/mol. Presenta un punto de transición vítrea relativamente alto, de 147 °C, por lo que cristaliza fácilmente. Su nombre químico IUPAC es (6*R*,12*aR*)-6-(1,3-Benzodioxol-5-il)-2,3,6,7,12,12a-hexahidro-2-metilpirazino [1',2':1,6]-pirido [3,4-b]indol-1,4-diona. TDF (Figura 3) esta formado por los grupos: indol, 2,5 dicetopiperacina y benzodioxol; cabe resaltar que presenta cuatro grupos aceptores y un grupo donador de puente de hidrógeno.

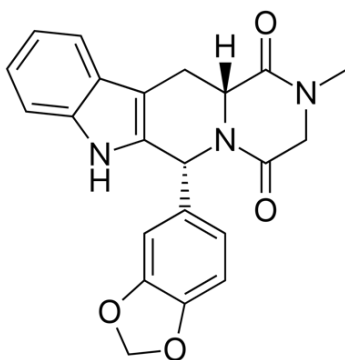


Figura 3 Estructura química de tadalafilo

TDF es una molécula con dos centros quirales (C6 y C12a), por lo cual se pueden encontrar 4 estereoisómeros (Figura 4) (Abdel-Aziz *et al*, 2011). No obstante, una de las rutas de la síntesis de Tadalafilo (Anexo I) es conducida por la reacción entre el clorhidrato de D-Triptófano metil éster con piperonal, en la cual se ve favorecida la formación del isómero *R,R* de TDF. Éste es el que muestra una mayor potencia inhibitoria de la PDE-5, y es el que se encuentra comercializado para aplicación terapéutica. El enantiómero *S,S* es inactivo, mientras que los compuestos *R,S* y *S,R* poseen potencia moderada.

Debido a esto, para la formulación segura de *Cialis* se deben realizar ensayos para demostrar la pureza óptica de TDF (Fejós *et al.*, 2011).



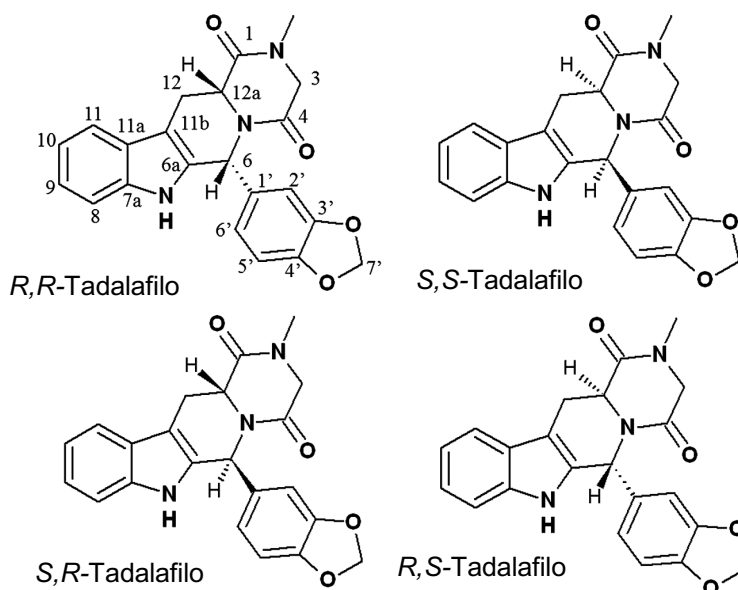


Figura 4. Estructuras químicas de estereoisómeros de Tadalafilo (Fejós et al., 2011).

Por otra parte, TDF tiene un valor de  $pK_a$  estimado de 15.17, es un fármaco que se mantiene neutro en los pHs fisiológicos (1.2-6.8) debido a que sus grupos funcionales no son ionizados (Shimpi *et al.*, 2018). Cabe destacar, que sólo el 5% de los IFAs comercializados son no ionizables, mientras que el 20 y 75% son ácidos y básicos, respectivamente (Di y Kerns, 2015). El  $pK_a$  es un factor influyente en la solubilidad y permeabilidad de los IFAs, ya que los fármacos no ionizables en medios acuosos, como TDF, suelen ser poco solubles en medios acuosos, pero presentar buena permeabilidad intestinal. Propiedades que son atribuidas a la apolaridad de la molécula.

La permeabilidad y la solubilidad son propiedades claves para la absorción y distribución de los fármacos sólidos. Debido a esto, se encuentra el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB), el cual clasifica a los IFAs de acuerdo en su solubilidad y permeabilidad.

### 4.3 Clasificación Biofarmacéutica

El SCB fue propuesto por primera vez en 1995, por Amidon y colaboradores, y desde entonces se ha vuelto un punto de referencia confiable en la clasificación

de fármacos sólidos, administrados en formas farmacéuticas sólidas por la vía oral (Sachan *et al.*, 2014). En la figura 5 se observan los pasos posteriores a la administración oral del fármaco, en los cuales la solubilidad y la permeabilidad juegan un papel clave para alcanzar la distribución plasmática del IFA.

Debido a que la solubilidad y permeabilidad impactan en la velocidad y grado de absorción del fármaco, el SCB ideó 4 clases para ordenar a los fármacos de acuerdo a estas propiedades (Figura 6) (Sachan *et al.*, 2014).

En la clase I pertenecen los IFAs con alta solubilidad y permeabilidad, los IFAs ideales, generalmente bien absorbidos. En la clase II, se encuentran los IFAs con buena permeabilidad pero baja solubilidad, en los cuales se busca mejorar la formulación para incrementar su solubilidad. Los IFAs clase III presentan buena solubilidad pero baja permeabilidad, y por lo general se utilizan a los pro-fármacos como estrategia para mejorar la permeabilidad. Por último se encuentra la clase IV, en la cual los IFAs tienen baja solubilidad y permeabilidad, trayendo consigo una mala biodisponibilidad y riesgos en eficacia y costos (Nainar *et al.*, 2012).

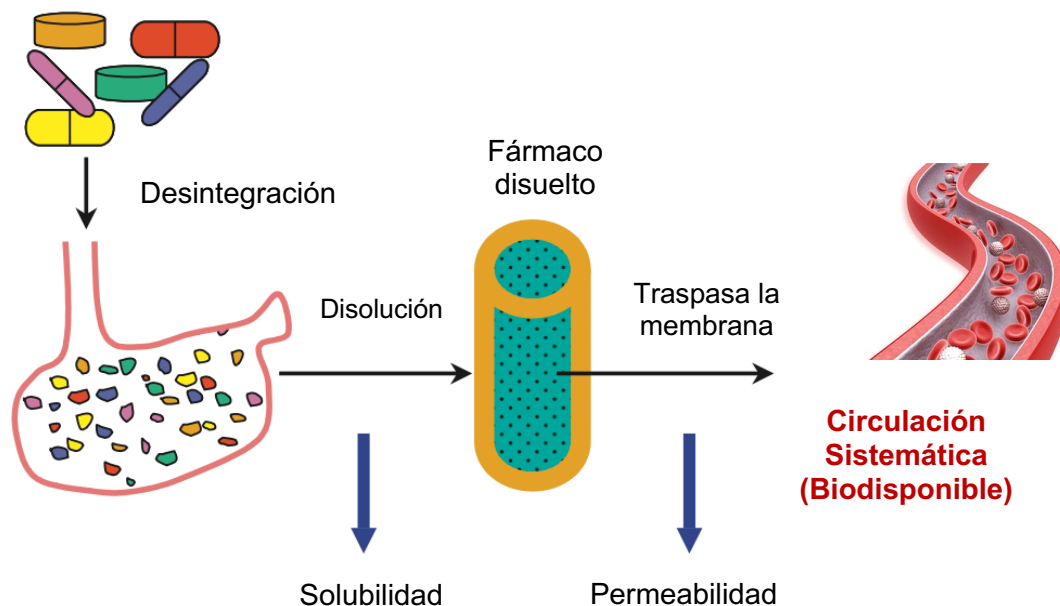


Figura 5. Efecto de la solubilidad y la permeabilidad en la absorción y biodisponibilidad, tras la administración oral de IFAs (Editada de Di y Kerns, 2015)

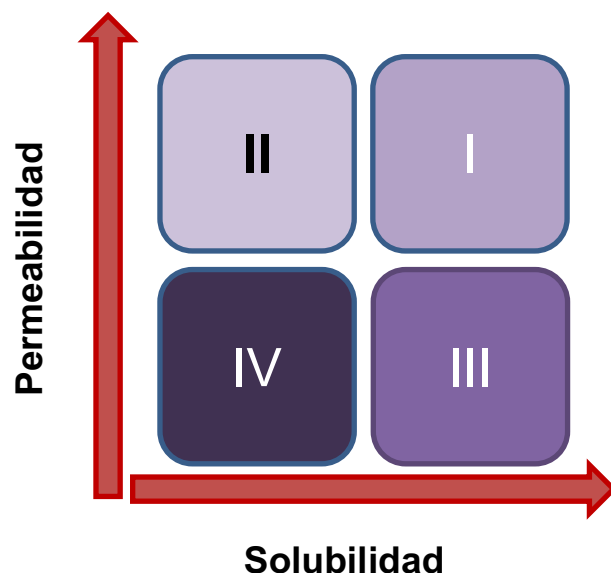


Figura 6. Clases de IFAs dentro del SCB basadas en su solubilidad y permeabilidad.

Actualmente un gran número de moléculas descubiertas pertenecen a las clases II y IV del SCB, debido a su baja solubilidad. Se estima que aproximadamente el 40% de los fármacos comercializados y 75% de las sustancias en desarrollo, están comercializados como prácticamente insolubles en agua (Di *et al.*, 2009). Entre estos se encuentra Tadalafilo, el cual es un fármaco clase II, prácticamente insoluble en agua pero que presenta una buena permeabilidad en membrana (El-Badry *et al.*, 2014).

#### 4.3.1 Permeabilidad de Tadalafilo

La permeabilidad es la medida de que tan rápido un compuesto se puede difundir a través de la membrana lipídica. Se utilizan varios métodos para evaluar la permeabilidad de los IFAs dentro del SCB, los cuales se basan en estudios *in vivo* o *in vitro* (Sachan *et al.*, 2014).

Para estimar la permeabilidad de TDF se ha tomado en cuenta su valor de logP, el cual nos indica la partición de un compuesto específico entre una fase orgánica/acuosa. Box y Comer reportaron en el año 2008 que IFAs con valores de LogP mayores a 1.2 generalmente presentan una buena permeabilidad y se pueden

agrupar en la clase II del SCB (Box y Comer, 2008). TDF tiene un LogP de 1.54 y se encuentra como clase II del SCB.

Así mismo se han realizado estudios *in vitro*, en células Caco-2, una línea derivada del carcinoma de colon humano ampliamente utilizada para la determinación de la permeabilidad. En el año 2018, Berben y colaboradores, estudiaron la permeabilidad de TDF en esta línea celular, utilizando un medio que simulaba el pH intestinal en ayuno (FaSSIF pH 6.5) a 37 °C. En este, se determinó que la permeabilidad de TDF es de  $19 \pm 3.1 \cdot 10^{-5}$  cm/segundo (Berben *et al.*, 2018), y por ende tiene una buena permeabilidad, de acuerdo a los valores establecidos en el SCB ( $P_{app} > 1 \cdot 10^{-5}$  cm/segundo) (Sachan *et al.*, 2014).

#### **4.3.2 Solubilidad y velocidad de disolución de Tadalafilo.**

La solubilidad y velocidad de disolución son factores clave en los dos primeros pasos de la farmacocinética (*LADME*) de los IFAs, *i.e.* liberación y absorción (Wlodarski *et al.*, 2014).

La solubilidad se define como la concentración máxima de un soluto disuelto en un solvente bajo condiciones controladas de temperatura y presión. Desde el punto de vista biofarmacéutico, el soluto es el IFA, y la solubilidad acuosa que presenten es una de sus propiedades fisicoquímicas primordiales (Bou-Chacra *et al.*, 2017). En los fármacos administrados por vía oral, a mayor solubilidad se produce una mayor concentración del IFA disuelto, disponible para su absorción intestinal. No obstante, la velocidad de disolución se define como la velocidad de transferencia del IFA sólido a moléculas libres disueltas en solución. Mientras que la solubilidad es cuanto se puede disolver un soluto, la velocidad de disolución es que tan rápido lo puede hacer.

Tadalafilo ha demostrado ser un fármaco prácticamente insoluble en agua, con una solubilidad determinada de 2-3µg/mL a 25 °C (Zalit y Pal, 2006). Lo cual se relaciona con una baja velocidad de disolución, y por ende un  $T_{max}$  de 0.5 hasta 6 horas (Shah *et al.*, 2013). Según lo establecido por el SCB, uno de los factores a considerar para que un IFA tenga una buena solubilidad, es que al menos el 85%

de la dosis del fármaco se disuelva en la primera media hora (Sachan *et al.*, 2014), condición que posiciona a TDF como clase II.

La solubilidad acuosa depende de dos factores: de la afinidad soluto-solvente y de las interacciones intermoleculares en el soluto; por lo que la baja solubilidad de TDF se puede atribuir a que es una molécula neutra, la cual, al no ser ionizada, difícilmente será disuelta en medios acuosos. Así mismo, TDF es un sólido que se encuentra en forma cristalina y presenta alto polimorfismo (Wlodarski *et al.*, 2014).

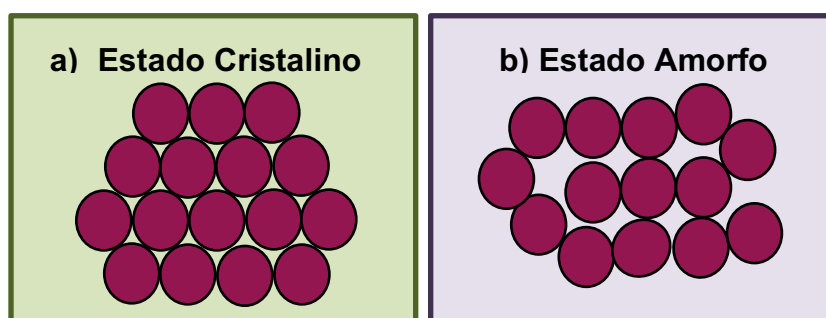
Por lo cual, las estrategias para mejorar la solubilidad de TDF se pueden dividir en dos grupos, basándose en la modificación de las interacciones soluto-disolvente (fármaco-disolvente) o en la modificación de interacciones intermoleculares en el estado sólido (*i.e.* polimorfos, sales y cocristales). Dentro del primer grupo, se han utilizado estrategias enfocadas en tecnología farmacéutica, tales como el uso de surfactantes, la formulación de nanosuspensiones y dispersiones sólidas, y la inclusión de TDF en complejos con  $\beta$ -ciclodextrinas (Miclaus *et al.*, 2015). Sin embargo estas no han tenido un éxito reportado hasta el momento. Por otra parte, las estrategias del segundo grupo, han surgido como una nueva aproximación, y están enfocadas en modificar el arreglo cristalino de TDF, a través de su amorfización o la formación de sólidos multicomponentes, *i.e.* *cocristales* (Wlodarski *et al.*, 2015).

Debido a esto es importante estudiar los tipos de sólidos farmacéuticos en los cuales se presentan los IFAs, especialmente TDF, debido a que el tipo de arreglo molecular que tengan va afectar a su solubilidad y velocidad de disolución (Healy *et al.*, 2017).

#### **4.4 Sólidos Farmacéuticos**

En las últimas décadas, la ingeniería de cristales ha ofrecido un amplio entendimiento en las interacciones supramoleculares de los sólidos, las cuales tienen un impacto en su arreglo cristalino y en sus propiedades fisicoquímicas (Almarsson *et al.*, 2012). Los IFAs son frecuentemente administrados en formas farmacéuticas sólidas por vía oral, debido a las ventajas que presentan (*i.e.* tabletas, cápsulas, etc.), en su manipulación y almacenamiento (Aakeröy, *et al.*, 2007). Los

IFAs pueden existir en diferentes formas sólidas, cristalinas o amorfas, lo cual impactará en sus interacciones intermoleculares, modificando su energía interna y entalpía. Los sólidos cristalinos (Figura 7a) siguen un patrón regular en la red cristalina, con un arreglo ordenado. Esta característica los vuelve fisicoquímicamente más estables y son idóneos para la síntesis controlada de los IFAs (Vioglio *et al.*, 2017). Por otra parte, los sólidos amorfos (Figura 7b) tienen una orientación molecular variada, por lo que suelen ser más solubles y tener una mejor velocidad de disolución (Healy *et al.*, 2017). Dependiendo de la forma en la que se encuentre el IFA, variarán sus propiedades fisicoquímicas y por ende biofarmacéuticas.



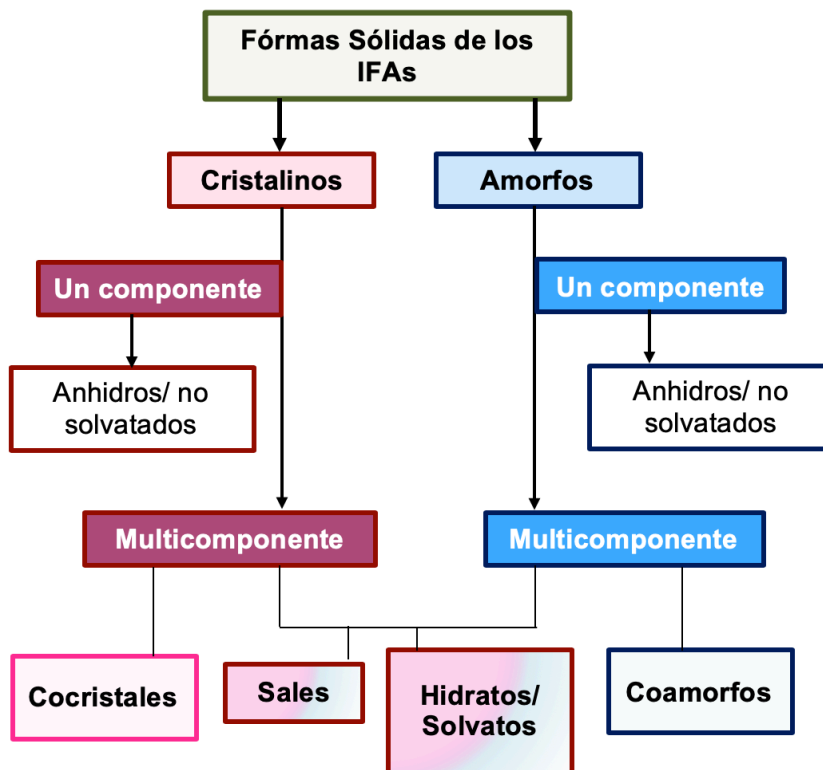
*Figura 7. Formas en las que se puede clasificar el estado sólido; a) Forma cristalina, b) Forma amorfa.*

Independiente de su estado cristalino o amorfo, y de sus polimorfos, los IFAs se pueden presentar como un sistema de uno o más componentes, ya sea como anhidros, hidratos/ solvatos, sales o cocristales (Esquema 1). Cada uno presentará diferentes propiedades fisicoquímicas, que pueden tener un gran impacto en la biodisponibilidad del fármaco, por lo cual encontrar la forma sólida óptima para cada IFA es primordial (Vioglio *et al.*, 2017).

Dentro de las diferentes formas sólidas, los hidratos y solvatos son aductos moleculares multicomponentes que contienen al IFA y a una molécula huésped (agua (hidrato) u otros solventes (solvato)) (Healy *et al.*, 2017). No obstante, a pesar de ser ampliamente utilizados en la industria farmacéutica (como con los antibióticos  $\beta$ -lactámicos), actualmente no son la primera opción en la innovación y formulación

de IFAs (Almarsson *et al.*, 2012). Esto se debe a que los solvatos presentan una estabilidad dependiente de la temperatura y humedad, y son propensos a transformarse en sólidos cristalinos menos solubles o en sólidos amorfos inestables fácilmente. Además, actualmente el número de solventes farmacéuticamente aceptables es muy bajo, lo que dificulta su formulación y aplicación (Morissett *et al.*, 2004).

Por otra parte, las sales son complejos químicos que comprenden un ensamble de cationes y aniones, por lo que una sal farmacéutica es el ensamble de un IFA (catiónico o aniónico) y su contraión (molecular o monoatómico) (Bond, 2011). Debido a que la mayoría de los IFAs contienen grupos nitrogenados o ácidos carboxílicos en su estructura, los cuales son ideales para la formación de sales, se estima que más del 50% de los IFAs se administran en esta forma sólida (Sarma *et al.*, 2011). Anteriormente la formación de sales era la primera opción para contrarrestar los problemas de baja solubilidad de los IFAs (Vioglio *et al.*, 2017), sin embargo, su principal desventaja es que se limitan a IFAs con grupos ionizables (Duggirala *et al.*, 2016).



Esquema 1. Las diversas formas sólidas en las que se puede presentar un IFA  
(Modificado de Aitipamula *et al.*, 2012).

TDF es un IFA que se encuentra en estado cristalino, y debido a su alto valor de  $pK_a$  (15.17) no es factible su uso para la formación de sales. Finalmente, la ingeniería cristalina ha propuesto estrategias para mejorar las propiedades de los IFAs a través de polimorfos metaestables, formación de fases amorfas y cocrisales (Bavishi y Borkhataria, 2016).

#### 4.4.1 Estado cristalino de Tadalafilo

Tadalafilo es un polvo blanco de forma cristalina y hasta el momento se encuentran reportados 8 polimorfos (I, II, III, IV, V, VI, VII y VIII), incluyendo una forma solvatada y una anhidra (Weyna *et al.*, 2012 ). La cristalinidad de TDF se ha determinado a través de las técnicas de difracción de rayos X de polvos y monocristal, mediante el estudio del polimorfo I. En la figura 8 se presenta el patrón de difracción de rayos X de TDF (polimorfo I), en el cual se observan picos definidos que corresponden a un estado cristalino.

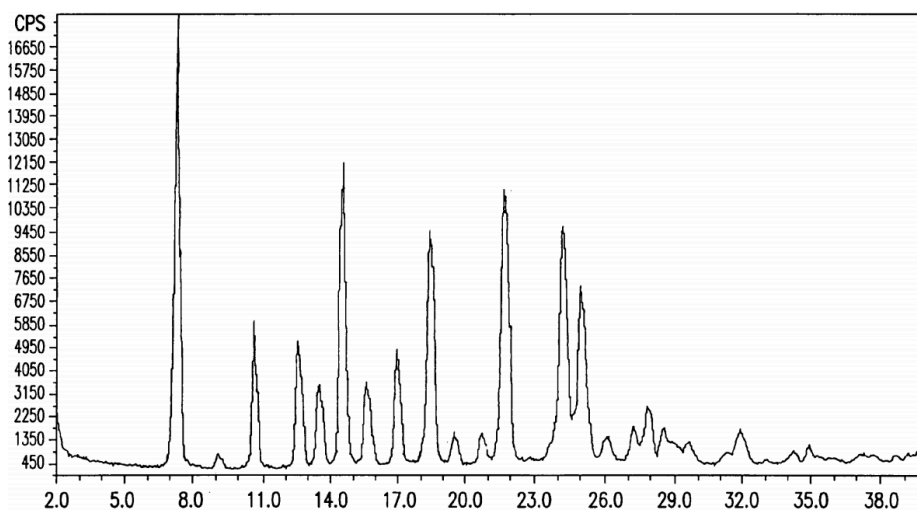


Figura 8. Patrón de difracción de Rayos X de Tadalafilo (polimorfo I). Condiciones: step 0.05°, rango 2-40 (DEG), velocidad 5.00 DEG/min. (Shlomit *et al.*, 2006)β

El monocristal de TDF se encuentra reportado en la base de datos de estructuras de Cambridge (CSD, por sus siglas en inglés *Cambridge Structural*



Database), y corresponde al polimorfo I de TDF anhidro (refcode: IQUMAI). En la estructura del monocristal (Figura 9) se observa que el empaquetamiento entre las moléculas de TDF es a través de puentes de hidrógeno mediante el grupo indol y el carbonilo lactámico de otra molécula vecina, vía  $N-H \cdots O=C$  (Weyna *et al.*, 2012). Las interacciones por puente de hidrógeno de TDF lo hacen factible a formar cocristales con coformadores que tengan grupos alcohol o ácidos carboxílicos.

Así mismo se ha demostrado que es factible modificar el arreglo cristalino de TDF a través de la síntesis de su forma amorfa, mediante diversos métodos, tales como la evaporación asistida con disolvente (Wlodarski *et al.*, 2014; Shimpi *et al.*, 2018). Por lo cual TDF es factible a modificar su estructura cristalina a través de la formación de cocristales o a la amorfización, y por ende modificar sus propiedades fisicoquímicas, como solubilidad y velocidad de disolución.

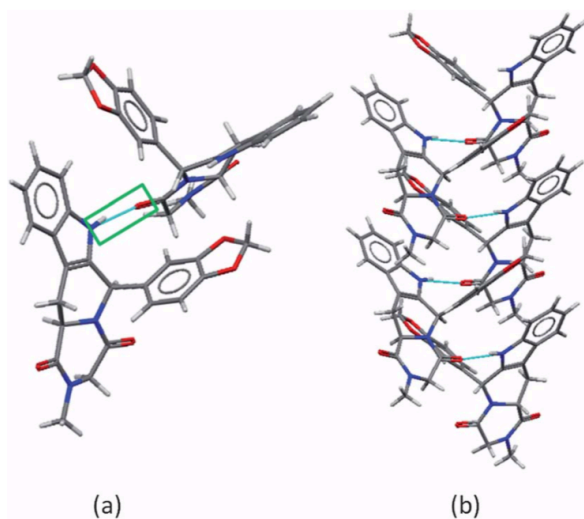


Figura 9. (a) Puente de hidrógeno en la estructura cristalina de TDF (IQUMAI). (b) Cadenas supramoleculares de TDF extendido en el eje b (Weyna *et al.*, 2012).

#### 4.4.1.1 Amorfización de Tadalafilo

Como se observó en la figura 7, a diferencia del arreglo cristalino, los sólidos amorfos presentan un arreglo desordenado en sus moléculas. Este desarreglo va a impactar en sus propiedades fisicoquímicas, sin modificar su estructura química. Ya se ha reportado anteriormente incrementos en la solubilidad de hasta 250 veces

cuando se amorfiza al IFA, en contraste con su sólido cristalino (Huang y Tong, 2004). Debido a esto, en el año 2014 Wlodarski y colaboradores generaron una forma amorfa de TDF, como estrategia para mejorar su solubilidad. Para la amorfización de TDF se utilizaron diferentes métodos, tales como, secado por aspersion (spray drying), molienda criogénica, secado por frío y precipitación por antisolvente. Usando la misma técnica, Shimpi y colaboradores generaron la forma amorfa de TDF para comparar su disolución con el fármaco cristalino. No obstante, en ambos estudios se demostró que TDF en medios acuosos, en estado amorfo o cristalino, genera una rápida disolución y supersaturación que da como resultado una pronta precipitación y cristaliza inmediatamente (Wlodarski *et al.*, 2014; Shimpi *et al.*, 2018). Por lo que la amorfización de TDF se pierde una vez que se encuentra en contacto con medios acuosos y por ende no alcanza una mejora en sus propiedades fisicoquímicas.

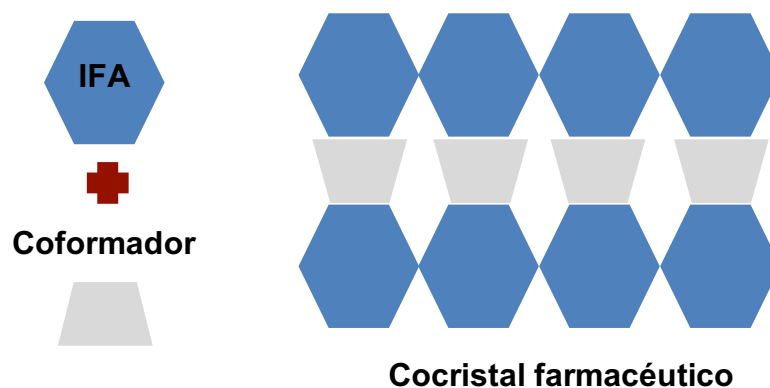
Debido a lo anterior, los esfuerzos en mejorar la solubilidad de TDF se han enfocado en la modificación de su arreglo cristalino a través de sistemas multicomponentes, y en el uso de polímeros o surfactantes inhibidores de la precipitación (Alvani *et al.*, 2019).

## 4.5 Cocristales

Los cocristales, como se vio en el esquema 1, son sólidos cristalinos multicomponentes, formados por dos o más componentes en una red cristalina con una estequiometría definida (Bavishi y Borkhataria, 2016). Por su parte, los cocristales farmacéuticos (Figura 10) se establecen cuando se forma la red cristalina entre un IFA y un coformador (molécula pequeña e inocua para el organismo) (Aitipamula *et al.*, 2012).

En los cocristales se sustituyen las interacciones IFA-IFA por interacciones IFA-coformador, sin modificar los enlaces covalentes del IFA. Esto implica que no hay una modificación en la unidad molecular con actividad farmacológica y por ende no es necesario realizar los estudios clínicos o de toxicidad nuevamente, trayendo ventajas en costos y tiempo (Almarsson *et al.*, 2012). Las interacciones IFA-coformador son de forma no covalente, a través de enlaces débiles principalmente

por puentes de hidrógeno, no obstante se pueden formar mediante enlaces  $\pi - \pi$  o fuerzas de Van der Waals (Rodríguez-Hornedo, *et al.*, 2006).



*Figura 10. Sistema multicomponente de un cocrystal farmacéutico (Modificado de Bavishi y Borkhataria, 2016).*

Los cocrystal al modificar el arreglo cristalino de los IFAs, generan NFS, las cuales cambian las propiedades fisicoquímicas del IFA, tales como solubilidad, velocidad de disolución y estabilidad física (Elder *et al.*, 2013). Estos representan una nueva estrategia en el desarrollo de medicamentos, y una oportunidad para patentar una NFS del IFA, o evitar la infracción de la solicitud de patente existente. Debido a lo anterior, en los últimos años se ha notado un incremento evidente en el número de cocrystal farmacéuticos reportados, tanto por la academia como por la industria farmacéutica, como se muestra en la figura 11 (Kavanagh *et al.*, 2019). Lo que significa que la cocrystalización es una estrategia novedosa y rentable para la modificación de los IFAs.

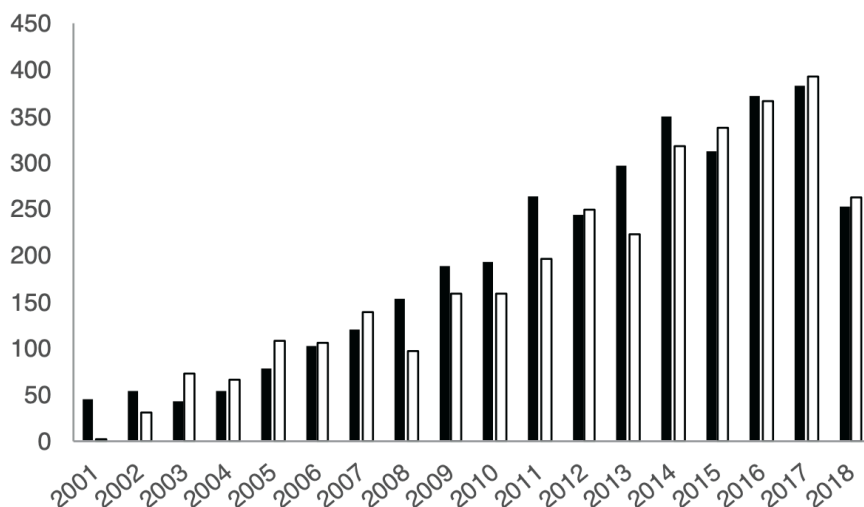


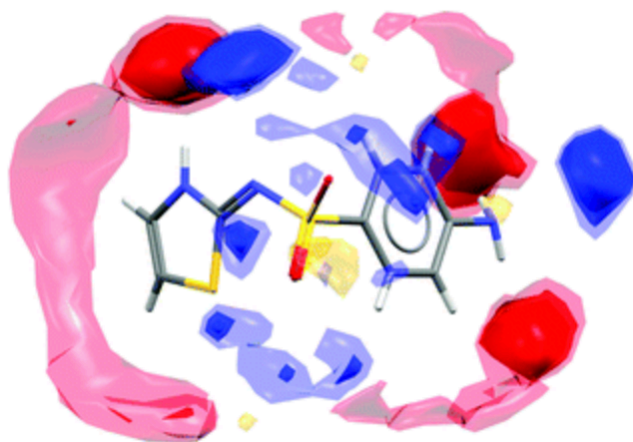
Figura 11. Publicaciones de cocristales del 2001 al 2018, con base en datos científicos PubMed (barras negras), y en la base de datos de la oficina de patentes y marcas de E.U.A. (barras blancas) (Kavanagh et al., 2019)

#### 4.5.1 Diseño de los cocristales

El diseño de cualquier cocrystal conlleva cuatro pasos importantes: análisis estructural, selección de coformadores, síntesis y caracterización del cocrystal (Sarma *et al.*, 2011). A pesar del gran número de cocristales que se han sintetizado, es indispensable un estudio específico de las interacciones intermoleculares del IFA, puesto a que cada uno tiene una composición molecular diferente (Duggirala *et al.*, 2016). La comprensión de las interacciones intermoleculares, interacciones IFA-IFA en el contexto del ensamblaje del cristal, es esencial para determinar los grupos funcionales del IFA que permitan un reconocimiento molecular por parte del coformador (Shan y Zaworotko, 2008).

Debido al alto número de coformadores que existen actualmente para la formación de cocristales, un enfoque basado en el conocimiento de la estructura cristalina del IFA es fundamental para evaluar la probabilidad de formación de cocristales (Wood *et al.*, 2014). Actualmente existen herramientas para estudiar la estructura cristalina del IFA y establecer las interacciones que puede formar con los coformadores. El software *Mercury*®, a través del Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge (CCDC, por sus siglas en inglés, *Cambridge Crystallographic Data Centre*), incorpora una herramienta para la búsqueda, *screening*, de cocristales

dentro de su menú *CSD-Materials*. La evaluación se realiza con el análisis estructural del IFA contra una biblioteca elegida de posibles coformadores con sus diferentes conformaciones para la molécula objetivo (Macrae *et al.*, 2020). Así mismo, otra herramienta dentro de *CSD-Materials* es la de *Full Interaction Maps*, la cual se utiliza para evaluar las interacciones preferenciales de una molécula. Esto es posible gracias a la base datos que contiene, llamada *IsoStar*, la cual almacena la geometría de las interacciones intermoleculares de diferentes grupos funcionales, derivados de la superposición de cientos de miles de moléculas ingresadas en la CCDC. Por ejemplo en la figura 12 se muestran las posibles interacciones de Sulfatiazol, en azul las zonas con grupos donadores de puente de hidrógeno, y en rojo las zonas con grupos aceptores (Wood *et al.*, 2013). Por lo cual mediante estas herramientas no sólo se puede evaluar las estructuras cristalinas, si no también se pueden establecer las interacciones con las coformadores (Macrae *et al.*, 2020).



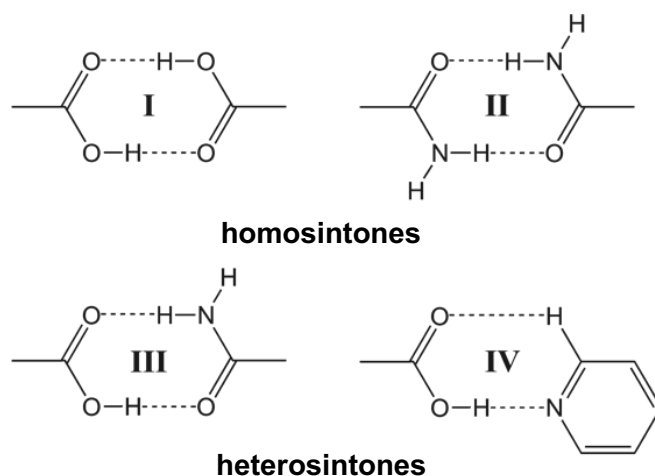
*Figura 12. Mapa de interacciones alrededor de la conformación molecular de Sulfatiazol (Modificada de Wood et al., 2013).*

#### **4.5.2 Selección de coformadores.**

Uno de los mayores retos en el diseño de cocrystal es determinar que coformadores formaran un cocrystal con el IFA de interés antes del análisis de las propiedades del sólido obtenido (Vologzhanina, 2019). Para la selección de los coformadores se deben de tomar en cuenta dos parámetros: 1) que tengan grupos funcionales que puedan establecer una interacción con el IFA de interés y 2) que

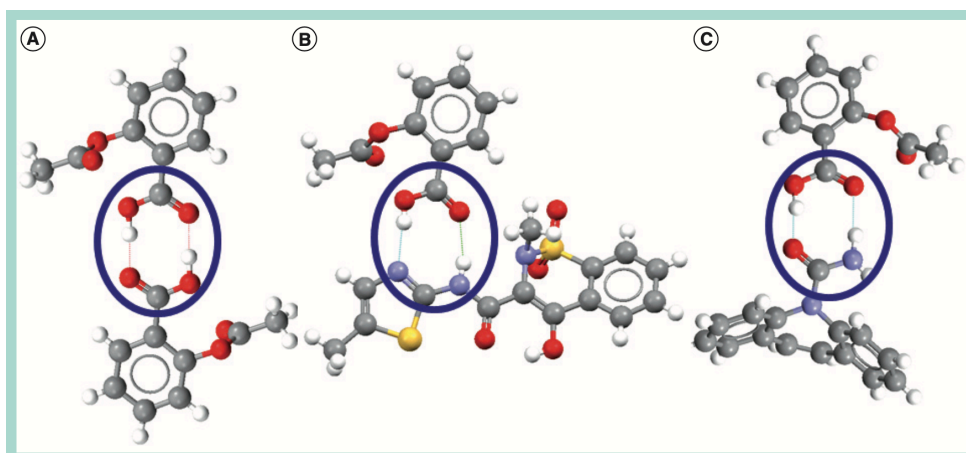
sean seguros para el organismo, que no presenten propiedades tóxicas y que sean farmacéuticamente aceptables, tales como los nutracéuticos o los que se encuentran en la lista *GRAS* (por sus siglas en inglés: *Generally Recognized as Safe*) de la FDA (Schultheiss *et al.*, 2010).

Para establecer las interacciones fármaco-coformador se utiliza un modelo de ensamble molecular, denominado sintón supramolecular, el cual se forma a través de los grupos funcionales complementarios del IFA y el coformador (Duggirala *et al.*, 2016). El término sintón supramolecular fue inicialmente introducido por Desiraju, quien lo definió como el patrón específico que se forma a través del reconocimiento intermolecular, y este puede ser en una, dos o tres dimensiones. Este término combina el entendimiento químico del reconocimiento molecular, y la geometría del empaque cristalino (Desiraju, 2013). Los sintones pueden ser homosintones o heterosintones (Figura 13); los primeros son aquellos que se complementan por los mismos grupos funcionales, como los dímeros de ácidos carboxílicos; los segundos se complementan por grupos funcionales distintos, los cuales pueden ser: ácido carboxílico-amida, ácido carboxílico-nitrógeno aromático, alcohol-nitrógeno aromático, alcohol-amina, entre otros (Duggirala *et al.*, 2016).



*Figura 13. Homosintones y heterosintones más comunes en conjuntos supramoleculares (Bond, 2011).*

Para determinar que grupos pueden estar involucrados en la formación del sintón supramolecular entre el IFA y los cofactores, se evalúa la estructura cristalina del IFA. En el estudio del monocristal de TDF, sección 4.4.1, se demostró que es factible formar cocristales por medio de puentes de hidrógeno con sus grupos indol o láctamico, y los grupos alcohol o ácido carboxílico de los cofactores. Por ende, la formación de cocristales de TDF será más factible por medio de heterosintones (Weyna *et al.*, 2012). Anteriormente se ha demostrado que es más factible la formación de cocristales por medio de heterosintones, tal como se observó en los cocristales del ácido acetil salicílico (aspirina), los cuales se forman por medio de heterosintones a pesar de que sus interacciones IFA-IFA sean a través de homosíntones (Figura 14).



*Figura 14. Sintones supramoleculares en cocristales farmacéuticos. (A) Homosinton de ácido carboxílico-ácido carboxílico en la aspirina; (B) Heterosinton de ácido carboxílico-nitrógeno en el cocrystal aspirina:meloxicam; (C) Heterosinton de ácido carboxílico-amida en el cocrystal de aspirina:carbamazepina (Almarsson *et al.*, 2012).*

Actualmente ya se encuentran varios cocristales de TDF reportados y patentados por diferentes grupos de investigación. En nuestro grupo de investigación, el Grupo Interdisciplinario en Química y Farmacia del Estado Sólido CIQ-FF.UAEM, en colaboración con Laboratorios Senosiain S.A. de C.V., se realizó la búsqueda inicial de NFS de Tadalafilo (Patentes otorgadas en México MX357741B (2018), Rusia RU 2634713 (2017), España ES2648369B2 y E.U.A.

US9278970 B2 (2016)). Por las características estructurales de Tadalafilo (Figura 3), se realizó el primer *screening* utilizando alrededor de 40 coformadores, con alcoholes, aminoácidos, ácidos dicarboxílicos de cadena lineal, ácidos hidroxibenzoicos y compuestos aromáticos, los cuales se muestran en la Tabla 3.

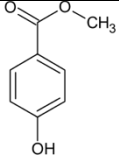
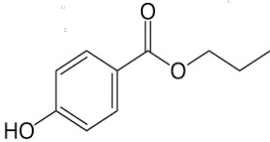
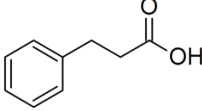
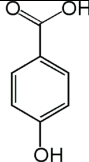
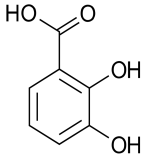
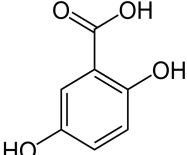
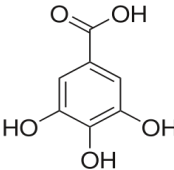
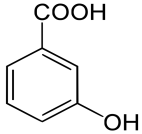
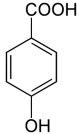
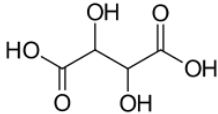
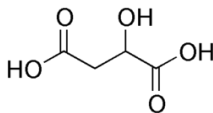
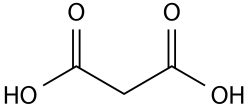
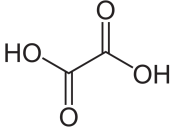
No obstante, de los 40 coformadores evaluados únicamente se obtuvieron 7 NFS, incluyendo solvatos y cocristales, utilizando como coformadores los ácidos 3-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzoico, 2,-3-dihidroxibenzoico, 2,5-dihidroxibenzoico, 3,4,5-trihidroxibenzoico, L-tartárico y D-málico (Carlos-Martínez, 2017). Otros cocristales de TDF se han sintetizado en los grupos de investigación de Weyna y colaboradores en el 2012, y Hannah y colaboradores en el 2013. Los coformadores utilizados para la síntesis de los cocristales se muestran en la Tabla 4, los cuales son de la lista GRAS de la FDA.

**Tabla 3. Coformadores utilizados para la búsqueda de NFS de Tadalafilo por Herrera y colaboradores (resultados no publicados).**

Ácidos di-carboxílicos de cadena lineal	Ácidos Hidroxibenzoicos	Amidas Heterocíclicas Aromáticas	Alcoholes
Oxálico	2-hidroxibenzoico	Picolinamida	Xilitol
Succínico	3-hidroxibenzoico	Nicotinamida	
Adípico	4-hidroxibenzoico	Isonicotinamida	
Maléico			
Ácidos Hidroxicarboxílicos de cadena lineal	Ácidos di- o tri-Hidroxibenzoicos	Ácidos Carboxílicos Aromáticos	Aminoácidos
Glicólico	2,3-dihidroxibenzoico	Benzoico	Glutamina
L-Tartárico	2,4-dihidroxibenzoico	Ftálico	L-Fenilalanina
D-Tartárico	2,5-dihidroxibenzoico	Ácido Mandélico	L-Serina
DL-Tartárico	2,6-dihidroxibenzoico	Ácido vanílico	L-Treonina
Meso-Tartárico	3,4-dihidroxibenzoico	Acetilsalicílico	L-Tirosina
D-Málico	3,5-dihidroxibenzoico	3-Aminobenzoico ácidos	
L-Málico	3,4,5-trihidroxibenzoico	Ascórbico	
DL-Málico		Ácido 1-hidroxi-2-naftoico	
Cítrico			



**Tabla 4. Coformadores utilizados que permitieron la obtención de cocristales de Tadalafilo.**

Weyna y colaboradores en el año 2012			
<b>Metilparabeno</b>	<b>Propilparabeno</b>	<b>Ácido hidrocínámico</b>	<b>Ácido 4-hidroxiibenzoico</b>
			
Herrera y colaboradores en el año 2012. Patentes otorgadas en México MX357741B (2018), Rusia RU 2634713 (2017), España ES2648369B2 y E.U.A. US9278970 B2 (2016).			
<b>Ác. 2,3-Dihidroxiibenzoico</b>	<b>Ác. 2,5-Dihidroxiibenzoico</b>	<b>Ác. 3,4,5-Trihidroxiibenzoico</b>	
			
<b>Ác. 3-Hidroxiibenzoico</b>	<b>Ác. 4-Hidroxiibenzoico</b>	<b>L-Tartárico</b>	<b>D-Málico</b>
			
Hanna y colaboradores en el año 2013 (Patente USA nº US8586587)			
<b>Ácido malónico</b>		<b>Ácido oxálico</b>	
			

Así mismo, se encuentran reportadas algunas de las estructuras cristalinas de los cocristales de TDF, de las cuales se puede analizar el tipo de sintón supramolecular que establece con los coformadores. En el cocrystal reportado en la tesis de maestría de Carlos-Martínez (Figura 15a) se forma un heterosintón vía  $C=O \cdots H-O$ , entre el IFA y el coformador ácido D-málico (Dmal), respectivamente. El mismo heterosintón se demostró en el cocrystal de TDF sintetizado con ácido malónico (MOA) (Figura 15b). Por lo que a pesar de que TDF tiene grupos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, la formación del cocrystal se ve

favorecida a través del grupo carbonilo del 2,5-dicetopiperazina, el cual actúa como aceptor.

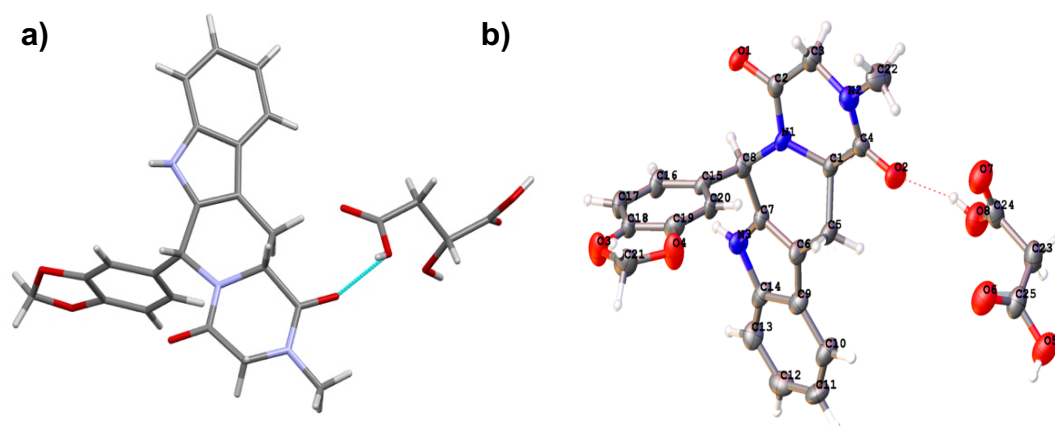


Figura 15. Estructuras cristalinas de los cocrystalos: a) TDF-Dmal y b) TDF-MOA (Carlos-Martínez, 2017; Shimpi et al., 2018).

#### 4.5.2.1 Coformadores Nutracéuticos

Además de los coformadores de la lista GRAS de la FDA, en los últimos años se han añadido a los nutracéuticos como formadores de cocrystal (Thakuria y Sarma, 2018). Los nutracéuticos fueron definidos por primera vez en 1989 por DeFelice, los cuáles son alimentos (o parte de alimentos) que brindan beneficios para la salud, ayudando en la prevención o tratamiento de enfermedades y desordenes alimenticios (DeFelice, 1997). El término nutracéutico reúne dos criterios "nutrición" y "fármaco", y fácilmente puede ser relacionado con los *suplementos alimenticios*, no obstante estos últimos no siempre tienen un valor agregado en la salud, para la prevención o tratamiento de alguna enfermedad específica (Santini *et al.*, 2018). Los nutracéuticos apoyan en el tratamiento de las enfermedades crónico degenerativas, cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes tipo II y en algunos tipos cáncer. Asimismo, disminuyen los procesos de oxidación y envejecimiento del cuerpo, y los procesos de inflamación (Espín *et al.*, 2007)

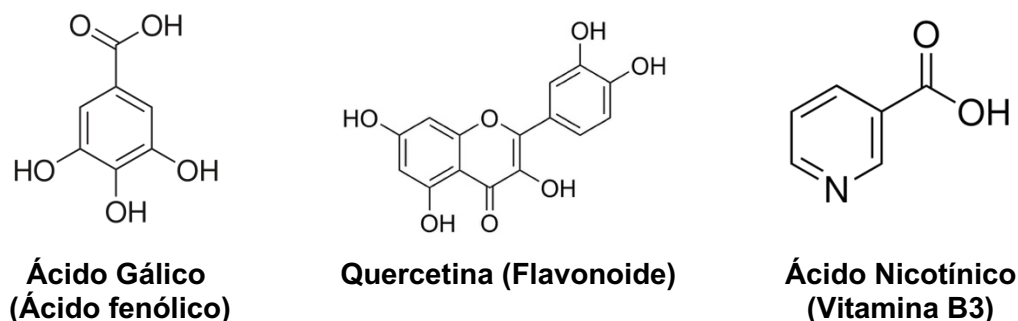
La mayoría de los nutracéuticos son extraídos de plantas, tales como de vegetales, raíces y frutas, así mismo algunos son derivados animales, como las

vitaminas y aminoácidos (Chadha *et al.*, 2015). No obstante, los nutraceuticos se administran en dosis mayores a las que obtendríamos normalmente de los alimentos, concentrando solo el agente activo, y se pueden comercializar como tabletas, cápsulas, u otras formas sólidas (Espín *et al.*, 2007). Estos están conformados por polifenoles, ácidos fenólicos, cumarinas, estilbenos, flavonoides, vitaminas, ácido retinoico, ácido L-ascórbico, entre otros (Tabla 5) (Sinha *et al.*, 2015).

De estos, cabe resaltar que tienen grupos formadores de puentes de hidrógeno (Figura 16), los grupos OH y C=O, lo que facilita la formación de cocristales con TDF, y demás IFAs. El efecto sinérgico de los nutraceuticos en conjunto con los IFAs puede ser aprovechado para mejorar sus propiedades fisicoquímicas, tales como estabilidad, solubilidad y biodisponibilidad (Thakuria y Sarma, 2018). Así mismo el efecto antioxidante de los nutraceuticos puede ser utilizado para brindar estabilidad a los IFAs propensos a oxidarse (Sinha *et al.*, 2015).

**Tabla 5. Nutraceuticos comúnmente utilizados como coformadores (Sinha *et al.*, 2015).**

<b>ácido gálico</b>	<b>pterostilbeno</b>	<b>catechin</b>	<b>pyridoxina</b>
<b>ácido protocatecuico</b>	miricetina	galato de epicatequina	biotina
<b>vainillina</b>	quercetina	epigallocatechin galleate	ascorbic acid
<b>cafeína</b>	fisetina	pinoresinol	colecalfiferol
<b>ácido p-coumarico</b>	luteolin	podofiloxina	ergocalciferol
<b>ácido sinapico</b>	baicalein	retinal	ácido fólico
<b>ácido ferúlico</b>	naringenina	ácido retinóico	menadiona
<b>resorcinol</b>	hespertina	riboflavina	7-hidroxic-6-metoxicumarina
<b>resveratrol</b>	genisteína	ácido pantoténico	



*Figura 16. Estructuras clásicas de los nutraceuticos*

Schultheiss y colaboradores se enfocaron en la preparación de varios cocristales farmacéuticos utilizando nutraceuticos como coformadores, de los cuales se obtenía una gran ventaja en la solubilidad cuando se utilizaba cafeína como coformador. Así mismo, Nangia y colaboradores reportaron cocristales de isoniazida con los nutraceuticos resorcinol, ácido ferúlico, vainillina y cafeína, de igual forma para mejorar las propiedades fisicoquímicas del IFA (Swapna *et al.*, 2014).

Debido al éxito emergente del uso de nutraceuticos como formadores de cocrystal, se tomaron en cuenta para la síntesis de NFS de TDF, puesto que no hay cocristales de TDF con nutraceuticos reportados hasta el momento. Estos podrían formar cocristales y añadir beneficios en salud.

Una vez que se establecen los coformadores, el siguiente paso en el diseño de un cocrystal es el cribado de nuevas fases y la síntesis de los cocristales.

#### **4.5.3 Cribado de nuevas fases y síntesis de cocristales de Tadalafilo**

Para el *screening* y síntesis de cocristales de TDF se deben establecer relaciones estequiométricas definidas entre el IFA y el coformador. La estequiometría del cocrystal debe ser tal que la proporción del coformador esté dentro de los límites aceptables de un aditivo determinado en una preparación farmacéutica (Cheney *et al.*, 2011).

Para todas las metodologías utilizadas los solventes deben ser seleccionados dependiendo de la solubilidad del fármaco y de los coformadores (Shimpi *et al.*, 2018). Sin embargo, los disolventes no se eliminan por completo

durante la fabricación, debido a esto se ha preferido usar los solventes pertenecientes a las clases III y IV de la FDA, los cuales son menos tóxicos y tienen menor riesgo para la salud. Los solventes pertenecientes a las clases I y II no son recomendables para uso farmacéutico ni consumo humano, y deben de ser evitados usarse en concentraciones menores a 0.1 mg por día (FDA, 2013).

Anteriormente, se realizó la búsqueda de NFS de TDF utilizando los solventes tetrahidrofurano (THF), metanol (MeOH), acetona y acetonitrilo, y las metodologías usadas fueron la reacción de cristalización desde suspensión, la molienda mecano-química asistida por disolvente (RxM) y la transformación de fase mediada por solución (*slurry*) (Patente España nº ES2530423 y Patente USA nº US9278970B2, 2016).

La cristalización desde solución es una de las técnicas más antiguas y utilizadas para la separación y purificación de materiales cristalinos. La reacción de cristalización consiste en una solución supersaturada, condición meta-estable en la cual el soluto se auto-ensambla y eclosiona como un núcleo. El núcleo subsecuentemente crecerá mediante la incorporación de más soluto, formando finalmente cristales macroscópicos. Esta reacción se ve favorecida por la disminución en temperatura (Figura 17) (Bernardes *et al.*, 2014).

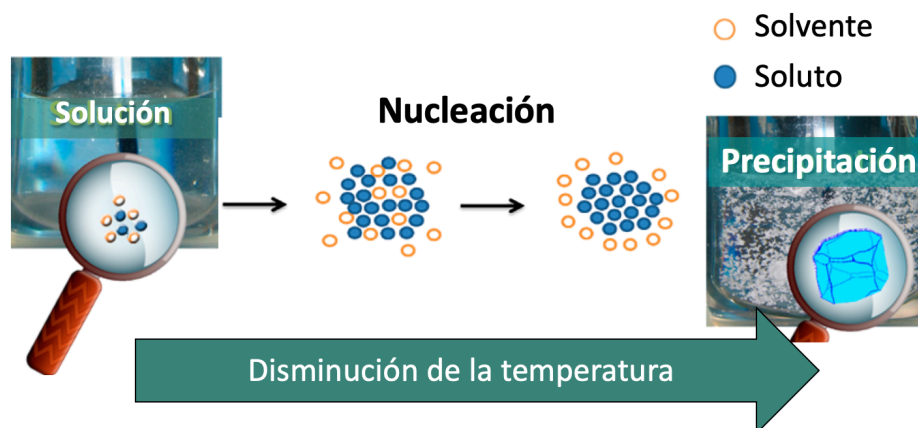


Figura 17. Proceso de cristalización a partir de una solución saturada (Modificada de Bernardes *et al.*, 2014)

Para la formación de cocristales de TDF a partir de la reacción de cristalización se genera una solución saturada del coformador, basada en las solubilidades de TDF y coformadores. La solución saturada se mantiene en agitación y se añaden pequeñas cantidades de TDF, las cuales se deben disolver perfectamente. El cocrystal precipita como un sólido en la solución cuando es termodinámicamente más estable (Shimpi *et al.*, 2018). Es muy importante seleccionar un solvente en el cual la solubilidad de los componentes sea similar, ya que si sus solubilidades son notablemente diferentes precipitará sólo uno de los componentes, y no será posible la formación del cocrystal (Portell *et al.*, 2011).

Otra reacción ampliamente utilizada para la formación de cocristales es la de *slurry* (Figura 18), la cual es mediada por la agitación o sonicación, y consiste en colocar en un vial las relaciones equimolares del IFA y el coformador, y pequeñas cantidades del disolvente en caso de ser necesario. El sistema se mantendrá en agitación constante hasta completar la reacción, la cual se caracteriza por la formación de una pasta (Qiao *et al.*, 2011).

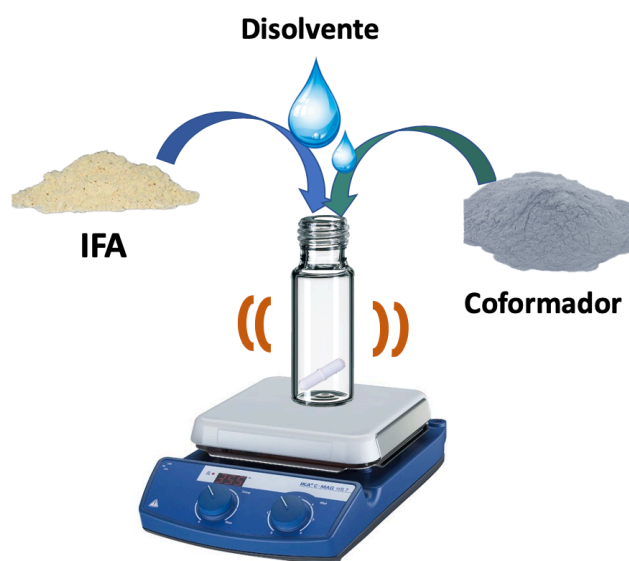
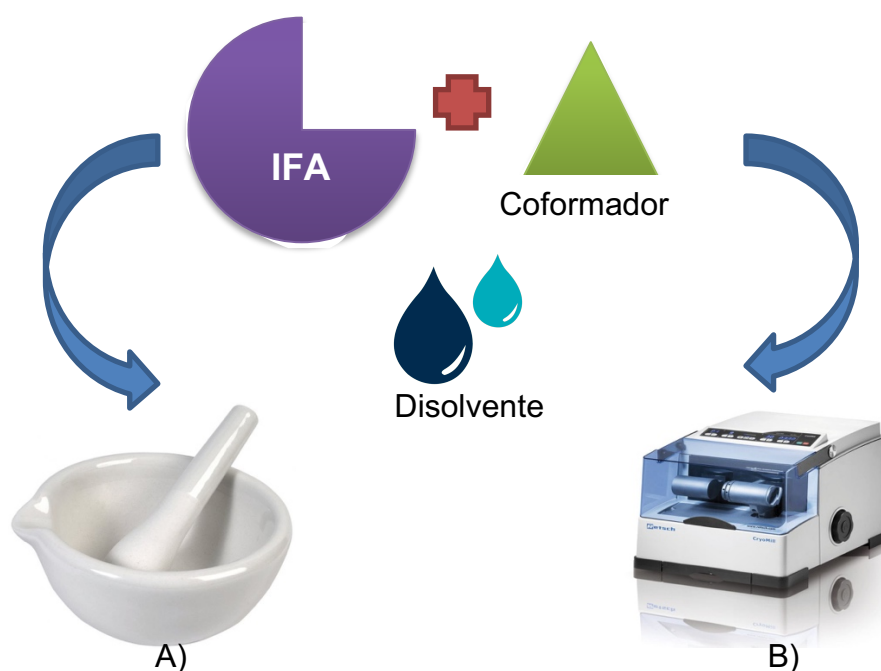


Figura 18. Diagrama de la reacción de *Slurry*

#### 4.5.3.1 Reacción de molienda mecano-química.

Por otra parte, la molienda mecano-química es una reacción química llevada a cabo con energía mecánica, y ha surgido como una técnica novedosa para la

formación de cocrisales (Užarević *et al.*, 2015). Se agregan cantidades equimolares del IFA y del coformador, con una pequeña cantidad de disolvente en caso de ser necesario para catalizar la reacción (Jampílek y Dohnal, 2012). Este método se basa en aplicar fuerza mecánica sobre los reactivos para promover sus transformaciones físicas y químicas; esta puede ser administrada personalmente en un mortero con pistilo, o mediante equipos como molino de bolas o molino vibratorio (Figura 19), hechos de acero, aluminio o carburo de tungsteno (Qiao *et al.*, 2011).



*Figura 19. Diagrama de molienda mecano-química asistida con disolvente, A) Utilizando mortero con pistilo, B) Utilizando molino de bolas.*

Esta reacción ha demostrado ser altamente selectiva y exitosa en la transformación de moléculas y materiales. Así mismo, se sugería que la pequeña cantidad de disolvente utilizada tenía un papel puramente físico, actuando como lubricante en la reacción para facilitar la difusión molecular (Friščić y Jones, 2009). No obstante, es un desafío comprender los procesos que suceden en los polvos cuando se encuentran bajo molienda por las fuerzas mecánicas que se aplican a gran velocidad, por lo que se ha estudiado el mecanismo de reacción paso por paso mediante ensayos *ex situ*. Estos consisten en interrumpir periódicamente la reacción

y analizar al polvo por técnicas del estado sólido, como difracción de rayos x de polvos (DRXP), espectroscopía Raman e infrarrojo, o resonancia magnética nuclear de sólidos. Las observaciones en “tiempo real” revelaron que la cantidad de disolvente utilizada si tiene una influencia directa en la formación del cocrystal (Užarević *et al.*, 2015). Así mismo, se estudió paso a paso la reacción mecanoquímica para la formación de cocrystal de pirazinamida con ácido oxálico, de la cual se determinó que la presencia de agua era fundamental para la formación del cocrystal (Kulla *et al.*, 2017).

Por consiguiente, debido a todos lo cocrystal sintetizados mediante la reacción de molienda mecanoquímica, esta surge como una estrategia rápida y efectiva para obtener NFS, las cuales no son posible de sintetizar por otros métodos en solución debido a su baja solubilidad (Kulla *et al.*, 2017). Así mismo se ha demostrado la síntesis de cocrystal de TDF mediante esta técnica de forma rápida (de 10 a 15 minutos ) y eficaz (Carlos-Martínez, 2017). Una vez realizada las diferentes metodologías de síntesis para el screening de NFS, el paso inmediato es la caracterización de los sólidos obtenidos.

#### **4.5.4 Métodos generales de caracterización física y espectroscópica**

Hasta el momento, la caracterización de los cocrystal de TDF consiste en las técnicas de caracterización física de los sólidos por difracción de rayos X de polvos (DRXP) y monocristal (DRXM), análisis térmico por calorimetría de barrido diferencial (DSC, por sus siglas en inglés *Differential Scanning Calorimetry*) y análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés *Thermal Gravimetric Analysis*). Y el estudio espectroscópico por raman e infrarrojo (IR).

##### 4.5.4.1 Difracción de Rayos X

Actualmente, las técnicas de difracción de rayos X (DRX) se consideran el estándar de oro para la caracterización del estado sólido, ya que permite distinguir entre polimorfos, solvatos, sales, cocrystal y amorfos. Cada compuesto produce su propio patrón de difracción característico, y estos se pueden obtener de un único cristal (DRXM) o de una muestra pulverizada del material (DRXP). La primera puede

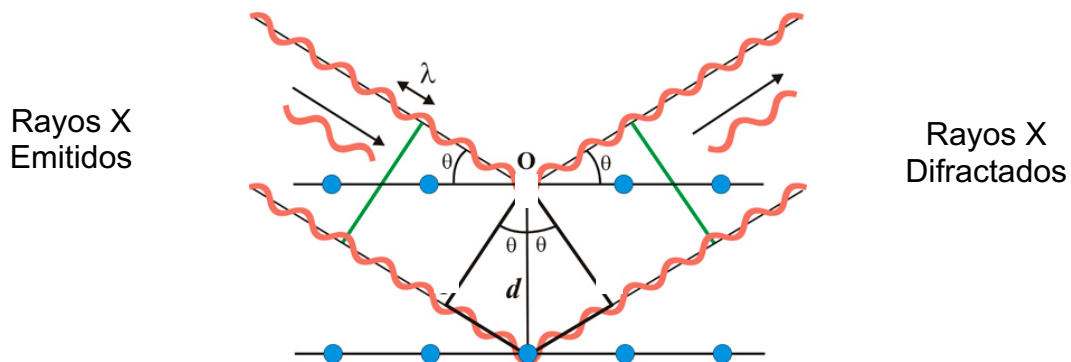


detallar la composición estructural de un sólido, mientras que la segunda puede mostrar el arreglo cristalino de un sólido con base en su orden/o desorden molecular (Ivanisevic *et al.*, 2010). Ambas técnicas se rigen por la ley de Bragg:

$$n\lambda=2d \sin\theta$$

Ecuación 1. Ley de Bragg

Donde  $\lambda$  corresponde a la longitud de onda de los rayos X, los cuales suelen ser emitidos por una lámpara de cobre a 1.54 Å;  $d$  es el espacio reticular entre los planos del cristal y  $\theta$  es el ángulo de difracción entre los diferentes planos. La ecuación se presenta en la figura 20, donde se representan los rayos X emitidos contra los difractados.



*Figura 20. Representación esquemática de la difracción de rayos X.*

Los patrones de DRXP muestran la intensidad difractada de un sólido en función del ángulo  $2\theta$  (ángulo entre las ondas de rayos X difractadas y no desviadas), y este parámetro es considerado una “huella dactilar” de la muestra, ya que es particular para cada sólido. Por otra parte, en la DRXM la intensidad de la difracción es capturada en tres dimensiones por un detector de área o CCD (por sus siglas en inglés: Charge Coupled Device). A pesar de que la DRXM brinda la información estructural de la molécula del cocrystal, no en todos los casos se logra la formación de monocristales, por lo que la DRXP es una técnica crucial para discernir entre mezcla física (MF) y NFS; para ello se comparan los patrones de

difracción del cocrystal y de las materias primas para identificar la formación de NFS (Zaworotko *et al.*, 2011; Pharmacopeia, 2007).

Los equipos utilizados para estas técnicas son los difractómetros (Figura 21), y actualmente están equipados para controlar la humedad y temperatura, ampliando su rango de usos.

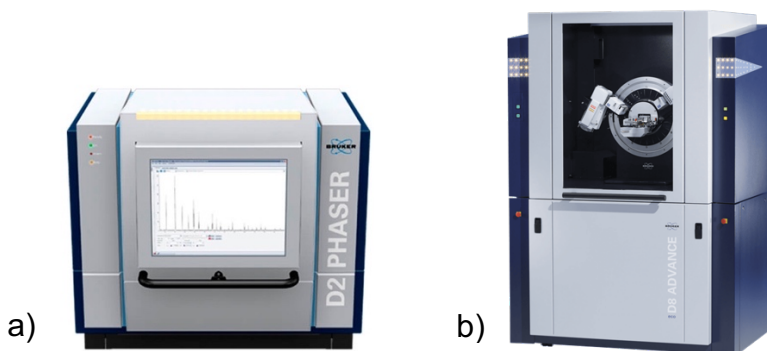


Figura 21. Difractómetros de Rayos X de marca Bruker a) Polvos b) Monocristal.

#### 4.5.4.2 Análisis térmico (DSC y TGA)

El objetivo del análisis térmico es evaluar las propiedades físicas y químicas de los sólidos (TDF, NFS y coformadores) cuando se someten a un incremento gradual de la temperatura. Los sucesos termodinámicos encontrados pueden indicar la identidad y pureza de las materias de partida, así mismo, pueden demostrar la formación de una NFS.

En la técnica de DSC se establece una rampa de temperatura ascendente, de la cual se obtienen datos calorimétricos cuantitativos, tales como: transición vítrea, capacidad calorífica, punto de fusión, punto de cristalización, descomposición, entalpía o entropía; y cada una va ser característica para cada sólido (Menczel *et al.*, 2009). Los cambios de fase o descomposición se pueden apreciar antes del punto de fusión, el cual se observa como un pico endotérmico definido en el termograma, tal como se muestra en la figura 22. En ésta se aprecia el punto de fusión de TDF, del ácido malónico y del cocrystal sintetizado por Shimpi y colaboradores en el año 2018.

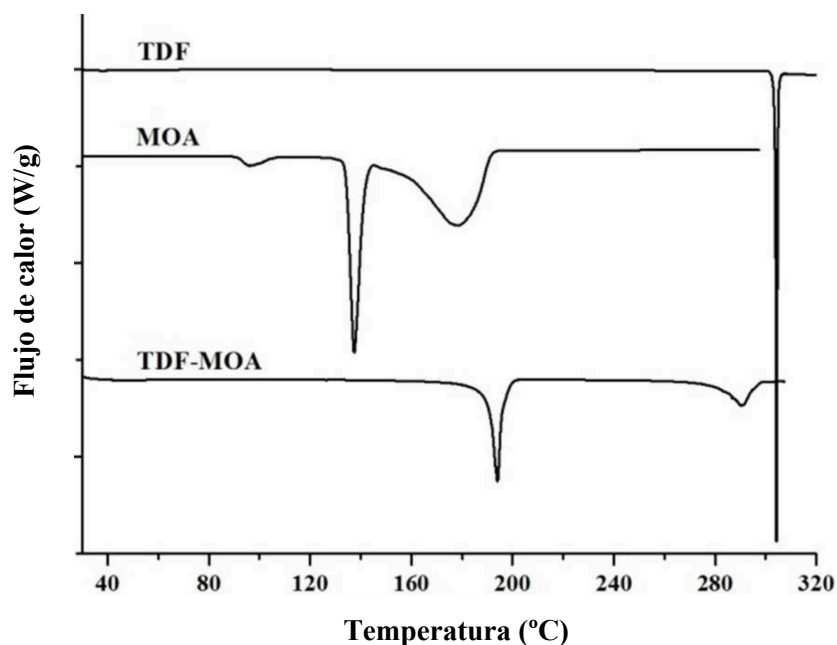


Figura 22. Termograma de DSC de Tadalafil (TDF); ácido malónico (MOA); y cocrystal TDF-MOA (Shimi et al., 2018)

Por otra parte, el análisis termogravimétrico (TGA) evalúa los cambios en masa de una muestra en función de la temperatura o tiempo de calentamiento, en una atmósfera controlada. Generalmente se realiza en conjunto con el DSC, y ambos brindan información importante en la caracterización del estado sólido, tal como procesos de desolvatación, transformación de fase, y estequiometría de las NFS. En este análisis se correlaciona la pérdida de masa en TGA con los eventos endotérmicos encontrados en DSC, tal como se muestra en la figura 23, en la cual se muestra el cocrystal de TDF sintetizado por Shimpi y colaboradores.

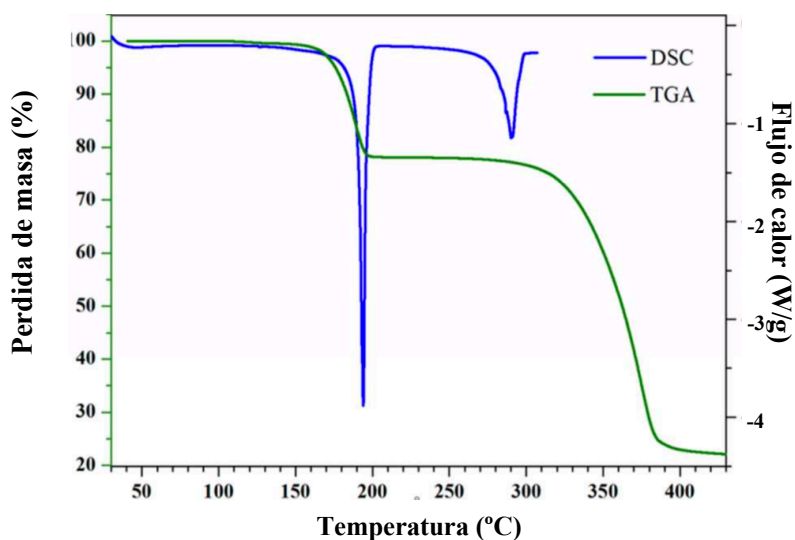


Figura 23. Termograma de DSC/TGA de cocrystal TDF-MOA, tomado de Shimpi et al., 2018.

#### 4.5.4.3 Espectroscopía vibracional (Raman, IR)

Las técnicas de espectroscopía de Raman e infrarrojo permiten detectar cambios vibracionales en los grupos funcionales de TDF, originados por las interacciones entre el IFA y el coformador. La técnica de IR consiste en medir la absorción del sólido en la región de infrarrojo ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ), la cual es apropiada principalmente para la identificación de grupos  $-OH$ ,  $-NH$  y carbonilos. Por otra parte, mediante la espectroscopía de Raman se mide la dispersión de luz inelástica, en regiones de  $3500-50\text{ cm}^{-1}$ , y es particularmente más sensible para enlaces C-C y compuestos aromáticos (Zaworotko *et al.*, 2011; Pharmacopeia, 2007).

Estas técnicas son sensibles para detectar cambios en el espectro de TDF, y se han utilizado anteriormente para la caracterización y detección de medicamentos falsos y adulterados de Cialis® (Kwok y Taylor, 2012).

Una vez realizada la caracterización completa de los cocrystal de se debe llevar a cabo la evaluación de sus propiedades biofarmacéuticas.

## 4.6 Propiedades biofarmacéuticas de Tadalafilo y las Nuevas Fases Sólidas.

Debido a que la solubilidad y la velocidad de disolución son las principales propiedades biofarmacéuticas de TDF que se desean mejorar, son éstas las que se deben evaluar para medir el efecto de la cocrystalización. En cocrystalales reportados anteriormente de TDF, únicamente se reportan las técnicas de caracterización, sin demostrar que se hayan mejorado las propiedades biofarmacéuticas del IFA (Weyna *et al.*, 2011; Hanna *et al.*, 2013).

La velocidad con la que TDF se libera de la forma farmacéutica al medio fisiológico es conocida como velocidad de disolución. Esta juega un papel muy importante en la farmacocinética ya que el fármaco debe ser disuelto para poder ser absorbido y por ende encontrarse biodisponible (Di y Kerns, 2015). No obstante, la velocidad de disolución de TDF se ve limitada por su solubilidad, la cual se define como el equilibrio termodinámico de un soluto entre dos fases: sólida y líquida (Roy *et al.*, 2012). La solubilidad (Figura 24) es un proceso termodinámico basado en la energía libre de solubilización, que involucra las interacciones en la red cristalina, interacciones soluto-soluto (en los cocrystalales es IFA-coformador), y las interacciones entre el soluto y el solvente (solvatación) (Maheshwari *et al.*, 2012). Estos dos factores contribuyen a la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) del soluto, la cual se rige por la siguiente ecuación:

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

Ecuación 2. Ecuación energía libre de Gibbs

Los cocrystalales son una forma efectiva para alterar el  $\Delta G_{\text{red cristalina}}$  debido a que las interacciones que se establecen entre el IFA y el coformador influyen en las energías de red y solvatación asociadas (Maheshwari *et al.*, 2012). En un estudio se analizó la  $\Delta G$  de 350 cocrystalales, de los cuales se determinó que podían incrementar la energía libre de Gibbs hasta  $8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , en comparación de los sólidos cristalinos (Taylor y Day, 2018), cuando se utilizaban coformadores con alta solubilidad (Maheshwari *et al.*, 2012).

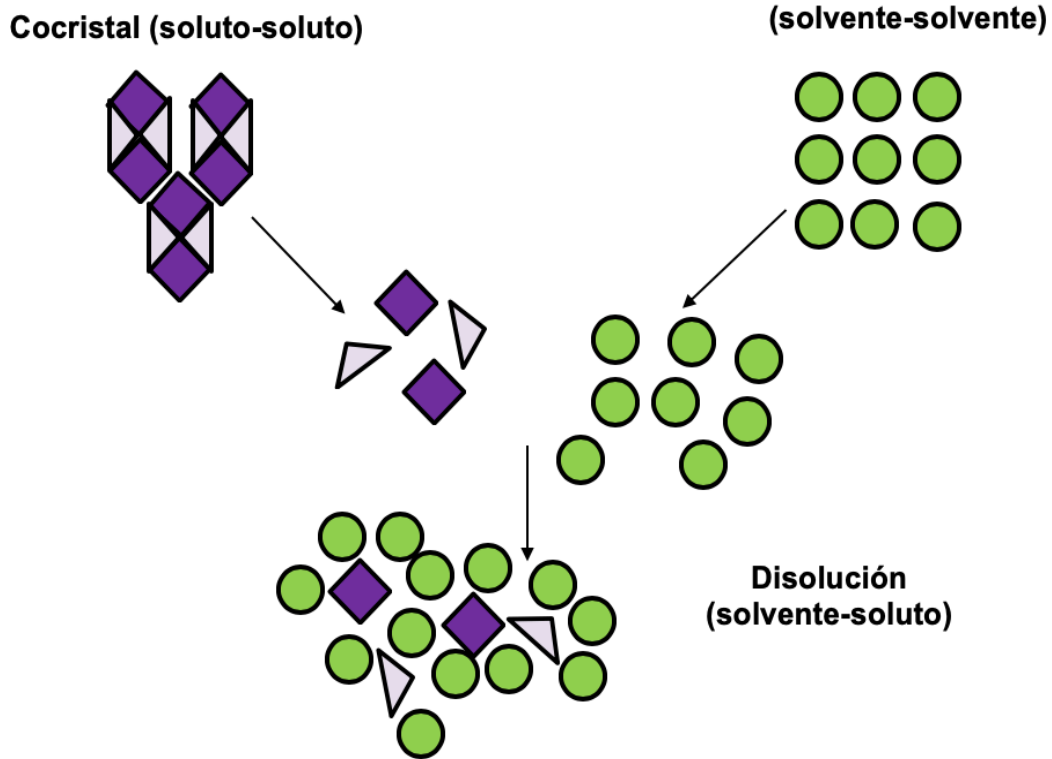


Figura 24. Representación esquemática del proceso de solubilización de un cocrystal (Roy et al., 2012).

Good y Rodríguez-Hornedo derivaron un modelo matemático basado en la disociación e ionización de los cocrystal, el cual explica que la solubilidad de un cocrystal depende del pH, el  $pK_a$ , la estequiometría del cocrystal y la concentración de los coformadores. Así mismo, las propiedades de ionización del coformador van a influenciar la dependencia de pH del cocrystal (Maheshwari et al., 2012).

#### 4.6.1 Supersaturación de las NFS cocrystalinas

La ventaja en la solubilidad (SA, por las siglas en inglés *solubility advantage*) es la relación entre la solubilidad que presenta el cocrystal y la solubilidad del IFA (Ecuación 3).

$$SA = S_{\text{cocrystal}} / S_{\text{IFA}}$$

Ecuación 3. Ecuación de ventaja en la solubilidad

En los últimos años se ha utilizado la SA como parámetro para determinar la estabilidad de fase en solución de los cocrystal. Ya que cuando la solubilidad del cocrystal es 10 veces mayor a la del fármaco se produce el efecto de supersaturación en el medio. No obstante, la supersaturación es un efecto indeseado de las NFS ya que conduce a la precipitación del IFA libre, que es la forma más estable en solución pero también la más insoluble (Huang *et al.*, 2019).

Otro parámetro clave para determinar la estabilidad termodinámica de los cocrystal, así como su solubilidad, es *la constante eutéctica* ( $K_{eu}$ ), la cuál es directamente proporcional al cuadrado de la SA. Este se determina cuando el cocrystal se encuentra en equilibrio con sus componentes en solución y se pueden determinar las concentraciones eutécticas del fármaco y coformador (Kuminek *et al.*, 2019); matemáticamente se define como:

$$K_{eu} = \frac{[\text{coformador}]_{eu}}{[\text{IFA}]_{eu}} = \left( \frac{S_{\text{cocrystal}}}{S(\text{IFA})} \right)^2 = SA^2$$

Ecuación 4. Ecuación de punto eutéctico

Donde  $K_{eu}$  es la constante eutéctica y los términos entre paréntesis indican las concentraciones molares bajo las condiciones evaluadas (Huang *et al.*, 2019). Valores de  $K_{eu} < 1$  indican que el cocrystal es menos soluble que el fármaco, mientras que valores de  $K_{eu} > 1$  indican un cocrystal más soluble que el fármaco con la posibilidad de generar una solución supersaturada que mejore la absorción. No obstante, valores muy grandes de  $K_{eu}$  indican que la supersaturación del fármaco alcanzaría concentraciones muy altas lo que supone el riesgo de inducir una rápida precipitación del fármaco y una nula ventaja en la absorción (Good y Rodríguez-Hornedo, 2010). Por lo que, a pesar de la ventaja en solubilidad ganada de los cocrystal, la rápida precipitación impide mejorar la biodisponibilidad del IFA (Childs *et al.*, 2013). A este efecto se le conoce como *spring* (Figura 24). Debido a esto, el objetivo no se debe enfocar únicamente en incrementar la solubilidad del IFA, si no también se debe generar un estado meta-estable de supersaturación que se mantenga por un tiempo prolongado (Bavishi y Borkhataria, 2016). A este efecto se le conoce como *spring-parachute* (Figura 25), y fue acuñado por primera vez en

cocrisales por Remenar y colaboradores en el año 2007. El área bajo la curva (ABC) funcionará como indicador del estado meta-estable del cocrisal, ya que es directamente proporcional a la disolución, pero inversamente proporcional a la precipitación (Kuminek *et al.*, 2019).

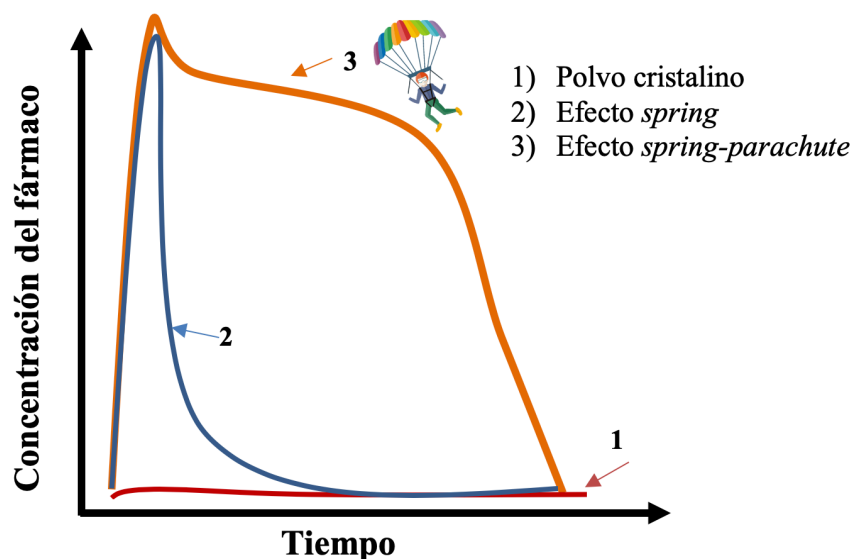


Figura 25. Concepto *spring-parachute* para alcanzar la solubilidad de fármacos insolubles. (1) forma cristalina poco soluble; (2) cocrisal cuya solubilidad cae rápidamente; (3) forma del fármaco soluble que se mantiene en la zona metaestable.

Puesto que TDF presenta muy baja solubilidad ( $3\mu\text{g/mL}$ ), no es sorpresa que los cocrisales de TDF sintetizados hasta el momento presenten supersaturación y precipiten inmediatamente, efecto *spring*. Por lo cual utilizando únicamente la cocrisalización (*i.e.*, TDF-D-Málico, TDF-MOA, TDF-Metilparabeno), no se logra incrementar el ABC de TDF. El punto crítico actual en la formación de NFS de TDF, es generar un sistema en el cual se encuentren en una fase meta-estable, y así inhibir su pronta precipitación (Carlos-Martínez, 2017; Shimpi *et al.*, 2018; Alvani *et al.*, 2019).

#### 4.6.2 Inhibición de la precipitación de NFS cocrisalinas

Para alcanzar un estado meta-estable del cocrisal, por un tiempo más prolongado, se ha demostrado que el uso de los excipientes adecuados (polímeros



y surfactantes) puede minimizar o retardar el efecto de precipitación del IFA, por el estado de supersaturación de las NFS (Gao y Shi, 2012).

El efecto inhibitor de la precipitación de los cocrisales se observó en el año 2013, Childs y colaboradores presentaron cocrisales de danazol:vainillina 1:1, el cual incrementaba únicamente el ABC 1.7 veces. Sin embargo, cuando se formulaba con una mezcla de excipientes, TPGS (d-alfa polietilenglicol 1000 succinato) como solubilizante, e HPC (hidroxipropil celulosa) como polímero inhibitor de la precipitación (PIP), el incremento en el ABC era 10 veces mayor, tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 26). Por lo que esta estrategia resultó novedosa y efectiva, para incrementar el ABC de los cocrisales.

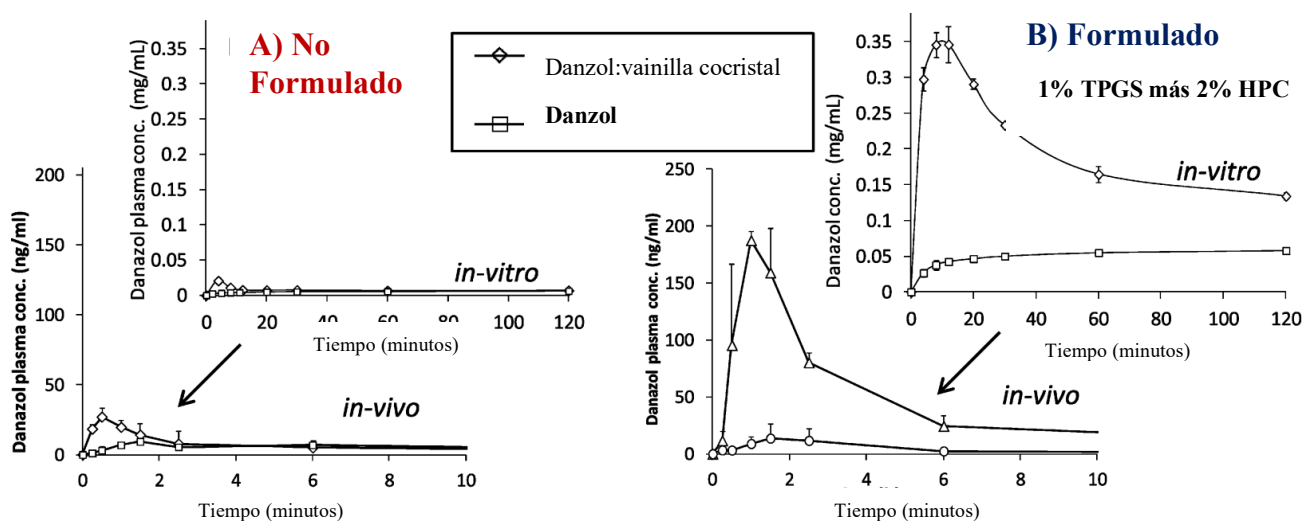


Figura 26. Disolución *in vitro* y concentración del plasma *in vivo* del IFA danazol y el cocrystal, mostrado A) sin formulación y B) formulado con 1% TPGS y 2% HPC (Childs et al., 2013).

El proceso descrito anteriormente se originó debido a las interacciones físicas, químicas o ambas, entre el polímero y el cocrystal, las cuales pueden modificar la solubilidad del IFA, la barrera de viscosidad entre el IFA y el disolvente, la movilidad molecular y/o la solvatación interfacial. Estos procesos afectan las tasas de nucleación y crecimiento del cristal, procesos involucrados en la precipitación del cocrystal (Gao y Shi, 2012).

Shimpi y colaboradores en el año 2018, compararon los perfiles de disolución del cocrystal de TDF reportado anteriormente por Hannah *et al.* (2013) con el ácido malónico (MOA), en la ausencia y presencia del polímero hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), el cual actuaría como PIP. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 27, en los cuales se demostró que la HPMC en una concentración 0.1% m/v podía prolongar la concentración alcanzada del cocrystal TDF-MOA y de TDF amorfo, debido a la inhibición de su nucleación (Shimpi *et al.*, 2018).

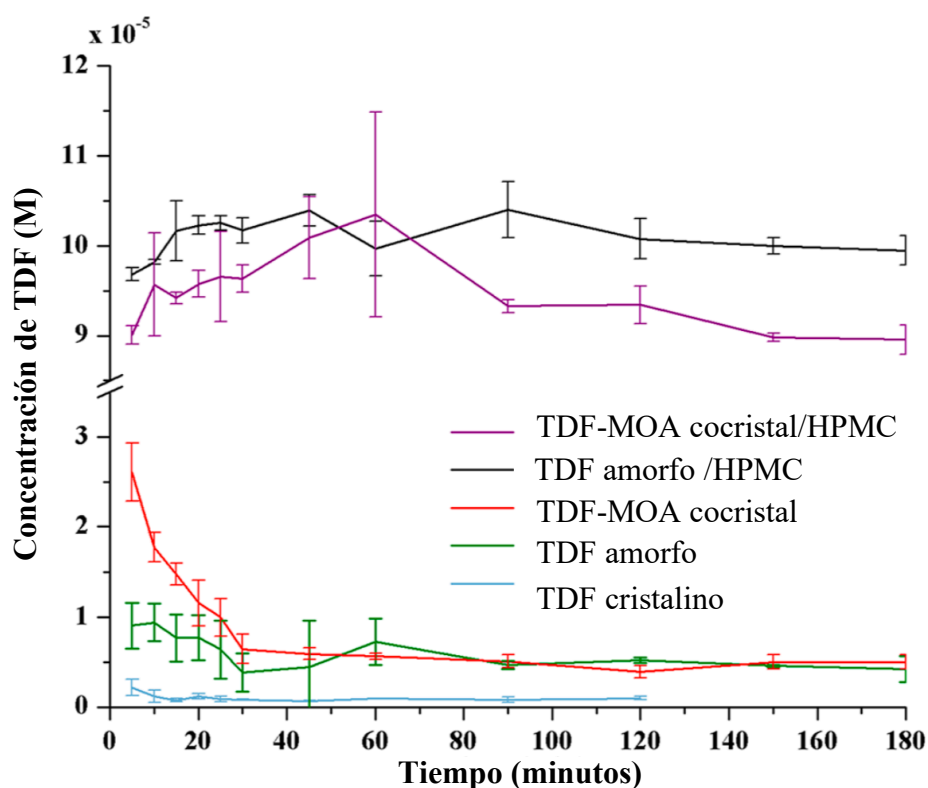


Figura 27. Perfil de velocidad de disolución de diferentes formas sólidas de TDF en buffer de fosfatos pH 6.8.  $\pm$  DE, n=3. Modificada de Shimpi *et al.*, 2018.

Así mismo, Alvani y colaboradores, en el año 2019, realizaron estudios de pre-formulación con el cocrystal de TDF-metilparabeno (TDF-MPB), previamente sintetizado por el grupo de investigación de Zaworotko en el año 2012. Este cocrystal tiene un valor de  $K_{eu}$  de 57, el cual es relativamente alto, ya que como se había especificado en la sección 4.5.4.1 los valores de  $K_{eu}$  mayores a 1 proponen riesgo de supersaturación y precipitación de los cocrystalos. Por los que el cocrystal por si sólo

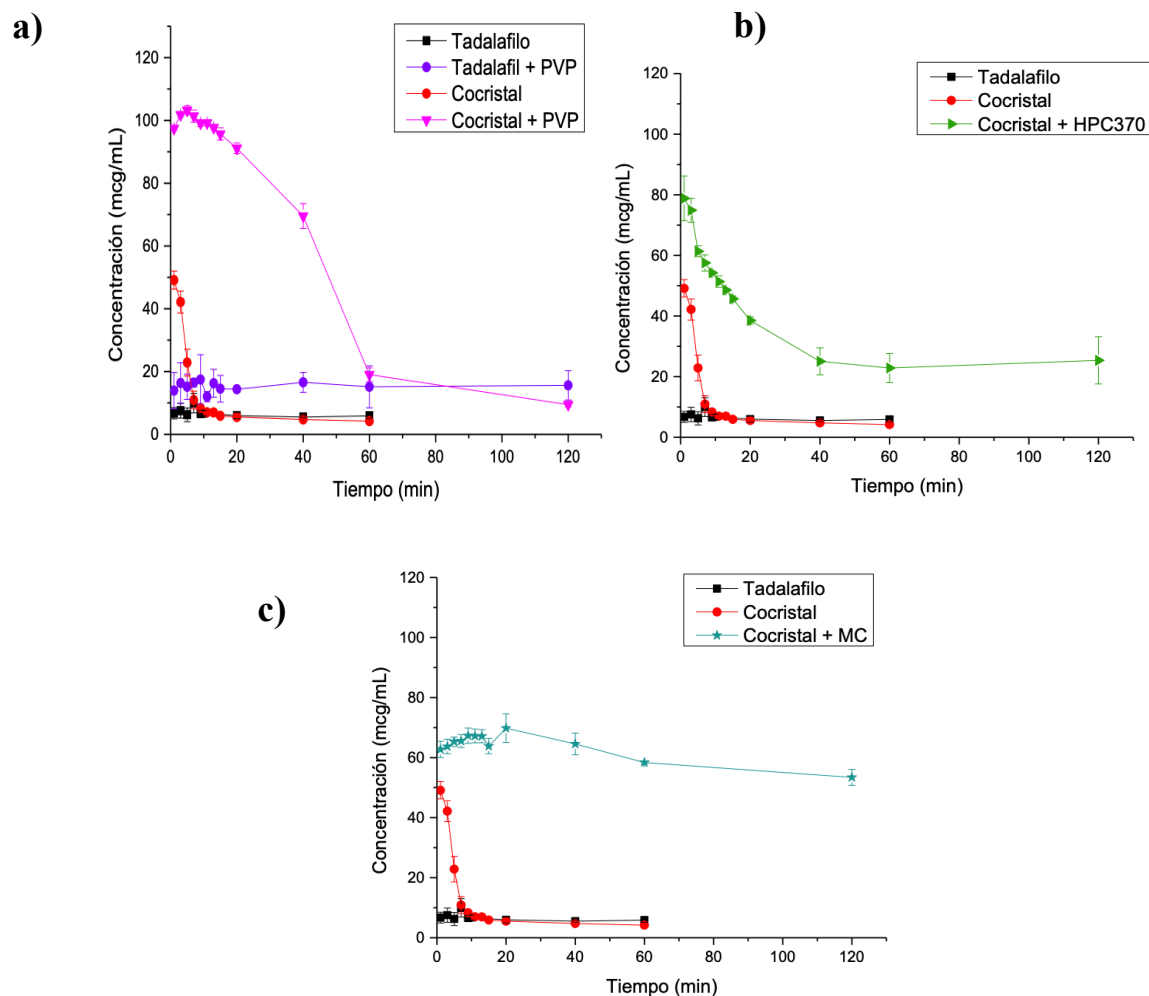
no mejorará la velocidad de disolución de TDF, y por ende tampoco su absorción. Por consiguiente, se utilizó lauril sulfato de sodio (SLS) y polivinilpirrolidona (PVP), en diferentes proporciones, como inhibidores de la precipitación de TDF. Se determinaron las  $K_{eu}$  (Tabla 6), y se concluyó que ambos excipientes podían estabilizar la SA del cocrystal.

**Tabla 6.  $K_{eu}$  del cocrystal TDF-MPB en solución de buffer de fosfatos (PBS, pH= 6.8) en la presencia de diferentes concentraciones de SLS y PVP. Modificada de Alvani *et al.*, 2019**

Medio	$K_{eu}$	Solubilidad termodinámica (mM) $\pm$ DE
PBS	57	1.5 $\pm$ 0.11
PBS +SLS 0.2%	39.7	0.75 $\pm$ 0.075
PBS +SLS 3%	8.0	3.46 $\pm$ 0.481
PBS + PVP 0.5%	0.7	0.39 $\pm$ 0.022
PBS + PVP 1%	0.4	0.60 $\pm$ 0.062
PBS + PVP 2%	0.1	0.47 $\pm$ 0.089

Por último, en nuestro grupo de investigación se ha realizado una búsqueda exhaustiva de PIP que inhiban la precipitación de los cocrystal de TDF o prolonguen el efecto de solubilización. En la tesis de Carlos-Martínez en el año 2017 se trabajó específicamente con el cocrystal de TDF con D-málico (TDF-Dmal), el cual sobresalía ante los demás cocrystal sintetizados en el grupo de investigación (sección 4.5.1) por estar libre de acetonitrilo en su red cristalina. No obstante TDF-Dmal incrementaba únicamente la solubilidad de TDF de 0.58 mg/mL a 0.63 mg/mL. Por lo cual en el trabajo de Carlos-Martínez se utilizó el método de *solvent shift* para determinar que polímeros desplazaban el punto de saturación de TDF, y se analizaron los polímeros derivados de celulosa (MC, HPMC y HPC), de polietilenglicol (PEG E 300 y PEG BLOCK) y polivinilpirrolidona (PVP). Dado su comportamiento fisicoquímico, los polímeros HPC 370, MC y PVP, fueron seleccionados para los estudios de solubilidad y disolución con TDF-DMAL (Figura 28), los cuales consistían en añadir los PIP en una concentración del 0.5% al medio

de disolución y se evaluaba el comportamiento del cocrystal y de TDF, con y sin polímeros. De los tres sobresalió el PIP MC, el cual logró prolongar por mayor tiempo (120 minutos) la concentración de TDF alcanzada por el cocrystal, incrementando hasta 10.9 veces la cantidad disuelta de tadalafilo.



*Figura 28. Perfiles de disolución de TDF y cocrystal TDF-DMAL ± DE, en pH 1.6, utilizando una concentración de 0.5% de los polímeros a)PVP; b) HPC 370; c)MC. Tomado de la Tesis de Carlos-Martínez, 2017.*

Por lo que la cocrystalización en conjunto con el PIP adecuado surge como una alternativa óptima para mejorar las propiedades fisicoquímicas de los IFAs, y por ende se podría mejorar la solubilidad de TDF por este método.

## 5. Justificación

La disfunción eréctil es un padecimiento que afecta alrededor de 150 millones de hombres a nivel mundial, siendo los fármacos inhibidores de la fosfodiesterasa 5 los de primera elección para su tratamiento. Entre estos destaca TDF debido a su mayor tiempo de vida media, y a su gran selectividad por la PDE-5. No obstante, TDF es prácticamente insoluble en agua (3 µg/mL), y presenta un inicio de acción de hasta 6 horas (T<sub>max</sub>), debido a su baja absorción. Esto puede crear ansiedad al momento de estar con la pareja y desconfianza del medicamento, lo que lleva a un desapego o cambio de tratamiento (Carson y Lue, 2005).

Diversas técnicas de formulación se han utilizado para mejorar la solubilidad de TDF, tales como las dispersiones sólidas, el uso de ciclodextrinas, nano suspensiones o uso de surfactantes ; sin embargo, estas no han logrado mejorar la biodisponibilidad de TDF hasta el momento. Se ha demostrado anteriormente que los cocristales son una estrategia efectiva para mejorar la solubilidad de los fármacos; en el grupo de investigación se han generado NFS con coformadores de ácidos hidroxibenzoicos, L-tartárico y D-málico. Sin embargo, las fases se sintetizaron con acetonitrilo, lo que implica un mayor reto para la industria farmacéutica, al tener que demostrar la ausencia de este disolvente en las etapas de producción, al no ser farmacéuticamente aceptable.

Por otra parte, se ha observado que ciertos cocristales son propensos a precipitar al estar en contacto con una solución, y por ende no se logra mejorar la solubilidad del fármaco por el tiempo necesario para impactar en la cantidad absorbida de TDF. Ante esta problemática, se proponen estudios de pre-formulación, utilizando polímeros como inhibidores de la precipitación, que mantengan la saturación del cocrystal por un tiempo más prolongado.

Debido a todo lo anterior, en este trabajo de tesis se propuso la formación de cocristales de TDF, utilizando una serie de coformadores tales como los nutracéuticos, mediante síntesis con disolventes farmacéuticamente aceptables (pertenecientes a los grupos III o IV de la FDA). Así mismo, se utilizaron PIP

especialmente de metilcelulosa, y se determinó su efecto en la disolución de TDF y en las NFS sintetizadas. Con esto se espera mejorar la solubilidad de TDF a un punto donde la ventaja de la solubilidad sea favorable para incrementar la concentración disuelta de TDF y por ende su biodisponibilidad.

## **6. Hipótesis**

Si se obtienen nuevas fases sólidas cocrystalinas de tadalafilo en combinación con compuestos nutracéuticos, bajo condiciones farmacéuticamente aceptables, y se usa en conjunto un polímero adecuado para inhibir su precipitación, se inducirá una mejora sobre su desempeño biofarmacéutico de tadalafilo.

## **7. Objetivos**

### **7.1 Objetivo general**

Sintetizar y caracterizar nuevas fases sólidas de tadalafilo en combinación con moléculas nutracéuticas y estudiar sus propiedades biofarmacéuticas incluyendo el uso de polímeros inhibidores de la precipitación.

### **7.2 Objetivos específicos**

- Realizar el análisis estructural del IFA para seleccionar potenciales coformadores para la formación de nuevas fases sólidas (NFS) de tadalafilo.
- Llevar a cabo la búsqueda de NFS, a partir de mezclas de tadalafilo con una serie de coformadores mediante la reacción mecanoquímica, en presencia de disolventes farmacéuticamente aceptables.
- Caracterizar el producto obtenido a través de Difracción de Rayos X de Polvos (DRXP), para distinguir la formación de NFS.
- Realizar la caracterización de las NFS encontradas por espectroscopia infrarroja (IR), análisis termogravimétrico (TGA), y calorimetría de Barrido Diferencial (DSC).
- Establecer las condiciones de escalamiento a nivel de gramos de las NFS de

tadalafilo seleccionadas.

- Evaluar las propiedades biofarmacéuticas (estabilidad de fase, disolución de polvos, solubilidad) de las NFS seleccionadas.
- Realizar estudios de preformulación con polímeros inhibidores de la precipitación de la NFS de tadalafilo seleccionada.

## 8. Materiales y Métodos

### 8.1 Materiales

#### 8.1.1 Reactivos

A continuación se presentan los reactivos empleados en este trabajo, entre paréntesis se muestran las compañías donde estos se adquirieron.

- Tadalafilo. Lote: 16002GSRV2 (Muestra donada por Laboratorios Senosiain S.A. de C.V.)
- L-Prolina. Lote: SLBZ0158 (SIGMA-ALDRICH)
- Resorcinol. Lote: MKBC1296 (SIGMA-ALDRICH)
- Cafeína anhidra. Lote: 1479 (Monterrey)
- Resveratrol. Lote: 1609023047 (Evolva)
- Fosfato de sodio monobásico anhídrido. Lote: 616409 (Fermont)
- Fosfato de sodio dibásico anhídrido. Lote: 3828-01 (J.T. Baker)
- Acetona grado técnico
- Methocel A-15. Lote: ID3042 (Colorcon)
- Metanol (J.T. Baker)
- Acetonitrilo (J.T. Baker)
- Ácido clorhídrico (J.T. Baker)
- Hidróxido de Sodio (Sigma Aldrich)
- Dimetilsulfóxido (Fluka analítical)

#### 8.1.2 Equipos

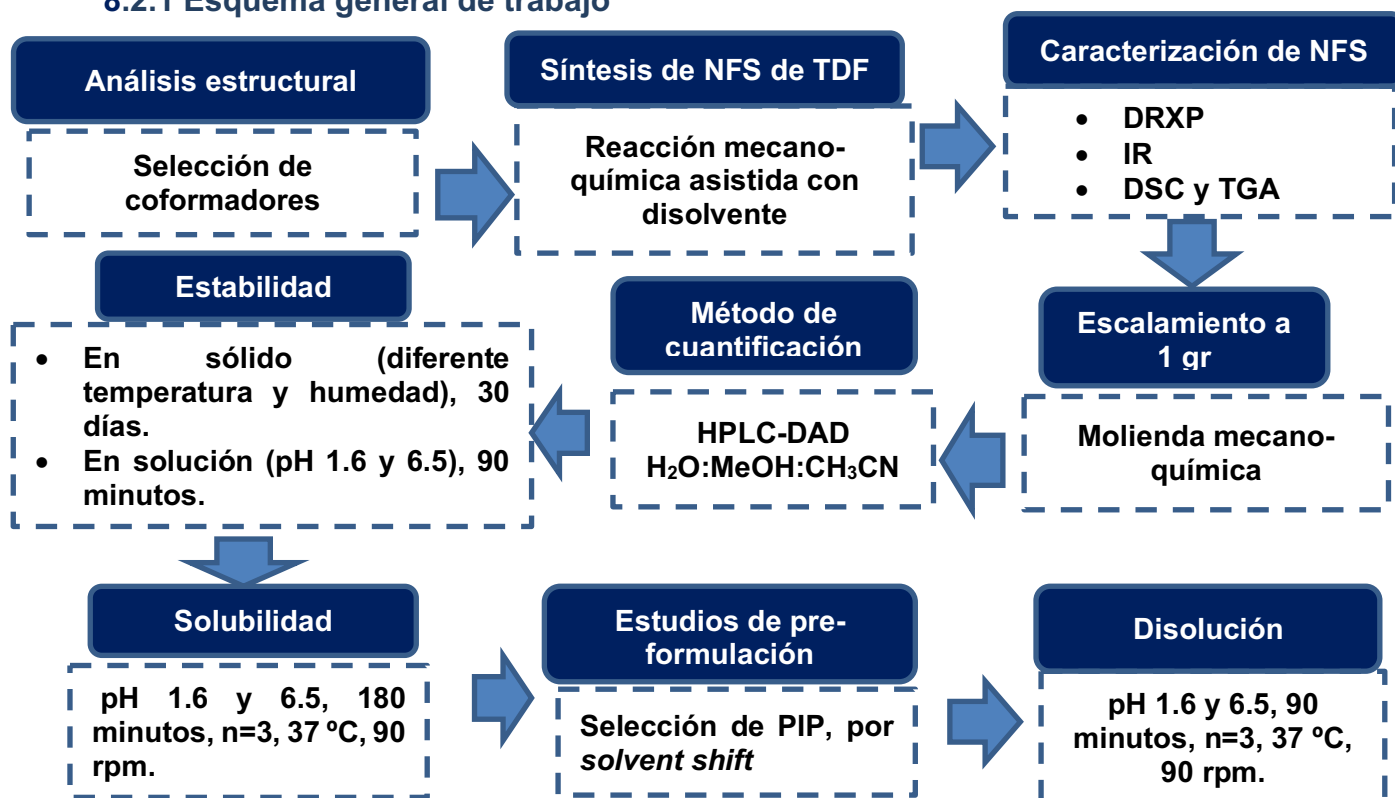
- Balanza analítica OHAUS Adventurer
- Parrilla eléctrica con agitación magnética CIMAREC
- Potenciómetro CONDUCTRONIC pH 120
- Bomba de vacío VACCUBRAND RZ 2.5
- Sonicador de medios BRANSON 2800
- Destilador de agua URELAB Option-R 7/
- Desionizador de agua PURELAB Classic UVF
- Espectrofotómetro de UV-Vis Varian CARY 50



- Equipo personal Reaction Station J-KEM® Scientific
- Molino Retsch® MM200
- Difractómetro BRUKER D2-PHASER (Detector Lynxeye  $\lambda$ Cu-Ka1=1.5406 [Å], monocromador: germanio)
- Difractómetro BRUKER D8 Advanced (Detector Lynxeye 1D Mode, tubo de Cu=1.54184[Å] )
- Espectrofotómetro de Infrarrojo Thermo Scientific Nicolet iS50 con transformada de Fourier (FT-IR)
- TGA-DSC TA SDT Q-200
- HPLC 1260 Agilent Infinity II, con un detector de arreglo de diodos (DAD).
- Columna C18 Agilent Technologies de 15cm x 4.5 m, de 5  $\mu$ m

## 8.2 Métodos

### 8.2.1 Esquema general de trabajo



Esquema 2. Esquema general de trabajo para la síntesis y evaluación de cocrystalos de Tadalafilo.

### 8.2.1 Análisis estructural de Tadalafilo y coformadores

*Mercury*® y *Hermes*® son los softwares por excelencia para visualizar en 3D las estructuras cristalinas reportadas en la base de datos de Cambridge (CCDC). Ambos están vinculados con la herramienta *CSD-Materials*, la cual es útil para el estudio del estado sólido y las interacciones intermoleculares. Las principales funciones de esta herramienta, de interés para este trabajo, es el análisis de las interacciones por puentes de hidrógeno y el mapeo de preferencias de interacción (Vologzhanina, 2019).

En este trabajo se realizó el análisis estructural del IFA a partir de la estructura cristalina de TDF reportada en la base de datos cristalográficos de Cambridge (*Ref code*: IQUMAI). A través del análisis intramolecular de TDF, se visualizó su crecimiento en el cristal y se identificaron los grupos formadores de puente de hidrógeno. Con este análisis se determinó el tipo de interacciones que podría establecer TDF con los coformadores, para los cuales se contemplaron a los compuestos nutracéuticos y aminoácidos; tales como resveratrol (Rsv), resorcinol (Res), cafeína (Caf) y L-prolina (LPro), por la presencia de grupos formadores de puente de hidrógeno en sus estructuras, además de los beneficios a la salud que otorgan. A través de la herramienta de *Mercury CSD-Materials* se predijo la posibilidad de interacción entre el IFA y los coformadores con base en sus distintas conformaciones, para complementar el análisis de los sólidos.

### 8.2.3 Síntesis de Nuevas Fases Sólidas de Tadalafilo

Para la síntesis de NFS de TDF se utilizó la reacción de molienda mecano-química (RxM), asistida con disolvente mediante un molino marca Restch® modelo MM400. Se utilizaron contenedores de acero inoxidable (Figura 29), de una capacidad de 1.5 mL, a los cuales se les agregaron 50 mg de la relación molar 1:1 fármaco: coformador. Posteriormente se les depositó una esfera de acero inoxidable de 7 mm de diámetro, y se añadieron 10 µL de los diferentes disolventes (acetona o agua); también se probó la condición sin disolvente. Los contenedores, ya cerrados, se colocaron en el molino con las condiciones de 20 Hz por 15 minutos.



*Figura 29. Contenedores de acero inoxidable de Molino Restch ® de capacidad de 100 mg.*

Así mismo se analizaron las relaciones molares 1:2 y 2:1 fármaco: coformador, y se probaron condiciones de molienda de 25 Hz, 30 minutos y 20  $\mu$ L de disolvente. Los polvos obtenidos fueron retirados de los contenedores y secados a temperatura ambiente, para caracterizarlos posteriormente.

#### **8.2.4 Caracterización**

Los productos obtenidos de la RxM, así como las materias primas, se caracterizaron inicialmente por DRXP. Aquellos productos cuyos patrones de difracción fueron diferentes a los de las materias primas, fueron analizados posteriormente por espectroscopia infrarroja (IR), calorimetría de barrido diferencial (DSC) y análisis termogravimétrico; de igual forma se compararon con los materiales de partida.

##### 8.2.4.1 Difracción de Rayos X de Polvos

La DRXP se llevó a cabo colocando una pequeña cantidad del sólido obtenido en el centro del porta-muestras, utilizando el porta-muestra fondo bajo (Figura 30). En las etapas iniciales del trabajo se utilizó el difractómetro BRUKER D8-ADVANCED (Detector Lynxeye 1D Mode, tubo de Cu=1.5406 Å) Posteriormente se realizó el estudio en un equipo BRUKER D2 Phaser con un detector LynxEye ( $\lambda_{\text{Cu-K}\alpha 1}$ = 1.54184 Å, monocromador: germanio). Los datos se colectaron a temperatura ambiente en un rango de  $2\theta$ = 5-45° (tamaño de paso = 0.0303°, tiempo por cada paso = 0.300 s), y fueron analizados posteriormente en el software OriginPro ®.



*Figura 30. Portamuestra con acabado de fondo bajo utilizado para DRXP.*

#### 8.2.4.2 Espectroscopía Infrarroja

El análisis de IR se llevó a cabo en un espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet 6700 con transformada de Fourier (FT-IR), equipado con un porta-muestra de diamante ATR (por sus siglas en inglés, Attenuated Total Reflection). Para el análisis se colocó una pequeña cantidad del sólido sobre la superficie diamante del equipo y se realizaron 128 escaneos en una longitud de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  para obtener el espectro final. Los datos fueron analizados utilizando el software Omnic<sup>®</sup>, y se compararon los diferentes desplazamientos de bandas en los espectros.

#### 8.2.4.3 Análisis Térmico (DSC y TGA)

Los análisis térmicos se realizaron en los equipos TA Instruments Q-50 y SDT Q2000 (Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana) respectivamente, en un intervalo de temperatura de 25-450 °C, en una atmósfera de  $\text{N}_2$ . Las muestras se pesaron y se colocaron en una charola de calentamiento especial de platino, y se introdujeron al equipo. Para el análisis de DSC-TGA se utilizó una rampa de calentamiento de 10 °C/min hasta llegar a los 400 °C. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software TA Universal Analysis<sup>®</sup>.

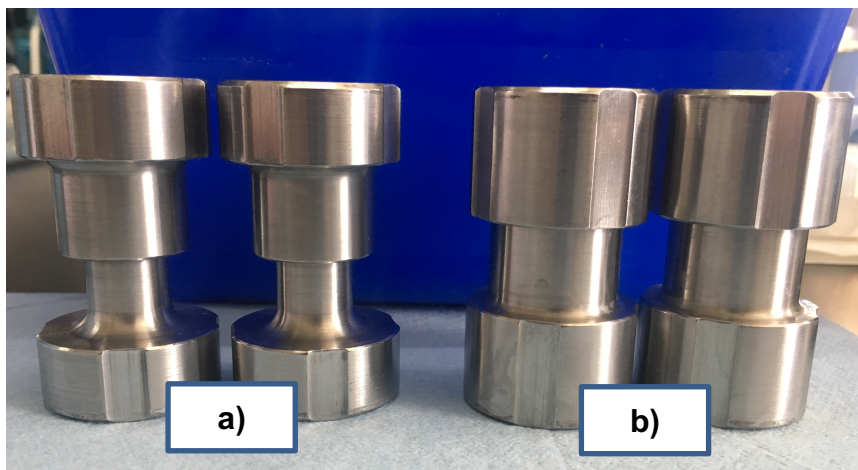
Una vez realizada la caracterización completa de las NFS se prosiguió con el escalamiento a gramos.

#### **8.2.5 Escalamiento de cocrisales farmacéuticos**

La síntesis de la NFS de TDF en una proporción de 500mg (10 veces mayor a los experimentos de cribado) se llevó a cabo en el Molino Restch<sup>®</sup>, utilizando los contenedores de capacidad de 5 mL, mostrados en la figura 31 en la proporción

molar 1:1 fármaco:coformador en cada contenedor. Así mismo, se incrementó el volumen de disolvente, utilizando 100  $\mu\text{L}$  o 200  $\mu\text{L}$ , según fuera el caso. Las condiciones de molienda no fueron modificadas de la síntesis inicial de cada NFS.

El producto obtenido se caracterizó por DRXP para comprobar su identidad, y se comparó con el patrón de difracción de la fase ya caracterizada previamente.



*Figura 31. Contenedores de acero inoxidable del Molino Restch.  
a) Capacidad de 1.5 mL, b) Capacidad de 5 mL.*

### **8.2.6 Estudios de estabilidad de fase.**

Para los estudios de estabilidad de fase en estado sólido (estabilidad indicativa), se colocaron 30 mg de TDF, coformadores y NFS en cámaras con humedad relativa (HR) y temperatura controlada en las instalaciones de Laboratorios Senosiain S.A. de C.V. Se utilizaron las siguientes condiciones: a) 40 °C calor seco, en cámara Revco Incubator Chamber RI-23-1060-ABA, b) 50 °C calor seco, en cámara Rios Rocha Chamber E0-51, y c) 40 °C 75% HR, en cámara Binder Climatic Chamber IP 20. Los sólidos se mantuvieron en las cámaras por 30 días, y se evaluaron posteriormente por DRXP. La estabilidad de los sólidos se estableció al comparar los patrones de difracción obtenidos al finalizar el experimento, con los analizados previamente.

En los estudios donde se evalúa la transformación de fase mediada por la

solución se utilizó la solución de HCl 0.1N pH 1.6 y el buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.5. Se evaluó al fármaco y a las NFS, colocando 150 mg de muestra en 10 mL de solución, en condiciones de temperatura y agitación constante (37 °C y 90 rpm). Se recolectaron muestras utilizando una jeringa de 3 mL, en los siguientes intervalos de tiempo: 1,2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 20, 40, 60 y 90 minutos. Estas muestras fueron filtradas mediante swinex y filtro Whatman de 3 cm, y se dejaban secar por 24 horas. Posteriormente se analizaban por DRXP, para comparar el patrón obtenido con el de referencia.

### 8.2.7 Desarrollo y evaluación de un método de cuantificación de Tadalafilo por HPLC

Se desarrolló un método de cuantificación de TDF por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), el cual también permite cuantificar al coformador resorcinol. El método se llevó a cabo en un HPLC Agilent Infinity II con un detector de arreglo de diodos (DAD). Se utilizó una columna C18 de 15cm x 4.5 m, de 5 µm (Agilent) a 40 °C, con un volumen de inyección de 60 µL. Para la fase móvil se utilizó un método de gradiente (Tabla 7) con diversas proporciones v/v/v de H<sub>2</sub>O, metanol (MeOH) y acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN), con un flujo de 1mL/min y un tiempo de corrida de 7 minutos. Las muestras se evaluaron a las longitudes de onda de 243 y 280 nm.

**Tabla 7. Gradiente de solventes utilizados para la cuantificación de TDF por HPLC**

Tiempo (min)	H <sub>2</sub> O	MeOH	CH <sub>3</sub> CN
0	50%	35%	15%
0.8	40%	15%	45%
4.5	50%	35%	15%

Para la curva de calibración de TDF, se preparó una solución madre con una concentración de 140 µg/mL. Para esto, se pesaron 7 mg de TDF y se colocaron en un matraz aforado de 50 mL; al cual se le añadieron 30 mL de MeOH y se dejó sonicando por 10 minutos. Posteriormente se aforó con agua destilada, y se tomaron alícuotas como se muestra en la Tabla 8, para obtener las concentraciones deseadas. Los matraces de la curva se aforaron con una solución 50:50 de H<sub>2</sub>O: MeOH, sonicada y filtrada previamente.

**Tabla 8. Concentraciones de curva de calibración de TDF a partir de solución madre de TDF 140 µg/mL.**

<i>Alícuota</i>	<i>Matraz aforado</i>	<i>Concentración</i>
1 mL	5 mL	28 µg/mL
1 mL	10 mL	14 µg/mL
0.8 mL	10 mL	11.2 µg/mL
0.4 mL	10 mL	5.6 µg/mL
0.2 mL	10 mL	2.8 µg/mL

Asimismo, se establecieron los valores de límite de detección (LD) y cuantificación (LQ) del método. El LD y LQ, se determinaron a partir del promedio de las pendientes (m) y la desviación estándar (DE) de los interceptos (b) de cada curva de calibración donde se evaluó linealidad (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos México, 2002). Estos parámetros se calcularon a partir de las siguientes fórmulas:

$$LD = \frac{3.3 * DE * b}{m}$$

Ecuación 5. Determinación del límite de detección (LD).

$$LQ = \frac{10 * DE * b}{m}$$

Ecuación 6. Determinación del límite de cuantificación (LQ).

La adecuabilidad se determinó inyectando 5 repeticiones de una concentración del analito conocida, y se estableció para área y tiempo de retención ( $t_R$ ). La linealidad y precisión se evaluaron según los parámetros para validación de métodos de la NOM-177-SSA1-2013: coeficiente de correlación (r) mayor o igual a 0.99, y porcentaje de variación del factor de respuesta (%CV) menor o igual al 2%, respectivamente.

## 8.2.8 Evaluación Biofarmacéutica

### 8.2.8.1 Estudio de solvent-shift para la selección de polímeros de prueba.

En estudios anteriores se ha utilizado el método de *solvent shift* para determinar el punto de saturación de un fármaco de interés, utilizando como disolvente DMSO para fármacos insolubles en agua. Así mismo, para determinar el efecto de los PIP en el punto de saturación de los IFAs (Yamashita *et al.*, 2011). A través de este método se determinó el punto de saturación de TDF, utilizando una solución stock de 2 mg/mL TDF en DMSO. Para iniciar este análisis se agregaron 3 mL de una solución de HCl pH 1.6 a la celda de cuarzo conteniendo un agitador magnético; se obtuvo el blanco por espectrofotometría UV-Vis, utilizando un equipo marca Varian, a una longitud de onda de 400 nm (longitud a la cual no absorbe el TDF). La celda se mantuvo en agitación constante mientras se le añadían 5  $\mu$ L de la solución stock de TDF, cada 3 minutos, y se hacía la lectura por UV-Vis. Se determinó el punto de saturación del fármaco, cuando se empezaba a observar un aumento en la línea base en el espectro, y en la celda aparecía el precipitado del IFA (Figura 32). Este experimento se llevó a cabo por 25 minutos en un intervalo de 6.64  $\mu$ g/mL a 76.92  $\mu$ g/mL de TDF añadido, y se realizó por triplicado bajo las mismas condiciones.



*Figura 32. Celda de cuarzo con precipitado observado en punto de saturación de TDF, por método de solvent shift.*



Para determinar el efecto de los PIP en el punto de saturación de TDF, se utilizó de igual forma el método de *solvent shift*. La diferencia fue que se agregó en la celda de cuarzo 3 mL de una solución de HCl pH 1.6 conteniendo el polímero en estudio en una concentración del 0.5% (p/v) ; a esta celda se le agregaron alícuotas de 10 µL de una solución stock de 5 mg/mL TDF en DMSO, cada 3 minutos, y se analizó por UV-Vis. Este análisis fue realizado hasta observar la saturación de TDF en el espectro y la celda, y se llevó a cabo por triplicado.

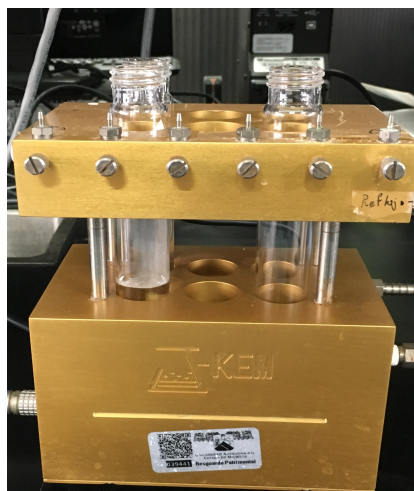
#### 8.2.8.2 Disolución de Polvos

Se realizó el estudio de disolución en polvos utilizando condiciones *no sink*, en una estación de reacción personalizada J-KEM® Scientific (Figura 33), a temperatura y agitación constantes ( $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  y 90 rpm). Se utilizaron como medios de disolución la solución de HCl 0.1M pH 1.6 y el buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.5, los cuales emulan el pH gástrico e intestinal en los que se absorbe el TDF respectivamente. Se realizó el experimento en ausencia y presencia del PIP en una concentración del 0.5% p/v. Se utilizaron tubos de ensaye de 50 mL a los cuales se les adicionaron 150 mg del fármaco o de las NFS, y una barra de agitación magnética de 12 mm x 4 mm. El experimento comenzó una vez que se agregaron 10 mL del medio de disolución. Se tomaron alícuotas de 2 mL en los siguientes intervalos de tiempos: 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 20, 40, 60 y 90 minutos; se filtraron a través de un porta filtro swinex con filtro Whatman grado 3 (3 cm). El medio de disolución se reponía inmediatamente después de cada toma de muestra, con el mismo medio previamente atemperado.

Para la cuantificación de las muestras, se tomaron 900 µL de las alícuotas y se diluyeron con 100 µL de MeOH en viales para HPLC de 2 mL, en el caso del estudio sin PIP. Cuando se utilizó el polímero en la prueba, la dilución empleada fue de 6:4 muestra:MeOH para las NFS, y 4:6 para TDF. Las muestras fueron cuantificadas por el método de HPLC previamente descrito. El experimento se realizó por triplicado.

Este experimento fue replicado utilizando mezclas físicas con relación molar 1:1

entre el fármaco y el coformador, para poder determinar el efecto de la cocrystalización en la disolución de TDF.



*Figura 33. Estación de reacción personalizada J-KEM® Scientific para prueba de disolución de polvos*

#### 8.2.8.3 Solubilidad al equilibrio y aparente

Para poder determinar el cambio entre la solubilidad de TDF y las NFS en los diferentes medios de disolución, en ausencia y presencia del PIP, se determinó la solubilidad al equilibrio de TDF, y la solubilidad aparente en el caso de las NFS. La solubilidad fue determinada a las 3 horas de estar el sólido en las diferentes soluciones bajo las condiciones de disolución de polvos ( $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  y 90 rpm), con una  $n=3$ . Se utilizó este tiempo debido a que la concentración de TDF ya no variaba conforme aumentaba el tiempo, por lo cual se mantenía estable, y se cumplía la aseveración de equilibrio en solución. Las muestras obtenidas se cuantificaron por el método de HPLC descrito anteriormente.

## 9. Resultados y Discusión

### 9.1 Análisis estructural de Tadalafilo

Para establecer las potenciales interacciones intramoleculares del IFA, se realizó el análisis estructural de la molécula de TDF considerando las estructuras cristalinas reportadas en el CCDC. Este análisis permite determinar las posibles interacciones que forma TDF con los coformadores, así como se determinó con los cocrystalos de TDF-Dmal y TDF-MOA (sección 4.5.1), los cuales forman un heterosinton con sus grupos carbonilo vía  $C=O \cdots H-O$  principalmente.

A través del software Mercury® se analizó el crecimiento cristalino de TDF (Figura 34a), y se observó que interactúa entre sí a través de puentes de hidrógeno, entre el oxígeno del grupo dicetopiperacina (O2 y O1 Figura 34b) que actúa como grupo aceptor, y el hidrógeno de la amina secundaria del grupo indol (HN3, Figura 34b), que actúa como grupo donador.

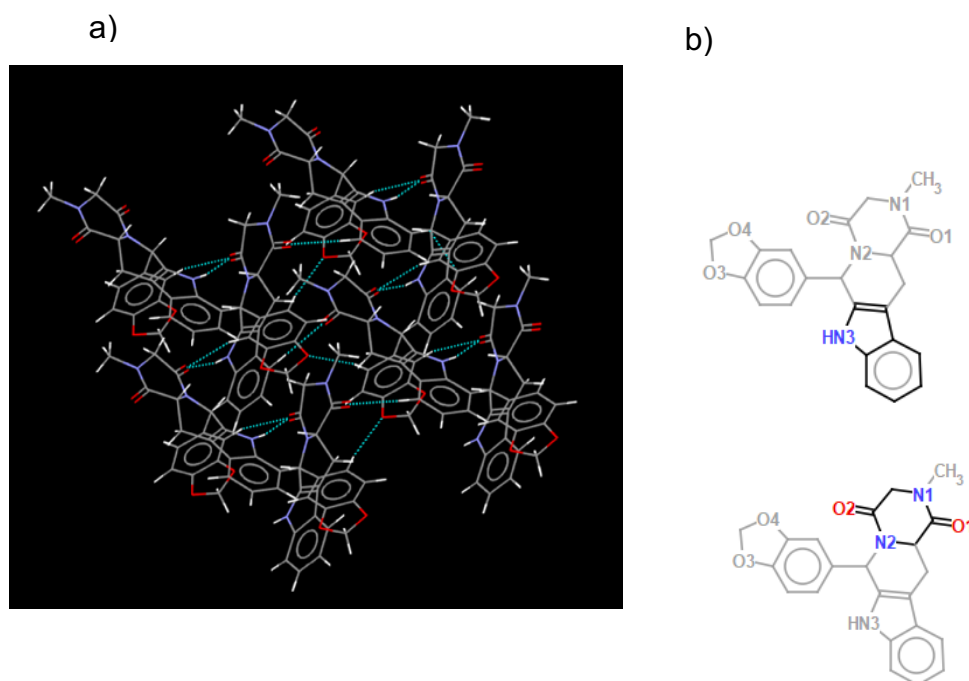
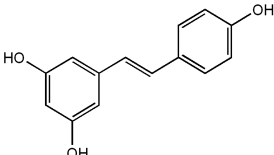
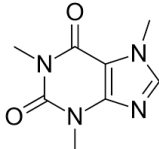
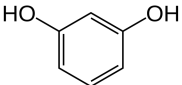
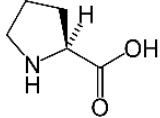


Figura 34. Tadalafilo: a) Estructura que muestra el crecimiento cristalino; b) grupos formadores de puente de hidrógeno. (REFCODE IQUMAI).

Para el *screening* inicial de la NFS se seleccionaron como cofomadores compuestos nutraceuticos (Tabla 8), los cuales además de contar con grupos formadores de puentes de hidrógeno, se les atribuyen funciones de mantenimiento y potenciación de la salud (DeFelice, 1997). Adicionalmente, estos nutraceuticos fueron seleccionados con base en diferentes parámetros, resorcinol (Res) y L-prolina (LPro) por su alta solubilidad en agua, cafeína (Caf) por la presencia de grupos aceptores de puente de hidrógeno y por el éxito que ha tenido en la síntesis de nuevos cocrisales, como se observó en el estudio de Kavanagh y colaboradores en el 2019. Resveratrol (Rsv), fue otro cofomador seleccionado, que presenta una menor solubilidad, sin embargo ésta es 10 veces mayor que la de TDF (intervalo recomendado para mejorar la solubilidad de los IFAs según Maheshwari *et al.*, 2012); así mismo se ha reportado anteriormente la formación exitosa de cocrisales con este cofomador (Martínez-Ocampo, 2017).

**Tabla 8. Cofomadores de interés para la formación de NFS de TDF.**

Cofomadores Nutraceuticos	
 <p>Resveratrol (Rsv) &lt;0.5 mg/mL*</p>	 <p>Cafeína (Caf) 21 mg/mL*</p>
 <p>Resorcinol (Res) 1,400 mg/mL*</p>	 <p>L-Prolina (LPro) 1, 500 mg/mL*</p>

\*Solubilidad en agua a 25 °C

Para determinar la probabilidad de interacción de TDF con los cofomadores para la formación de cocrisales se utilizó la herramienta *Full Interaction Maps* del programa Mercury® *CSDmaterials*. Esta herramienta establece las posibles interacciones entre las moléculas (*i.e.* IFA y cofomador) con base en su estructura

cristalina y en sus conformaciones. Tadalafilo tiene hasta 6 conformaciones de mayor estabilidad, las cuales pueden ser atribuidas a sus grupos benzodioxol e indol, los cuales tienen mayor libertad rotacional y en las estructuras cristalinas de TDF se encuentran en diferentes rotaciones, a diferencia de su grupo 2,5-dicetopierazina cuya conformación es plana. Asimismo, los coformadores al ser compuestos aromáticos no presentaron diferentes conformaciones, con excepción de LPro cuyo ciclo alifático es de 5 miembros y brinda la posibilidad de tener una conformación tipo sobre, la cual es común en los ciclopentanos. Los resultados de la probabilidad de interacción se muestran en la tabla 9, en la cual se observa que cafeína es el coformador con mayor probabilidad de interacción con TDF. El cocrystal TDF:Caf se daría vía N-H...O=C, por lo que el programa da preferencia a las interacciones a través del grupo donador de puente de hidrógeno de TDF, que a sus grupos aceptores.

**Tabla 9. Screening de interacción entre Tadalafilo y los coformadores, con sus respectivas conformaciones. Análisis realizado a través de Mercury CSDmaterials.**

Conformación de coformadores	TDF_01	TDF_02	TDF_03	TDF_04	TDF_05	TDF_06
Cafeína_00001	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
L-Prolina_00001	FAIL	FAIL	FAIL	FAIL	FAIL	FAIL
L-Prolina_00002	FAIL	FAIL	FAIL	FAIL	FAIL	FAIL
Resorcinol_00001	FAIL	FAIL	PASS	FAIL	FAIL	FAIL
Resveratrol_00001	FAIL	FAIL	PASS	FAIL	FAIL	FAIL

\*PASS: Interacción

\*FAIL: No interacción

**Probabilidad:** Cafeína cien por ciento, L-prolina cero por ciento, resorcinol diecisiete por ciento, resveratrol diecisiete por ciento.

## 9.2 Síntesis de NFS de Tadalafilo.

Para la búsqueda de NFS de TDF se han utilizado anteriormente las técnicas de cristalización y/o *slurry*, las cuales han tenido resultados variables en la formación de NFS. Por otra parte, la reacción de molienda mecanoquímica (RxM) se ha descrito como una técnica efectiva para crear nuevos conjuntos moleculares y supramoleculares, *i.e.* cocristales, a demás de ser amigable con el ambiente por la poca cantidad de disolvente que se necesita (Shan y Jones, 2002). Así mismo,

como se mencionó en la sección 4.5.1.2.1 la RxM puede ser realizada con mortero y pistilo o con molino de bolas, sin embargo en este trabajo se enfocó en el uso del molino de bolas para uniformar el tiempo y frecuencia de la reacción.

Las condiciones de la RxM iniciales fueron de 20 Hz y 15 minutos, debido a que son las condiciones previamente utilizadas por Carlos-Martínez, 2017 y se colocaron al fármaco y al coformador en relaciones molares de 1:1. Así mismo, ya que el uso del disolvente favorece la formación del cocrystal (Shan y Jones, 2002), se utilizaron el agua y la acetona como disolventes iniciales, respectivamente, por ser farmacéuticamente aceptables. También se realizó la reacción con ausencia de disolvente para evaluar su efecto en la formación de NFS de TDF.

Los sólidos obtenidos de la molienda se caracterizaron por DRXP. Para discernir entre una NFS o una mezcla física (MF) los patrones generados se compararon con los de las materias primas de partida. En la tabla 10 se observan los ángulos de difracción 2-Theta en los cuales se encuentran los principales picos de difracción de las materias primas

**Tabla 10. Principales picos de difracción de Tadalafilo y coformadores <sup>a</sup>**

Tadalafilo	7.3	10.65	14.56	18.42	21.77	24.22
Resveratrol	16.43	19.29	22.44	23.62	28.36	
Resorcinol	18.3	19.3	20.20	25.15	25.90	29.82
Cafeína	11.77	12.02	26.09	26.41	27.10	28.47
L-Prolina	14.7	15.2	18.09	18.53	20.98	24.82

<sup>a</sup> Valores en grados 2-Theta

En las figuras 35 y 36 se agrupan los patrones de difracción de los sólidos obtenidos en los experimentos de RxM de TDF con Rsv y Caf, respectivamente, usando agua, acetona o en ausencia de disolvente. En los experimentos con TDF y Rsv (Figura 35) se aprecia que en la presencia de agua o en ausencia de disolvente, se conservan los picos de difracción característicos de Tadalafilo en 7.3, 10.65, 18.42 y 21.77 °2-theta. En esos mismos difractogramas se aprecian picos en 19.29, 23.62 y 28.36 °2-theta, los cuales corresponden al Rsv. Estos resultados indican que la molienda no alteró la mezcla física de las materias primas bajo estas condiciones. En la figura 36, el patrón de difracción de los sólidos obtenidos en los experimentos de RxM de TDF y Caf en la presencia de agua o en ausencia de

disolvente, muestran la combinación de los picos característicos de las materias primas. Por ejemplo, Caf conserva los picos característicos en 11.77, 12.02, 26.41 y 27.10 °2-theta. A pesar de que cafeína es el coformador con mayor probabilidad de formación de NFS, de acuerdo con el análisis de *Full Interaction Maps*, no se vio favorecida bajo estas condiciones la formación de un NFS con el TDF, a pesar de que se probaron diferentes relaciones molares (Anexo II).

Por otra parte, los sólidos resultantes en los experimentos de RxM en la presencia de acetona (Figura 35 y 36) muestran modificaciones en el patrón de difracción de TDF pero conservan los picos característicos de los coformadores. En ambos casos es notable que el pico más intenso en TDF (21.77 2-theta) ya no se observa y aparece un pico en 7.6 2-theta, así como otros picos nuevos de menor intensidad. Lo anterior indica la posible transformación de fase de TDF a su solvato con acetona, ya que previamente en el grupo de investigación se había observado que esta combinación (TDF con acetona) puede dar lugar a la cristalización de un solvato.

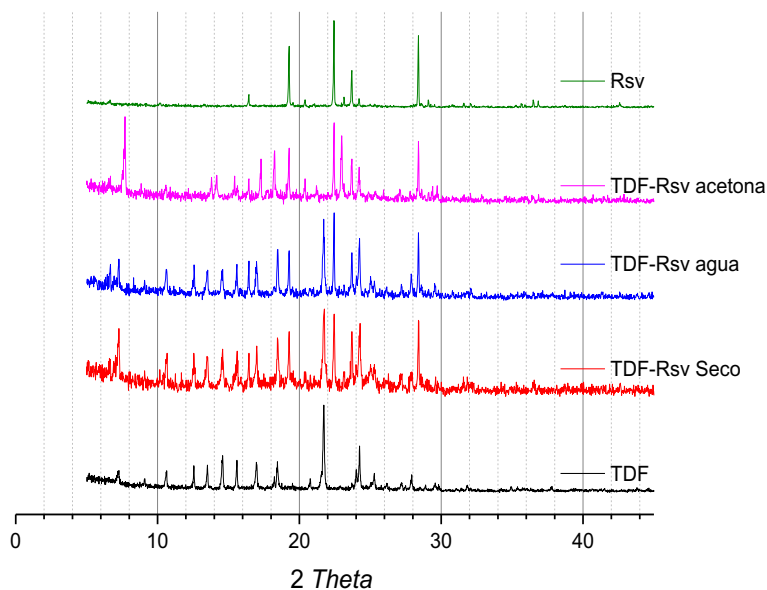
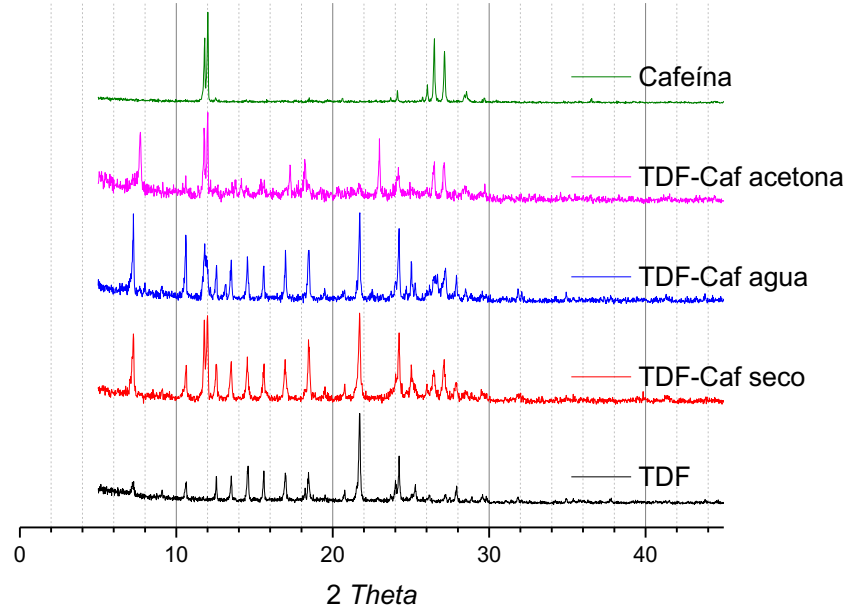


Figura 35. Patrones de DRXP correspondientes a Rsv, TDF y TDF-Rsv 1:1 bajo diferentes condiciones.



*Figura 36. Patrones de DRXP correspondientes a Cafeína, TDF y TDF-Caf 1:1 bajo diferentes condiciones.*

Por otra parte en la figura 37 se muestran los patrones de difracción de los sólidos obtenidos en los experimentos de RxM de TDF con Res, usando agua, acetona o en ausencia de disolvente. En estos resultados se aprecian nuevos picos de difracción, diferentes a los de sus materias primas, especialmente cuando se utilizó acetona como disolvente. En este último caso los nuevos picos de difracción están principalmente en 5.54, 9.22, 15.65, 21.77, 23.89 y 29 °2-theta. De forma similar, en el patrón de difracción del sólido obtenido en el experimento de RxM de TDF con LPro usando acetona (Figura 38) se aprecian nuevos picos situados en 7.64, 13.72, 14.12, 22.65 y 28.47 °2-theta.



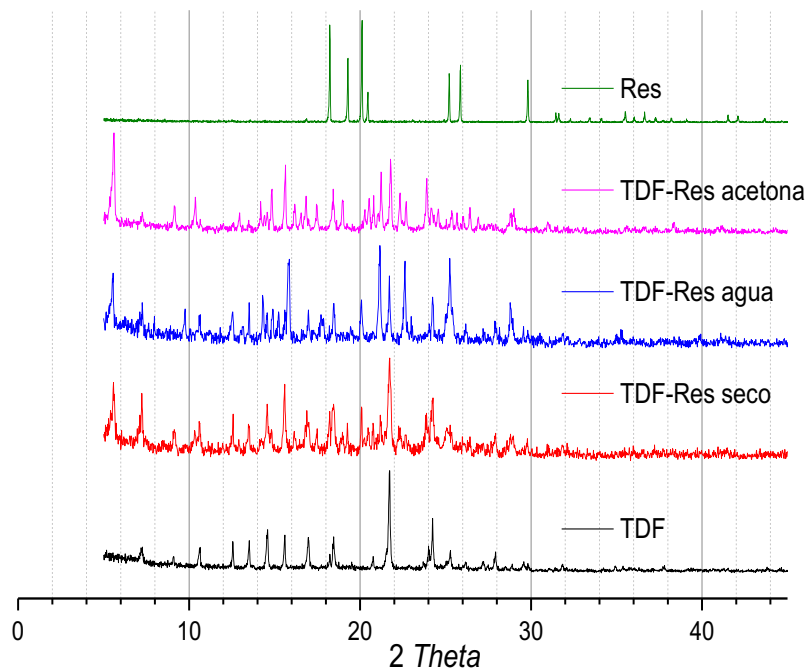


Figura 37. Patrones de DRXP correspondientes a Res, TDF y TDF-Res 1:1 bajo diferentes condiciones.

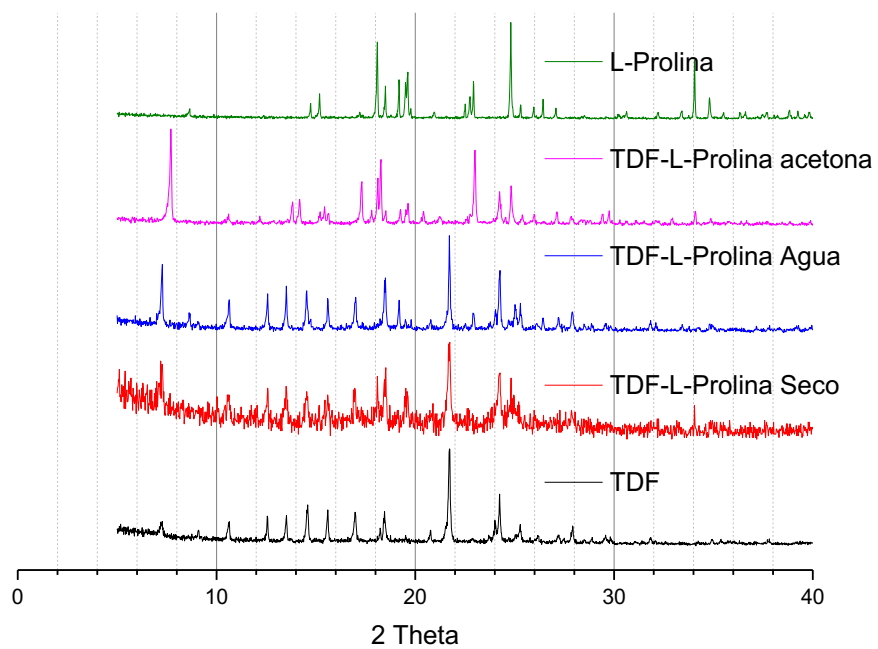


Figura 38. Patrones de DRXP correspondientes a LPro, TDF y TDF-LPro 1:1 bajo diferentes condiciones.

Los experimentos anteriores indican que TDF en combinación con Res o LPro, respectivamente, en la presencia de acetona lleva a la formación de NFS, por lo que se realizaron experimentos de control para determinar que los cambios observados se debían a una NFS y no a la transformación de los sólidos con el disolvente. Por lo que se realizó la molienda individual de las materias primas con el mismo volumen de acetona, y se analizaron los sólidos obtenidos por DRXP. Los resultados se muestran en el Anexo III, y se observó que no hubo cambios en los patrones de difracción de las materias primas, en ausencia y presencia de acetona.

Una vez realizados los experimentos de control se realizaron moliendas en las relaciones molares fármaco:coformador 2:1, 1:1 y 1:2, respectivamente, con el fin de establecer la estequiometría de los componentes en las NFS. Los polvos obtenidos se analizaron por DRXP y los resultados se muestran en las figuras 39 y 40 para las combinación de TDF con Res y LPro, respectivamente. En estos resultados es notable que cuando los componentes de partida no se encuentran en una relación equimolar, se observan picos de difracción que corresponden a remanentes de la materia prima en exceso. Por ejemplo, en una relación 2:1 TDF-Res (Figura 39) se observa el exceso de TDF con picos en 14.56, 21.77 y 24.22 °2-theta.

En la relación 1:2 es menos visible el exceso de coformador, no obstante aparecen picos que no se observan en la relación 1:1 en 18.23, 20.20 y en 29.82 °2-theta. Caso similar se observó en las diferentes proporciones de TDF:LPro, por lo que para estos coformadores la estequiometría 1:1 es la más probable en las NFS.

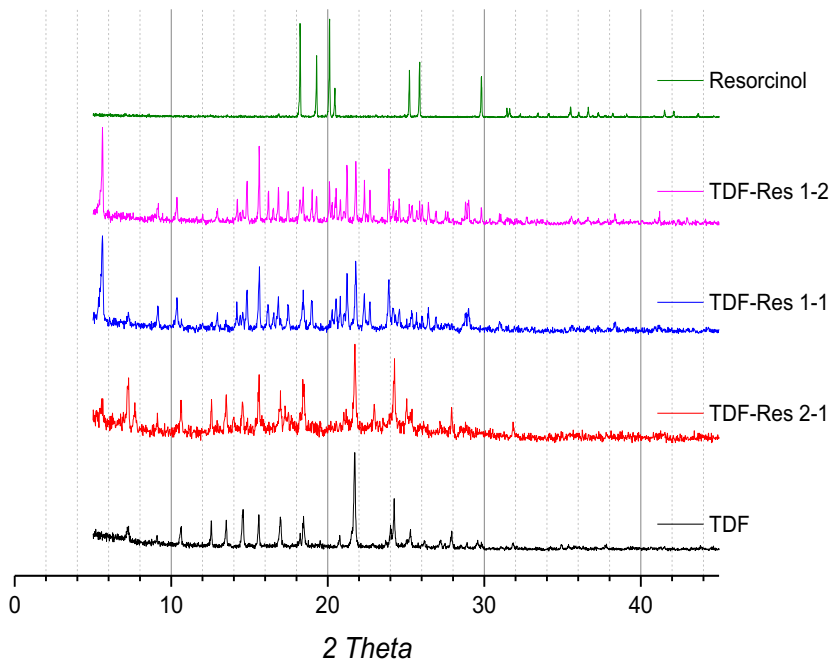


Figura 39. Patrones de DRXPs de diferentes relaciones molares de TDF-Res y las materias primas.

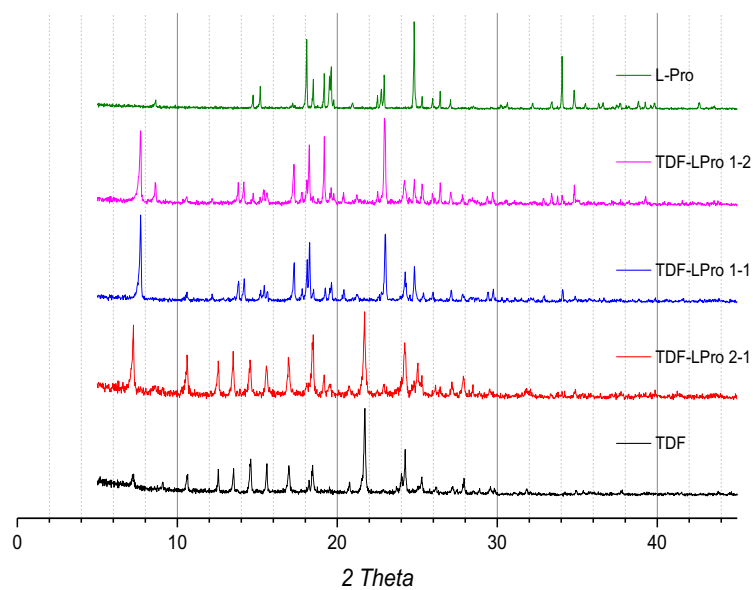


Figura 40. Patrones de DRXP de diferentes relaciones molares de TDF-LPro y las materias primas.

## 9.3 Caracterización de las NFS

### 9.3.1 Caracterización por IR

Para los estudios de caracterización TDF-Res fue sintetizado utilizando las condiciones mencionadas en la sección 9.2; por otra parte, se optimizaron las condiciones de síntesis para TDF-LPro, aumentando el tiempo de molienda, la frecuencia y el volumen de acetona (30 minutos, 25 Hz y 20  $\mu$ L, respectivamente). Para continuar con la caracterización se realizó el análisis por espectroscopia infrarroja (IR). Se compararon los espectros de las materias primas con los de las NFS y los espectros obtenidos se muestran en la figura 41. Los valores de las bandas principales se presentan en la Tabla 11, donde se aprecian como son los desplazamientos entre los sólidos analizados.

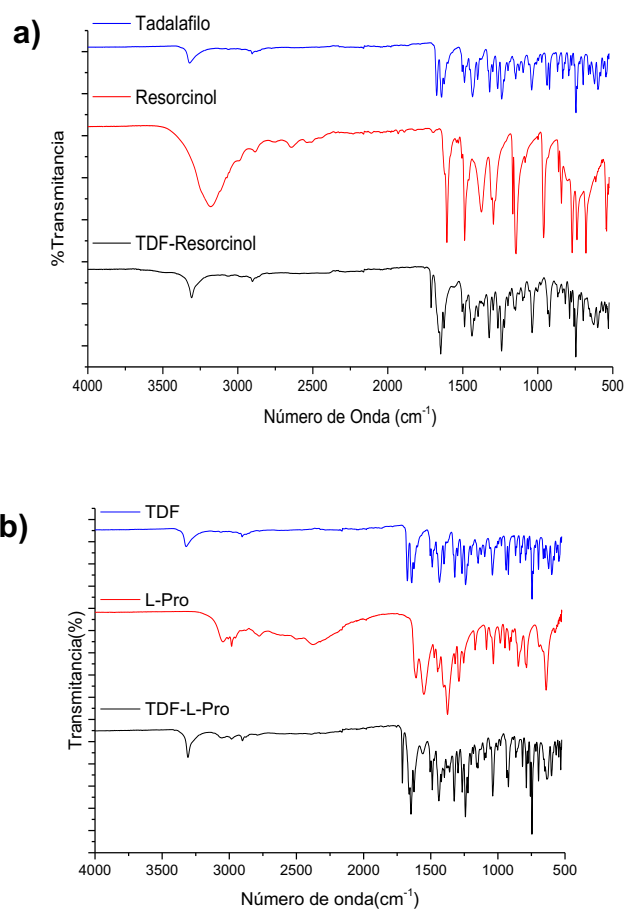


Figura 41. Espectros de IR de: a) TDF-Res y materias primas; b) TDF-LPro y materias primas.

**Tabla 11. Bandas relevantes en el espectro IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) de las materias primas y las NFS. (Asignaciones basadas en el libro “*Structure determination of organic compounds*” por Pretsch *et al*, 2000)**

	Tadalafilo	Tadalafilo-Resorcinol	Tadalafilo-L-Prolina	Resorcinol	L-Prolina
$\nu$ C=O	1674	1711	1711		1614
$\nu$ C=C aromáticos	1641-1624	1647-1624	1647-1624	1606	
$\nu$ O-H				3181	2982
$\nu$ N-H	3321	3307	3307		

Según lo reportado por Weyna y colaboradores en 2012, TDF se encuentra formando puentes de hidrógeno entre el grupo indol de una molécula y el grupo carbonilo lactámico de la molécula vecina. La vibración del grupo carbonilo de TDF se presenta en  $1674 \text{ cm}^{-1}$ , sin embargo, en las NFS se observó en  $1711 \text{ cm}^{-1}$ . Este desplazamiento es de relevancia ya que nos da el indicio que de TDF modifica sus interacciones fármaco-fármaco, para formar interacciones por puente de hidrógeno con el coformador. Un desplazamiento similar fue observado en el cocrystal de TDF con metilparabeno y ácido hidrocínámico (Weyna *et al*, 2012). Así mismo, se observaron diferencias respecto a la vibración del N-H del grupo 2-Pirrolina, el cual aparece alrededor de  $3307 \text{ cm}^{-1}$  para las NFS y en  $3321 \text{ cm}^{-1}$  para TDF. Por lo que también pueden existir interacciones fármaco-coformador a través de este grupo. Cabe destacar que no se observaron cambios en las vibraciones de las interacciones C=C de los grupos aromáticos, lo cual se debe a que éstos no están involucrados en la formación de puentes de hidrógeno entre el fármaco y los coformadores. Ambas fases presentaron un espectro diferente al de sus materias primas, debido a los desplazamientos en los grupos funcionales de TDF.

### 9.3.2 Análisis Térmico: DSC y TGA

El análisis térmico se realizó por DSC y por TGA, y se analizaron a los coformadores puros, a TDF y a las NFS. La técnica de DSC se realizó con el fin de determinar los principales eventos endotérmicos presentes, de la cual la principal información obtenida fue la determinación de los puntos de fusión. El TGA mide las

pérdidas de masa en función de la temperatura a la cual se somete la muestra (Prime *et al.*, 2009), lo cual es útil para evaluar el comportamiento de sólidos multicomponentes ( *i.e.* cocristales).

En las figuras 42 y 43 se muestra el análisis térmico realizado para la fase de TDF-Res y para sus materias primas, respectivamente. En los resultados obtenidos por DSC se observaron eventos endotérmicos representados por picos definidos para los tres sólidos. TDF presentó un  $T_{\text{onset}}$  a 302 °C ( $T_{\text{peak}}$  a 304 °C) y Res un  $T_{\text{onset}}$  a 110 °C ( $T_{\text{peak}}$  112 °C), los cuales corresponden a sus puntos de fusión y sublimación respectivamente, reportados previamente en la literatura (Wlodarski *et al.*, 2014; Durairaj, 2005).

Estos resultados se evaluaron en conjunto con el análisis de TGA, y se demostró que posterior a los eventos endotérmicos hay una pérdida de porcentaje de masa en los sólidos. TDF pierde el 79.7% de su masa, lo cual se atribuye a la descomposición posterior a la fusión, y Res el 99.7%, lo cual corresponde a la sublimación del sólido.

Para TDF-Res el primer evento endotérmico se observó a  $T_{\text{onset}}$  183 °C, el cual al ser menor que de TDF nos indica que hubo un cambio en su arreglo cristalino, puesto que los sólidos cristalinos pueden presentar puntos de fusión a temperaturas mayores dependiendo de su acomodo molecular (Healy *et al.*, 2017). El resultado obtenido por TGA mostró pérdidas de masa en dos etapas, del 20.4% y del 79.5%, a los 171 °C y 302 °C, respectivamente. Estas pérdidas corresponden al porcentaje en masa de la estequiometria 1:1 de la NFS (Tabla 12).

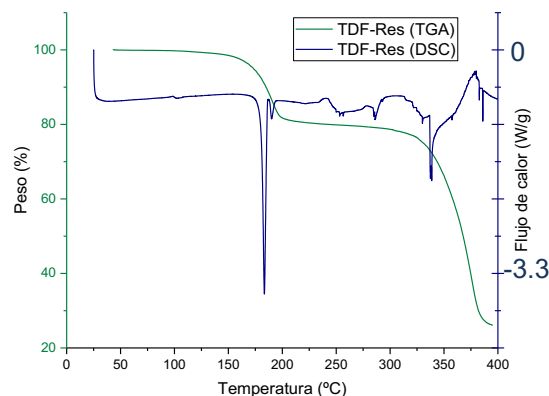


Figura 42. Termogramas de DSC y TGA de TDF-Res .

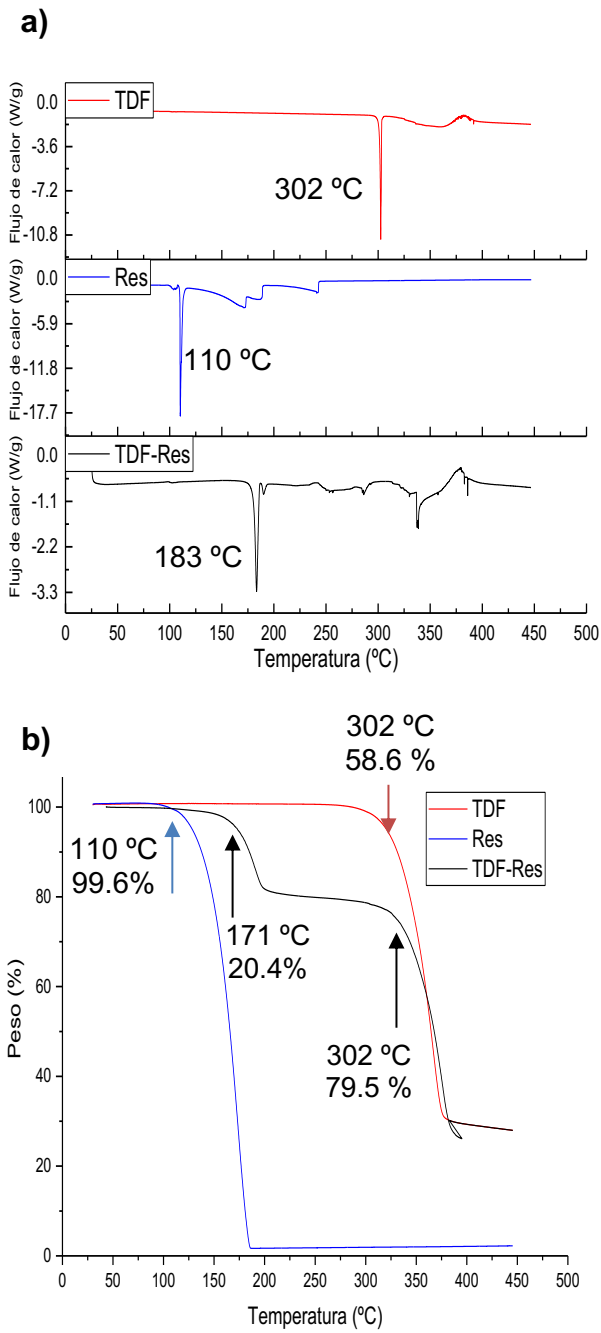


Figura 43. Termogramas correspondientes a TDF-Res y materias de partida. a) DSC; b) TGA

Tabla 12. Estequiometría de la NFS TDF-Res, porcentaje teórico y porcentaje experimental.

Estequiometría 1:1	% Teórico	% Experimental
Tadalafilo (389.4 g/mol)	77.95%	79.5%
Resorcinol (110.1 g/mol)	22.05%	20.4%

Resultados similares se obtuvieron con la NFS TDF-LPro, los cuales se muestran en las figuras 44 y 45. El análisis por DSC demostró que la NFS presenta un evento endotérmico en 228 °C, el cual es diferente a los eventos endotérmicos observados con las materias primas de partida, y la temperatura del primer evento endotérmico es menor al del IFA. Adicionalmente, en el TGA se observaron dos pérdidas de masa, del 22% y del 78%, a los 213 °C y 302 °C respectivamente, lo cual, como en el caso anterior, corresponde a la estequiometría 1:1 de la NFS (tabla 13).

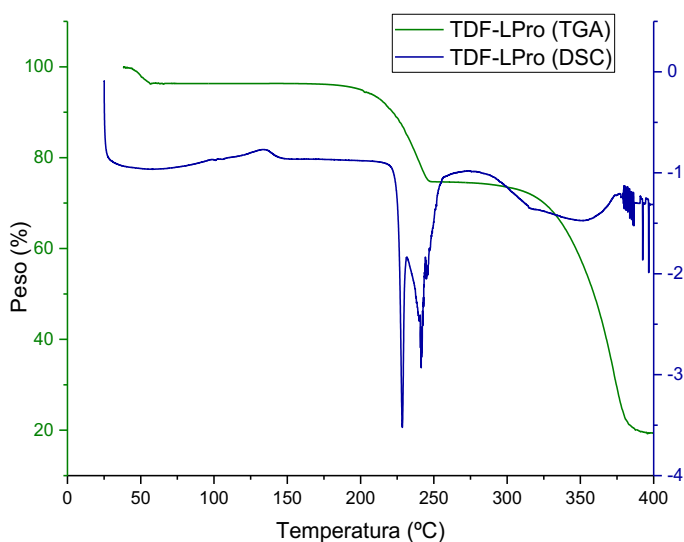


Figura 44. Termogramas correspondientes a TDF-Res y materias de partida.



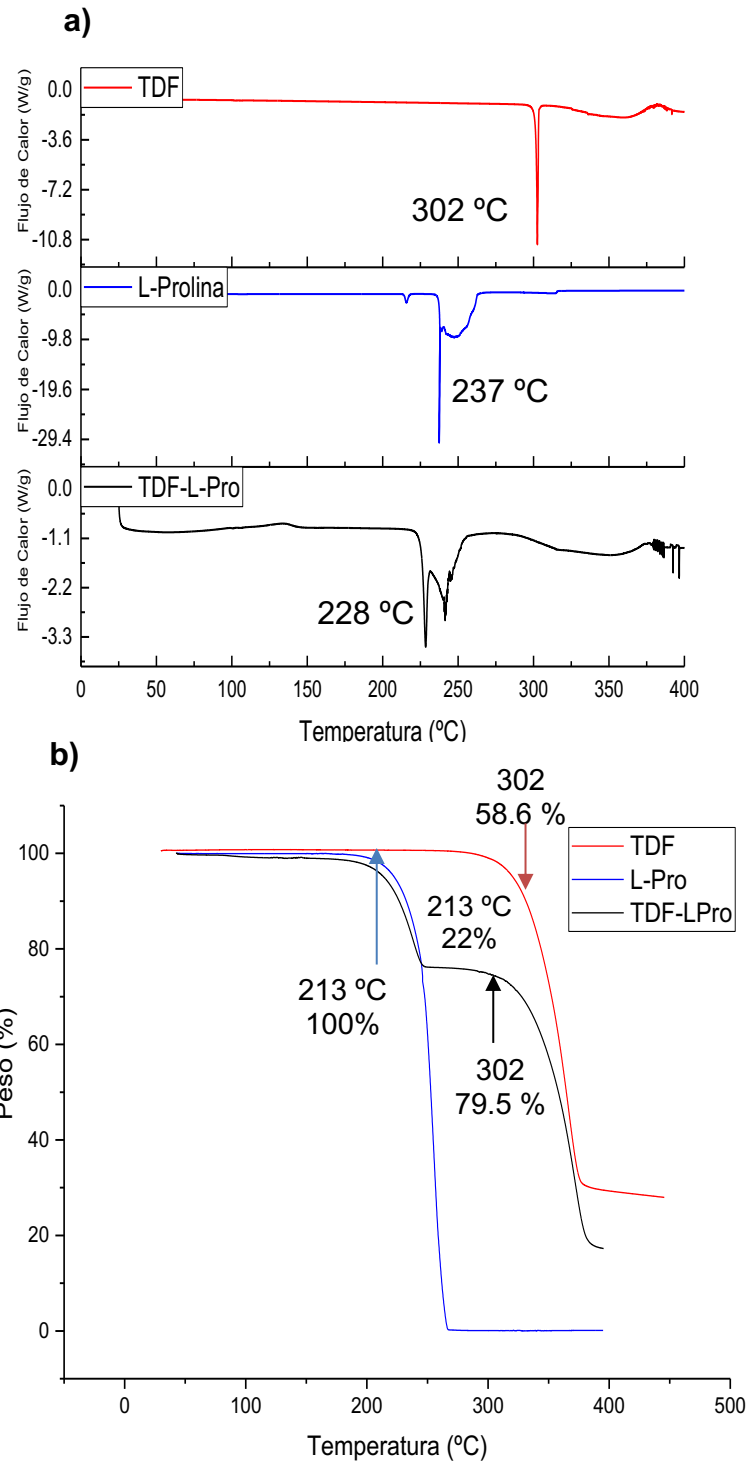


Figura 45. Termogramas correspondientes a TDF-LPro y materias de partida;  
a) DSC; b) TGA

**Tabla 13. Estequiometría de la NFS TDF-LPro, porcentaje teórico y porcentaje experimental.**

<b>Estequiometría 1:1</b>	<b>% Teórico</b>	<b>% Experimental</b>
<b>Tadalafilo (389.4 g/mol)</b>	77.18%	78%
<b>L-Prolina(115.13 g/mol)</b>	22.82%	22%

Resultados similares se han reportado en los cocristales de TDF sintetizados anteriormente. En el año 2019 Shimpi y colaboradores presentaron los termogramas de un cocrystal de TDF con el ácido malónico (ver las Figuras 22 y 23), el cual presentó en el análisis de DSC eventos endotérmicos a una temperatura menor que la del punto de fusión de TDF, y en el análisis por TGA se observaron dos pérdidas de masa. Asimismo, en los estudios realizados en la tesis de maestría de Carlos-Martínez, se reportaron los eventos endotérmicos del cocrystal TDF-Dmal, el cual presentó dos pérdidas de masa en 172°C y 306 °C, y un evento endotérmico a 180 °C, resultados muy similares a los de TDF-Res. Por lo cual los resultados obtenidos durante este análisis tienen las mismas características que las de los cocristales de TDF caracterizados anteriormente.

## **9.4 Escalamiento**

Las condiciones iniciales para la síntesis de las NFS de TDF, consistieron en experimentos conteniendo 50 mg de la mezcla de los componentes sólidos y 10µL de acetona, utilizando los contenedores de 1.5 mL de capacidad. Para el escalamiento se incrementó 10 veces la masa de los reactivos y el volumen de acetona (*i.e.* 500 mg y 100 µL para Res y 200 µL para LPro), utilizando los contenedores del molino de capacidad de 1 g. Las condiciones de molienda permanecieron constantes (20 Hz por 15 min para TDF-Res, y 25 Hz por 30 min para TDF-LPro). Los sólidos obtenidos de la molienda se analizaron por DRXP, y se compararon con los patrones de difracción de las NFS obtenidos anteriormente. Los resultados se muestran en las figuras 46 y 47, de las cuales cabe destacar que los patrones coinciden totalmente con los de referencia, por lo que el escalamiento fue exitoso tomando estos parámetros de molienda.

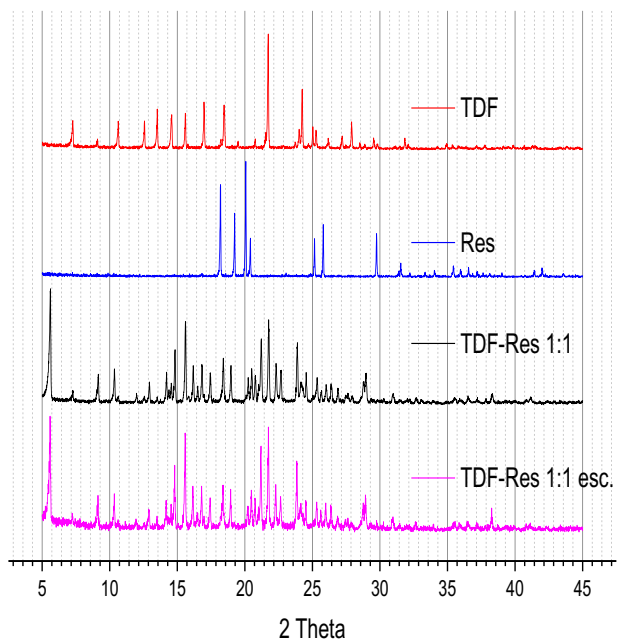


Figura 46. Patrones de DRXPs correspondientes a TDF, Res, TDF-Res y su escalamiento

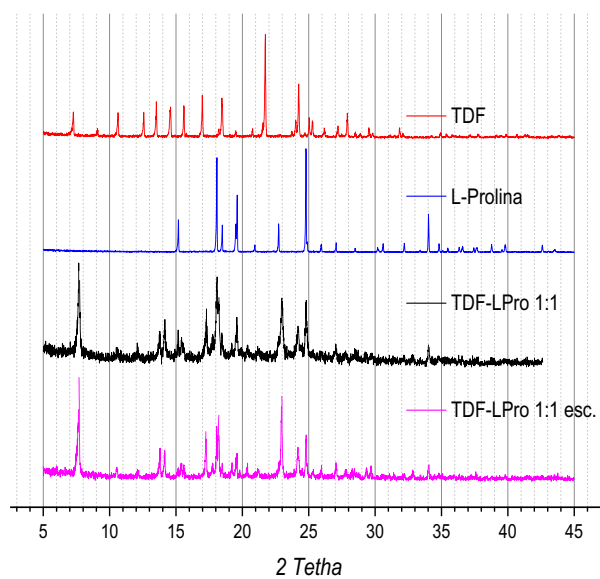


Figura 47. Patrones DRXPs correspondientes TDF, LPro, TDF-LPro y su escalamiento.

## 9.5 Estudios de estabilidad de fase

### 9.5.1 Estabilidad de fase en estado sólido

Para evaluar si existe transformación de fase en los sólidos, inducida por cambios de temperatura y/o humedad relativa (HR), se llevó a cabo el estudio de estabilidad bajo diferentes condiciones de temperatura y humedad. Las materias primas y las NFS se sometieron durante 30 días a cámaras bajo las siguientes condiciones: a) 40°C, calor seco, b) 50°C, calor seco, y c) 40°C 75% HR. Se evaluaron los sólidos al inicio y final del experimento por DRXP.

En las figuras 48 y 49 se muestran los resultados obtenidos de TDF, Res y TDF-Res, respectivamente, bajo las tres condiciones evaluadas. Bajo estas condiciones los patrones de difracción obtenidos no mostraron cambios en comparación con los materiales de partida antes del tratamiento, lo que es atribuido a que los componentes en cada sólido son estables, no presentan un cambio estructural físico o químico. Por lo cual estos sólidos no requieren condiciones especiales de almacenamiento de temperatura y/o humedad.

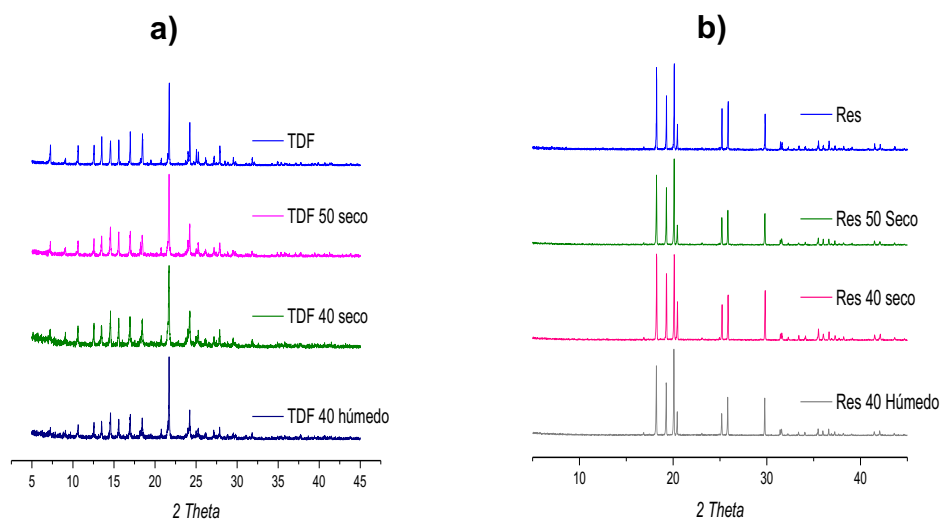
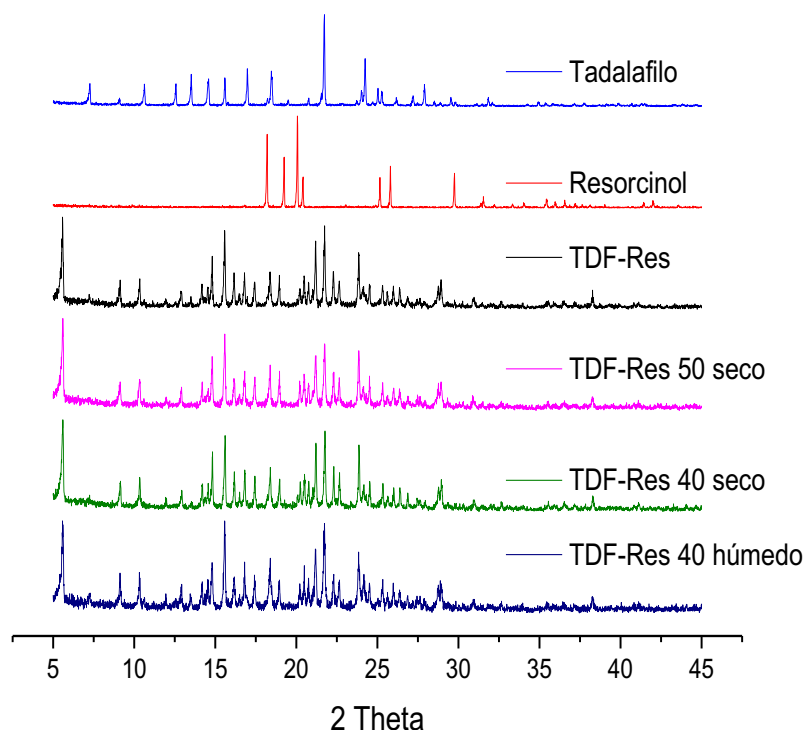


Figura 48. Patrones DRXPs correspondientes a los productos de estabilidad de: a) Tadalafilo (TDF); b) Resorcinol (Res)



*Figura 49. Patrones de DRXPs correspondientes a los productos de estabilidad de TDF-Res.*

Por otra parte, en la figura 50a se presentan los resultados de DRXP del análisis de LPro, evaluada a los 40 °C y 50 °C. No se observan diferencias en los patrones de difracción en comparación con el del sólido de partida. En contraste a 45 °C y 75% de HR la muestra sólida fue delicuescente (absorbió agua y se disolvió), por lo que no se pudo obtener su patrón de DRXP. Así mismo, los resultados obtenidos de TDF-LPro se muestran en la figura 50b, cuando se evaluaron las condiciones de 50 °C con calor seco y 40 °C con 75% HR; los patrones de difracción obtenidos coinciden con el de TDF, por lo que hubo una transformación física de fase, no así a 40 °C donde las NFS no presentó transformación.

Esto indica que la NFS se transforma al IFA de partida en condiciones de temperatura y humedad altas, por lo que las condiciones de almacenamiento son un factor importante para conservar la integridad física de la fase. Estudios anteriores han demostrado que el control de la HR es un factor importante para

asegurar la estabilidad física de LPro. En el año 2018, Nugrahani y colaboradores sintetizaron cocristales de diclofenaco (DFA) con LPro, mostrando que son inestables tras 24 horas de almacenamiento en condiciones de 80% HR y 30 °C, debido a la hidratación que presenta LPro. La transformación física que presentan los cocristales, DFA-LPro y TDF-LPro, es debido al estado de menor energía (G) que presenta el coformador cuando se encuentra en presencia de agua, lo que ocasiona el rompimiento del enlace entre el IFA y el coformador, y por ende la disociación del cocrystal (Eddleston *et al*, 2014).

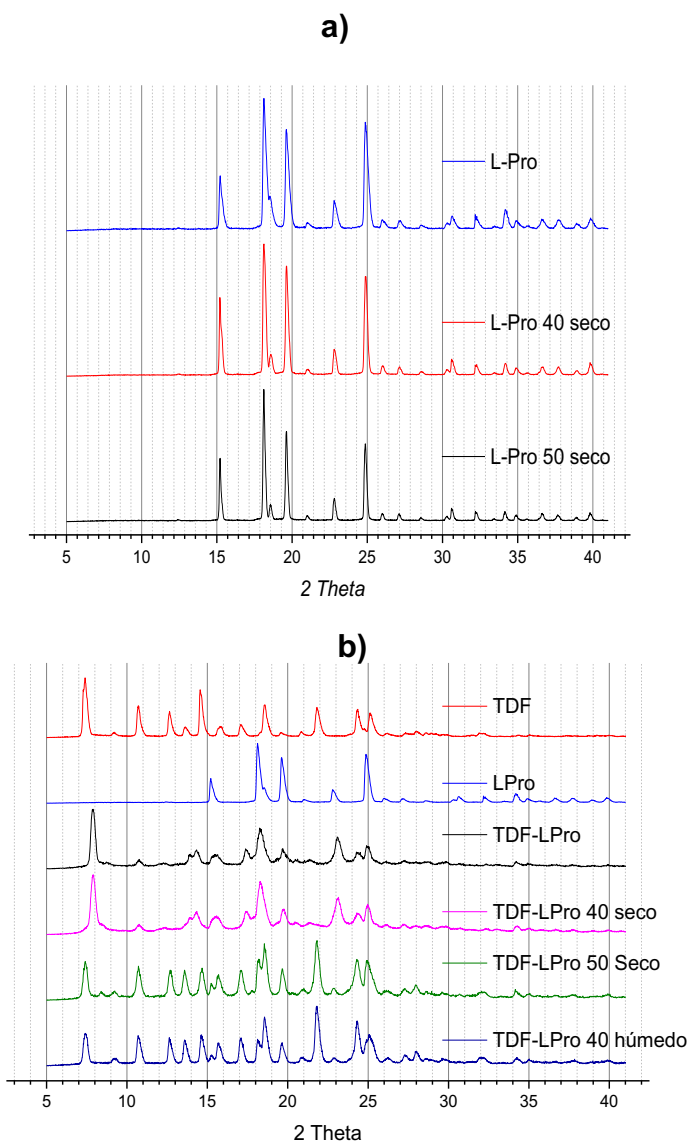
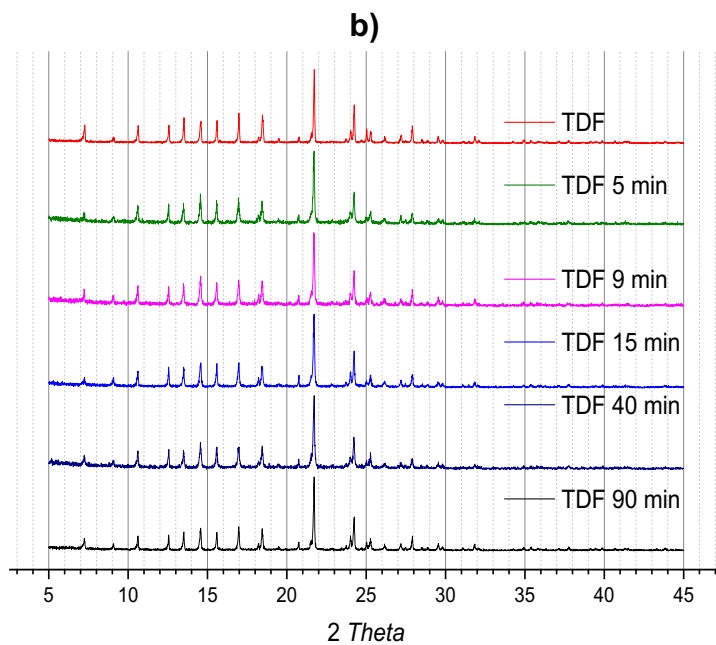
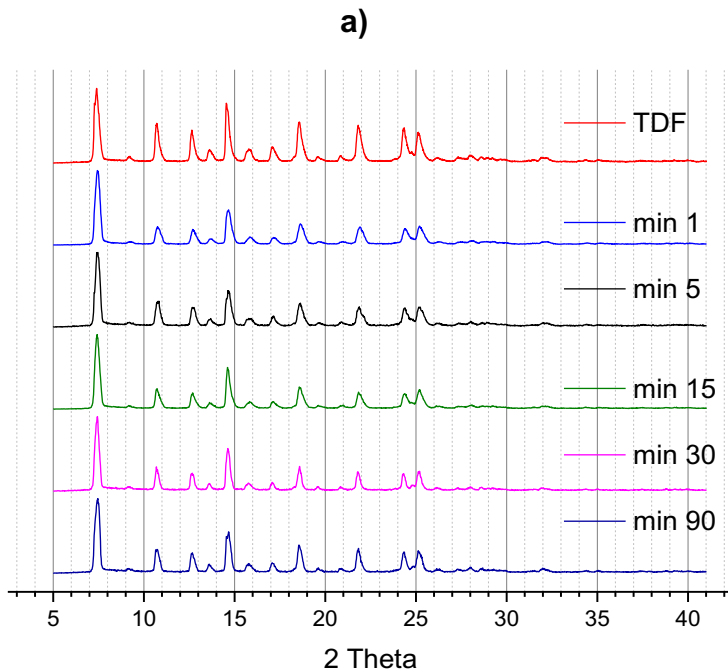


Figura 50. DRXPs correspondientes a los productos de estabilidad de:  
a) LPro; b) TDF-LPro

### 9.5.2 Transformación de fase inducida por el disolvente

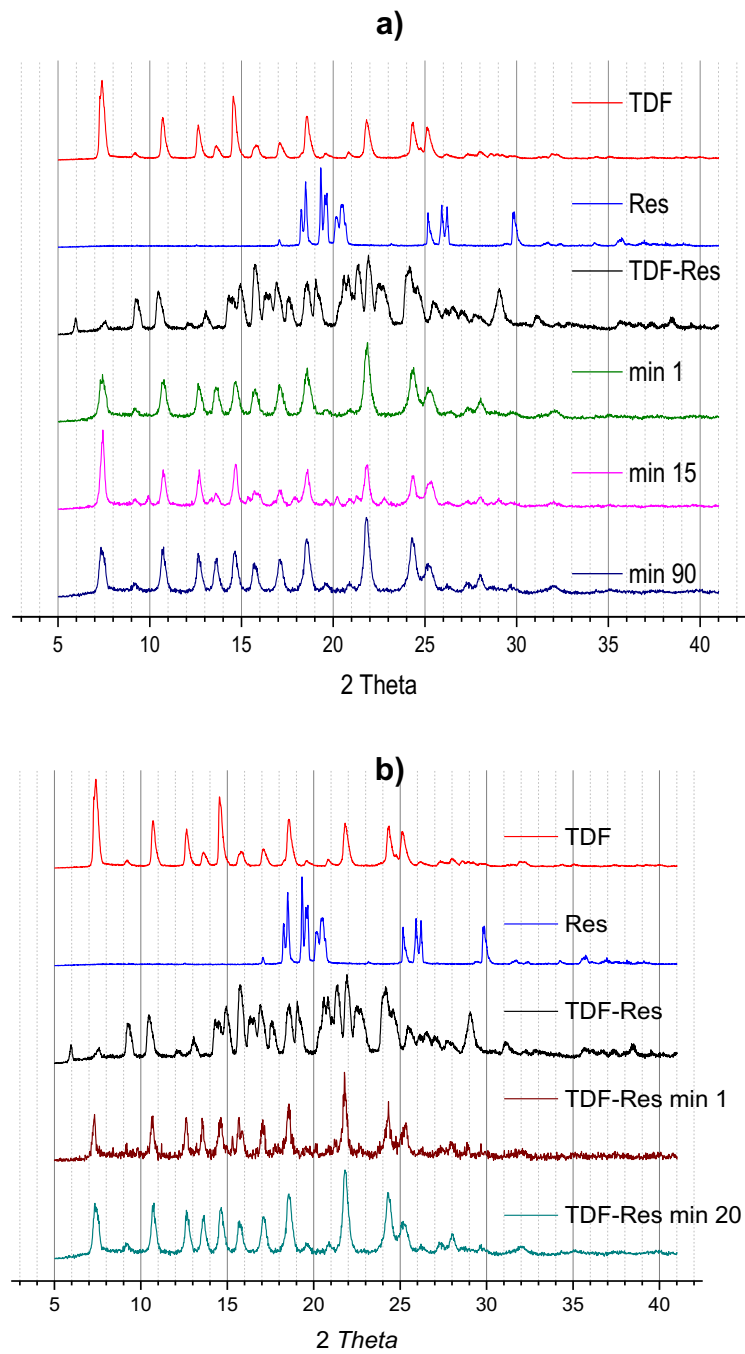
Debido a que TDF se absorbe en el tracto gastrointestinal, los estudios de transformación de fase mediados por el disolvente se realizaron en medios de pH 1.6 y 6.5. Éstos representan el pH de estómago e intestino, respectivamente. El estudio se realiza para evaluar la permanencia de fase de los sólidos cuando están en contacto de medios acuosos, y se realiza bajo condiciones de agitación y temperatura constantes (90 rpm, 37° C) por 90 minutos. Se consideró que la NFS sufría una transformación de fase cuando el patrón obtenido no correspondía con el de patrón inicial, y se observaban picos correspondientes a las materias de partida, o bien picos nuevos.

En las figuras 51, 52 y 53 se muestran los difractogramas evaluados de TDF y las NFS, en los pHs 1.6 y 6.5, tomando en cuenta tiempos representativos de todo el análisis. En la figura 52 se aprecia que TDF no presentó transformación de fase mediada por el disolvente, puesto que el patrón de difracción coincide con el de referencia en todos los tiempos de análisis. No obstante, en los difractogramas de las NFS a partir del primer minuto del experimento se observan picos en la región de 7.3, 10.65, 14.56 y 18.42 2-theta principalmente, los cuales son característicos de TDF. Por lo cual se determinó que las NFS presentan una transformación inmediata de fase mediada por la solución y ambas fases se transforman rápidamente al fármaco partida al estar en contacto con el medio de disolución. Este efecto se mantuvo durante los 90 minutos del experimento, ya que en todos los tiempos evaluados se aprecia que el patrón de difracción analizado corresponde a TDF. El resumen de los resultados obtenidos se presenta en la tabla 14, y no hubo diferencias en los resultados obtenidos cuando se analizaron los sólidos a pH 6.5

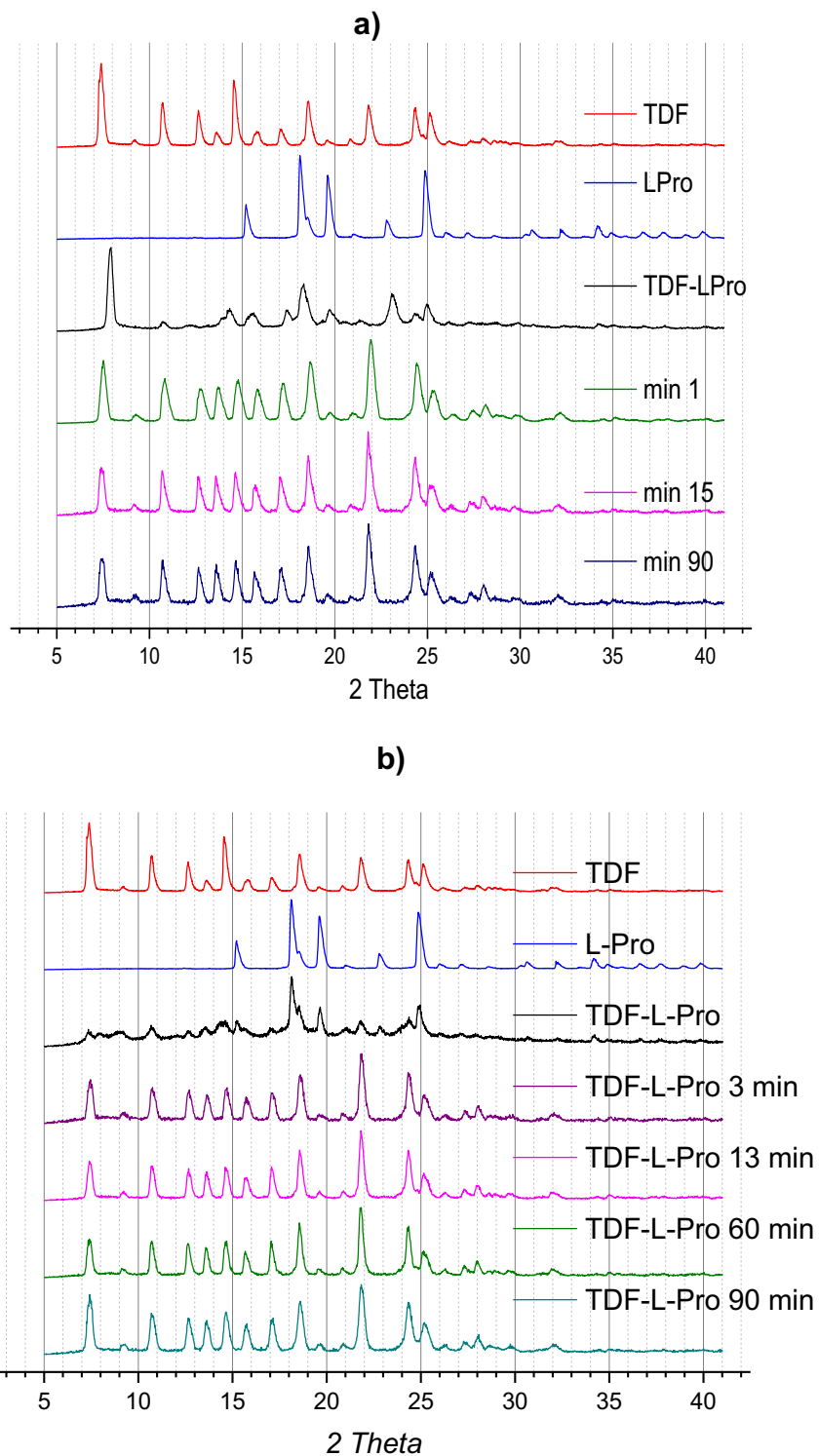


*Figura 51. Estudios de estabilidad de Fase de TDF:  
a) en solución de HCl, pH 1.6 (con Bruker D8-Advance)  
b) en solución de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 6.5 (con Bruker D2-Phaser)*





*Figura 52. Estudios de estabilidad de fase en solución de TDF-Res  
a) en solución de HCl, pH 1.6  
b) en solución de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 6.5*



*Figura 53. Estudios de estabilidad de fase en solución de TDF-LPro*  
*a) en solución de HCl, pH 1.6*  
*b) en solución de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 6.5*

**Tabla 14. Resumen de los resultados obtenidos en la prueba de estabilidad de fase en solución a los diferentes pH.**

Sólido	pH 1.6	pH 6.5
TDF	x	x
TDF-Res	+++	+++
TDF-LPro	+++	+++

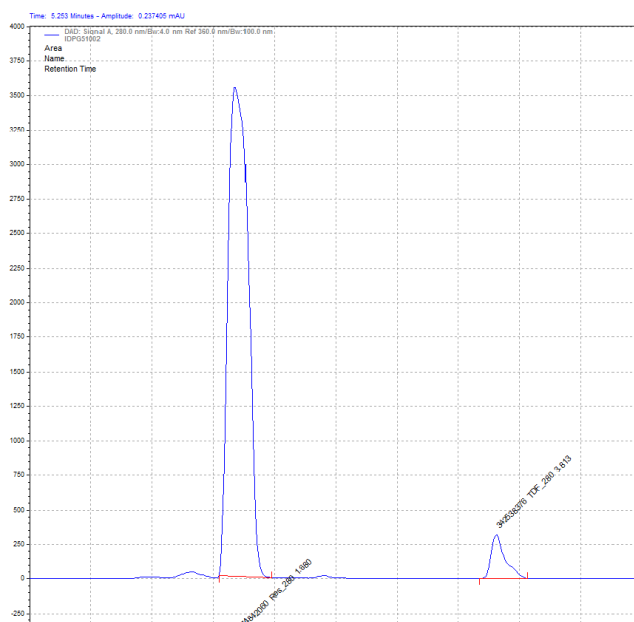
( x no transformación de fase, +++ transformación de fase rápida )

Un efecto similar ya se había observado anteriormente en otros cocrisales de TDF. El cocrystal de TDF con ácido D-málico, analizado en el trabajo de tesis de Maestría de Carlos-Martínez (Carlos-Martínez, 2017), presentó una pronta transformación al IFA de partida en los medios de HCl 0.1N (pH 1.6) y buffer de fosfatos (pH 6.5), al minuto 1 y 5 del experimento, respectivamente. Así mismo el cocrystal de TDF con ácido malónico evaluado por Shimpi y colaboradores (Shimpi *et al.*, 2018) bajo condiciones de supersaturación, presentó una rápida precipitación a TDF. De igual forma, la ventaja en solubilidad generada por las NFS está relacionada con el proceso de transformación de fase observada en los cocrisales de TDF. TDF tiene una muy baja solubilidad (3µg/mL), y fácilmente se produce una gran diferencia en solubilidad cuando se cocrystaliza, *i.e.* SA, al presentarse una transformación de la fase cocrystalina inducida por el disolvente se induce un estado de supersaturación que conduce a una pronta precipitación al IFA.

Por consiguiente, se debe evitar la pronta precipitación del TDF a partir de la disolución de los cocrisales para asegurar que se mantengan las propiedades fisicoquímicas mejoradas del IFA en el sistema cocrystalino, una vez que el IFA se encuentran en solución. Debido a esto, en los últimos años se ha optado por el uso de polímeros en la pre-formulación como estrategia para inhibir o prolongar la precipitación de los cocrisales en solución (Shimpi *et al.*, 2018).

## 9.6 Desarrollo del método de cuantificación por HPLC

Se desarrolló un método por HPLC-DAD (Agilent Technologies 1260 Infinity II) para separar y cuantificar al fármaco de las muestras de análisis obtenidas en este trabajo de tesis. Considerando las diferentes propiedades fisicoquímicas de los analitos que se evaluaron, coformadores hidrofílicos y fármaco hidrofóbico, se desarrolló un método por gradiente con fase móvil de H<sub>2</sub>O: CH<sub>3</sub>CN: MeOH para cuantificar ambos compuestos en una misma corrida y en un tiempo corto (7 minutos). En la figura 54 se muestra un cromatograma ilustrativo, donde se observa el pico que corresponde a Res ( $t_R = 1.6$  min) y a TDF ( $t_R = 3.8$  min). Otras condiciones utilizadas fueron: flujo de 1 mL/min, temperatura de 40 °C en la columna, longitud de onda de lectura a 280 nm. Éstas condiciones se adecuaron con el fin de optimizar los  $t_R$  de los analitos estudiados.



*Figura 54. Cromatograma correspondiente a Resorcinol ( $T_R = 1.6$  min) y Tadalafilo ( $T_R = 3.7$  min).*

Se determinó la adecuabilidad del método para área y  $t_R$ , utilizando cinco inyecciones de la misma muestra. Se utilizó una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  de Res y de 16  $\mu\text{g/mL}$  de TDF, y se obtuvieron variaciones menores al 2% para ambos compuestos en los dos parámetros (Anexo V). Una vez determinada la adecuabilidad del método se prosiguió a realizar las curvas de cuantificación para la validación.

Los valores de la curva de cuantificación fueron ajustados según la solubilidad de TDF, y las concentraciones mayores esperadas en el estudio de disolución de polvos. Debido a esto se seleccionó el intervalo de concentración de TDF de 2.6 µg/mL a 26 µg/mL. Las curvas se realizaron por triplicado con 5 puntos de concentración, y se hicieron repeticiones en tres días. El coeficiente de correlación (r) obtenido fue  $\geq 0.99$  y el error relativo fue de 2.2%, por lo que el método mostró linealidad. El análisis de precisión mostró un %CV alrededor de 4-6%, esto se atribuye principalmente a que se utilizó una curva de concentraciones en el límite de cuantificación (ver adelante en el texto), por lo que la sensibilidad al error fue mayor.

En el Anexo VI se ilustran los valores obtenidos de una curva de calibración por triplicado, junto con los resultados completos.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) se determinaron usando el promedio de las pendientes (m) y la DE de los interceptos (b) (Anexo VI), bajo las diferentes ecuaciones. Los resultados fueron: LD= 0.89 µg/mL y LQ= 2.6 µg/mL

Este método fue empleado para cuantificar las concentraciones obtenidas de TDF en las muestras de disolución de polvos.

## **9.7 Estudios biofarmacéuticos**

### **9.7.1 Estudios de *solvent shift***

Actualmente uno de los mayores retos en la formulación de cocristales es su pronta transformación de fase y la consiguiente precipitación del IFA en solución. Debido a esto, recientemente se ha estudiado el efecto supersaturante de los cocristales, y el uso de polímeros y surfactantes como inhibidores de su precipitación (Salas-Zúñiga *et al.*, 2020).

En ensayos anteriores se ha utilizado el método de *solvent shift* para determinar el punto de saturación del fármaco en cuestión, y así mismo seleccionar una matriz polimérica adecuada que inhiba su precipitación (Yamashita *et al.*, 2011). En nuestro grupo de investigación (Carlos-Martínez, 2017) se ha estudiado el nivel de saturación de TDF en presencia de matrices poliméricas de derivados de celulosa

(MC, HPMC y HPC), de polietilenglicol (PEG E 300 y PEG BLOCK) y polivinilpirrolidona (PVP). En estos estudios se destacó el Methocel (MC) por inhibir por un tiempo mayor la precipitación del cocrystal de TDF. No obstante, debido a que este polímero se dejó de comercializar, hubo la necesidad de repetir este experimento, ahora utilizando Methocel-A15 (MA 15) de la marca Colorcon®, para estudiar su efecto en la inhibición de la precipitación de TDF y las NFS. Este polímero tiene propiedades fisicoquímicas y químicas muy semejantes al MC.

A través del ensayo de *solvent shift*, se determinó que el punto de saturación de TDF en una solución de HCl, pH 1.6, es de 32.7  $\mu\text{g/mL}$ . Posteriormente se hizo el mismo estudio, pero agregando el polímero Methocel A15 al 0.5%, el cual retrasó el punto de saturación de TDF hasta una concentración de 65.7  $\mu\text{g/mL}$ . Ambos resultados se muestran en la Figura 55, y debido al buen desempeño del polímero inhibiendo la precipitación de TDF, semejante al observado con Methocel utilizado anteriormente, se decidió que era adecuado para continuar con los estudios de disolución.

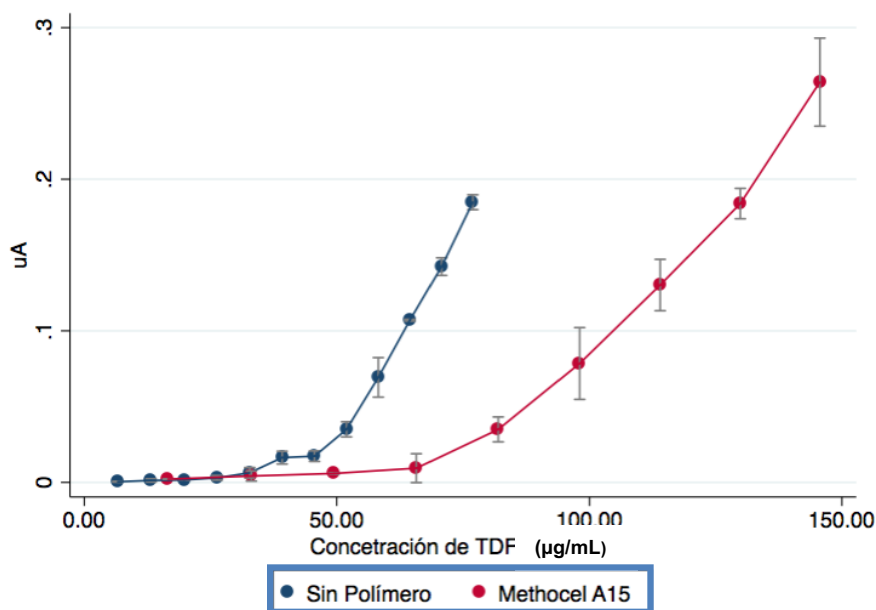


Figura 55. Determinación de punto de saturación de TDF sin y con el polímero Methocel A15 al 0.5%.

### 9.7.2 Estudios de disolución de polvos y solubilidad

Los estudios de disolución se realizaron con el objetivo de evaluar el comportamiento del fármaco y de las NFS bajo condiciones *no sink* en diferentes pHs. Se utilizó una solución de HCl 0.1 M de pH 1.6 y buffer de fosfatos 0.1M pH 6.5, debido a que simulan las condiciones de solubilización del IFA en las porciones del tracto gastrointestinal en las que se absorbe TDF (estómago e intestino). Se compararon los perfiles de disolución de polvos hasta los 90 minutos para TDF materia prima y las NFS. Las soluciones obtenidas fueron filtradas, y se analizaron por HPLC para determinar la concentración de TDF en solución, los resultados se observan en las Figuras 56 y 57.

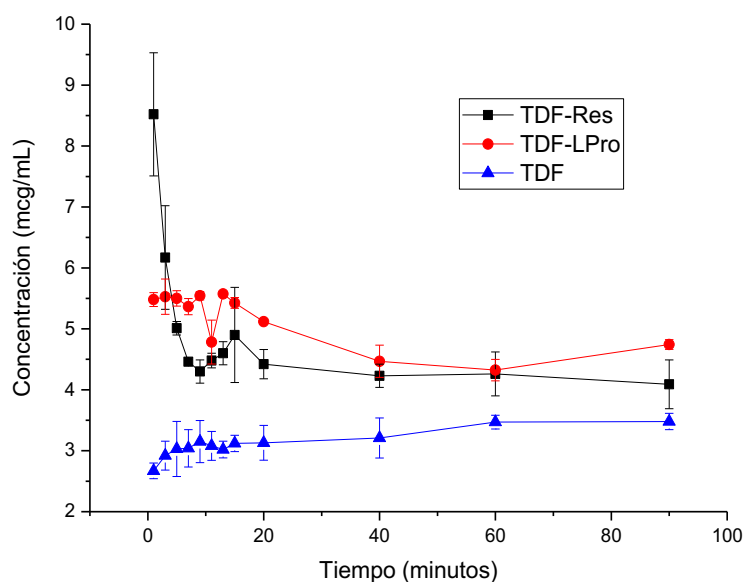


Figura 56. Perfil de disolución de polvos en solución HCl (pH 1.6) (media  $\pm$  DE)

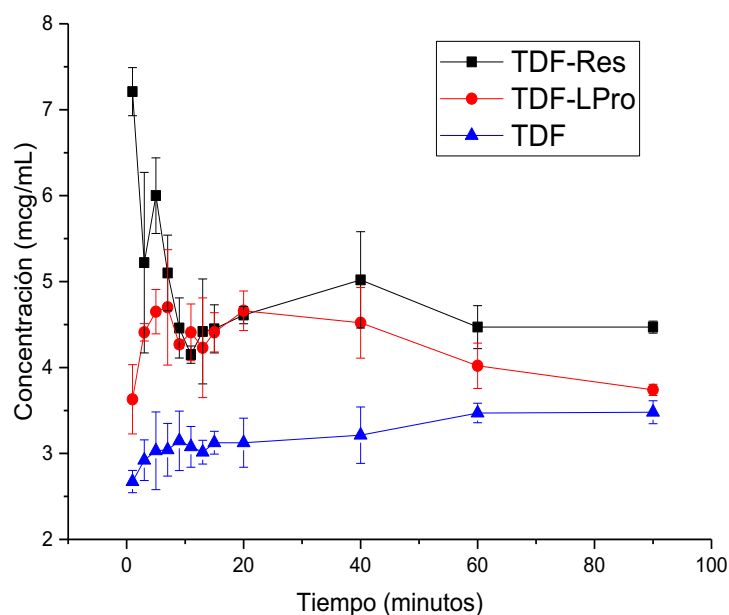


Figura 57. Perfil de disolución de polvos en buffer de fosfatos 1 M (pH 6.5) (media  $\pm$  DE)

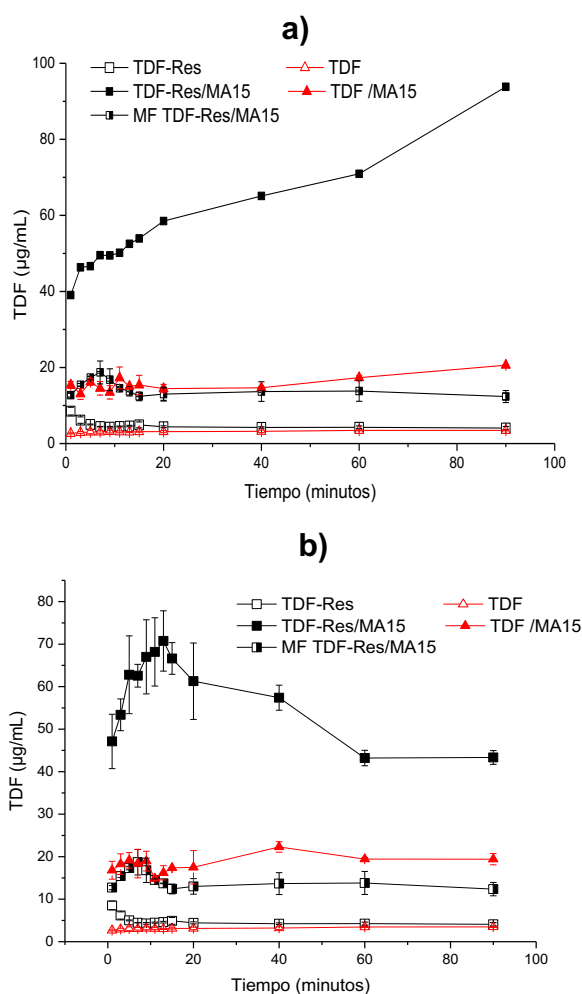
A partir de estos resultados se determinó que las NFS incrementaron hasta tres veces más la concentración de TDF disuelta al primer minuto, sin embargo, esta ventaja se perdió a partir del tercer minuto, ya que la concentración de TDF disuelta disminuyó rápidamente hasta ser la misma para la muestra de la NFS y el fármaco libre. El comportamiento de disolución de TDF proveniente de las NFS generó el efecto conocido como *spring*. Éste efecto es ocasionado por la supersaturación generada en la concentración de TDF por los cocrystalos en solución, que conduce a una precipitación inmediata del IFA debido a la alta ventaja en solubilidad (SA) inducida por las NFS en comparación con TDF. No se pudo determinar que tan alta podía llegar a ser la SA inducida por las NFS, ya que no fue posible cuantificar la concentración de TDF disuelto antes del minuto 1.

Aunado a esto, se evaluó el perfil de disolución de polvos de TDF, las NFS y a las mezclas físicas (MF) de las NFS en presencia del polímero Methocel A15 al 0.5%. Estos perfiles se encuentran en las figuras 58 y 59, para TDF-Res y TDF-LPro respectivamente. La comparación entre estos perfiles se encuentra en el Anexo VII. Con estos resultados se determinó importancia de la incorporación de Methocel A15 (MA 15) al medio de disolución, ya que con el uso de este polímero



la concentración disuelta de TDF incrementó significativamente, tanto para el fármaco libre como para las NFS. MA 15 presentó un efecto tanto solubilizante para el IFA, así como de inhibidor de la nucleación y cristalización del TDF disuelto previamente de las NFS, estos últimos son procesos involucrados en la precipitación del IFA proveniente de los cocrystalos.

Mediante estos estudios se determinó que las mezclas físicas (MF), en comparación con las NFS, alcanzaron concentraciones significativamente menores de TDF disuelto en las diferentes soluciones con MA 15, sin embargo, la presencia del coformador sí influyó en la solubilización del IFA.



*Figura 58. Perfil de disolución de polvos de TDF, TDF-Res y MF TDF-Res, con y sin polímero Methocel A15:  
a) en solución HCl 0.1 M pH 1.6  
b) en buffer de fosfatos 0.1M pH 6.5 (media ± DE).*

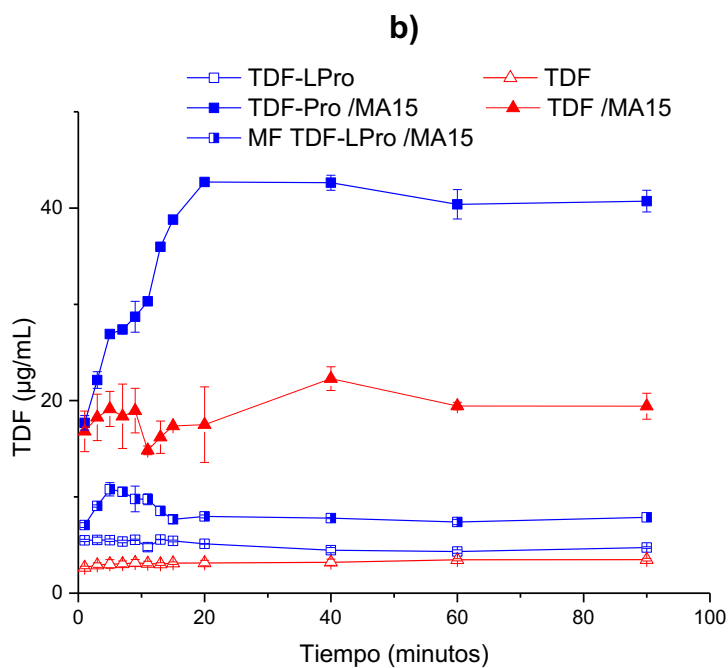
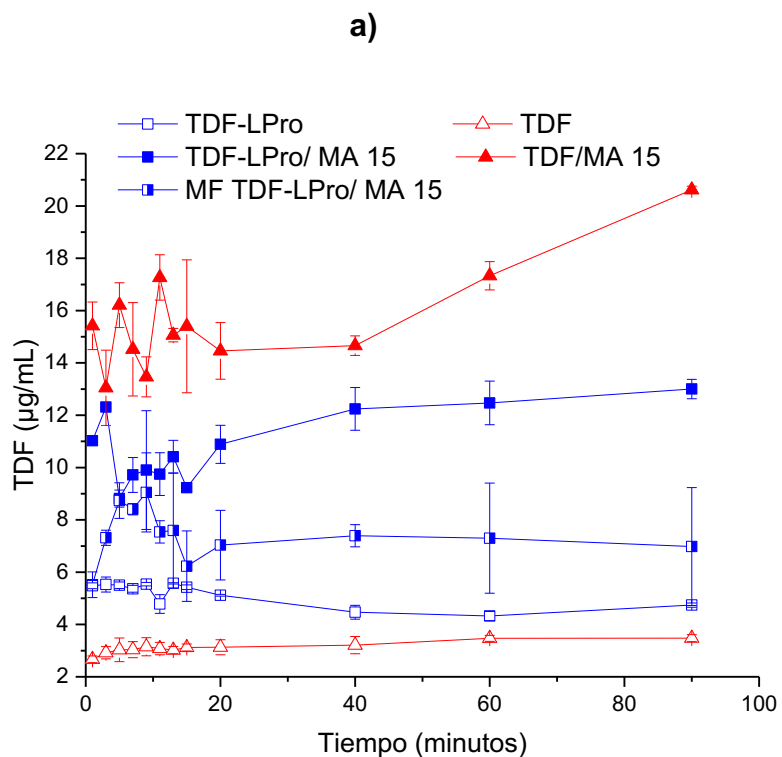


Figura 59. Perfil de disolución de polvos de TDF, TDF-LPro y MF TDF-LPro, con y sin polímero Methocel A15:  
 a) en solución HCl 0.1 M pH 1.6  
 b) en buffer de fosfatos 0.1M pH 6.5 (media ± DE).

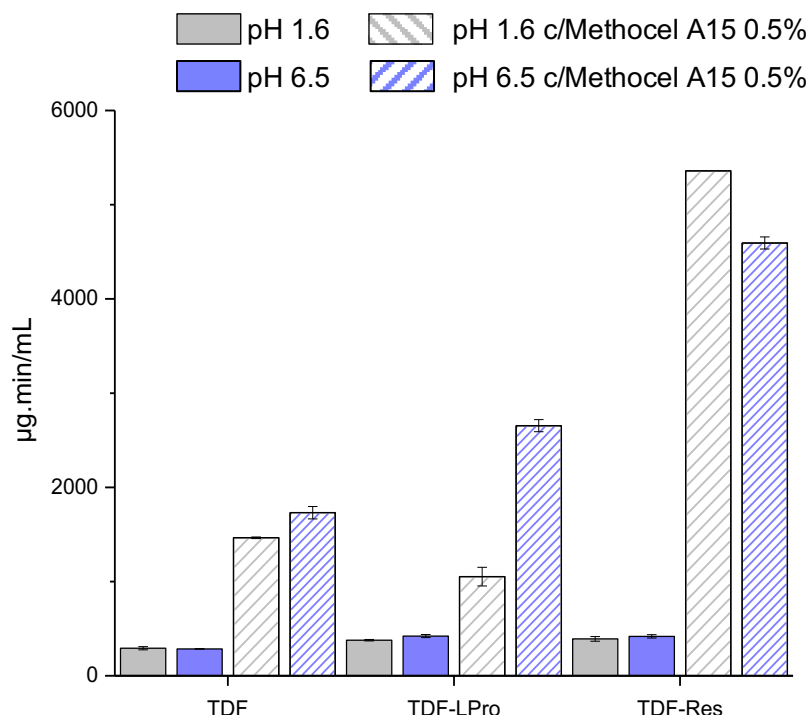
Así mismo, se evaluaron las cantidades totales de TDF alcanzadas por cada sólido bajo las diferentes condiciones de trabajo, estas se expresan con el parámetro de ABC (área bajo la curva, a partir de los perfiles de las Figuras 56-59) y los resultados se muestran en la tabla 15 y la figura 60. De éstos resultados, se determinó que hay una diferencia en la cantidad total de fármaco disuelto entre el TDF solo y el TDF proveniente de las NFS. Si bien, esta diferencia es marginal, 1.4X en ausencia del polímero MA 15, si permite observar la ventaja que otorga el sistema cocrystalino.

Cabe destacar que TDF-Res es el cocrystal que alcanzó mayores concentraciones del fármaco disuelto en ambos pHs en medio conteniendo MA 15, lo cual se ve reflejado en su ABC. En este caso particular, cabe recordar que el cocrystal de TDF-Res presentó una transformación de fase mediada por la solución semejante al cocrystal de TDF-LPro (Figuras 52 y 53), sin embargo, la diferencia en solubilidad que existe entre TDF y Res es menor en comparación con L-Pro, por ende el cocrystal TDF-Res se esperaba tuviera una transformación de fase menos inmediata que TDF-LPro permitiendo mantener una concentración de TDF disuelto por un mayor tiempo.

En resumen, las preformulaciones evaluadas que mejor efecto tuvieron sobre la solubilidad del TDF contienen al IFA cocrystalizado, en conjunto con el polímero MA15. Se compararon los grupos con y sin MA15 a través del análisis estadístico realizado en Statgraphics ® (Anexo VIII) y se demostró que P valor = 0.0071, por lo cual estos grupos son significativamente diferentes. En particular, el sistema conteniendo al cocrystal TDF-Res generó el mayor nivel de solubilización en ambos pHs, y al menos por el intervalo de tiempo que duro el análisis (3 hr).

**Tabla 15. Valores promedio de ABC (µg.min/mL) de TDF y las NFS, en los diferentes medios de disolución, sin polímero y con polímero.**

	s/Methocel A15				c/Methocel A15			
	pH 1.6	DE	pH 6.5	DE	pH 1.6	DE	pH 6.5	DE
TDF	292	17.5	285	2.6	1,465	8.3	1,731	65.1
TDF-LPro	422	7.2	378	16.5	1,053	99	2,655	64.1
TDF-Res	391	25.1	418	17.6	5,359	0.1	4,594	64.2



*Figura 60. Promedio de ABC de TDF, TDF-LPro y TDF-Res en diferentes medios de disolución.*

Cabe resaltar que estos resultados fueron complementados y comparados con el estudio por DRXPs de los sólidos filtrados durante los perfiles de disolución, para evaluar su estabilidad en solución. Los resultados se muestran en las Figuras 61 y 62 para TDF-Res y TDF-LPro, respectivamente.

De los resultados de disolución se determinó el efecto del pH en la disolución de TDF y las NFS. Los resultados obtenidos no muestran cambios en la disolución de TDF y TDF-Res, lo cual era de esperarse al ser los componentes no ionizables en estos pHs. Por lo contrario, LPro tiene dos grupos ionizados ( $\text{COO}^-$  y  $\text{NH}_3^+$ ) a pH 6.5, lo cual genera una especie zwitterionica menos soluble, a diferencia de lo que ocurre en pH 1.6. Es de hacer notar que a pH 6.5 el cocrystal TDF-LPro se transforma a materias primas más lentamente, lo que generó un nivel de solubilización de TDF menor que a pH 1.6. Esto es congruente con los estudios de estabilidad en solución con MA 15, ya que como se aprecia en la Figura 62, a pH 1.6 se observa el patrón de DRXP de TDF a partir del primer minuto, mientras que a pH de 6.5 el patrón de DRXP de TDF-LPro se mantuvo hasta los 15 minutos.

Los estudios de disolución demostraron que el cocrystal TDF-LPro se disolvió en concentraciones muy similares a las de TDF a pH 1.6, pero alcanzó una concentración 5 veces mayor a pH 6.5 en el medio con polímero. A pH 6.5 el cocrystal se encuentra en un estado termodinámicamente más estable, ya que en este la diferencia en solubilidad entre el fármaco y el coformador es menor que a pH 1.6; esto genera que la transformación de fase del cocrystal a materias primas se dé más lentamente y genere una solubilización más sostenida con la presencia del polímero, dando como resultado un incremento en el ABC.

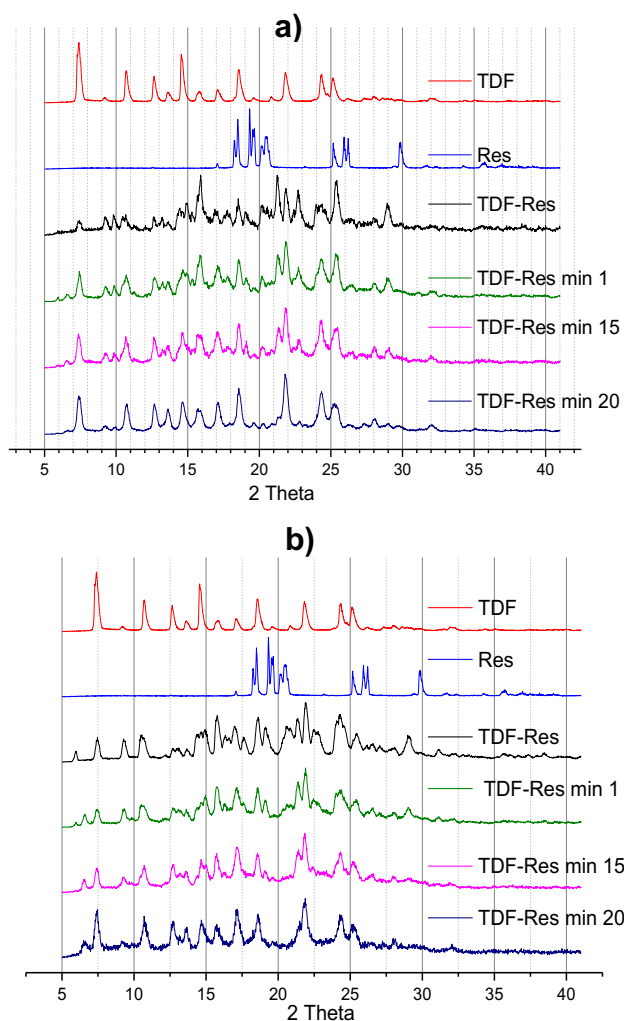
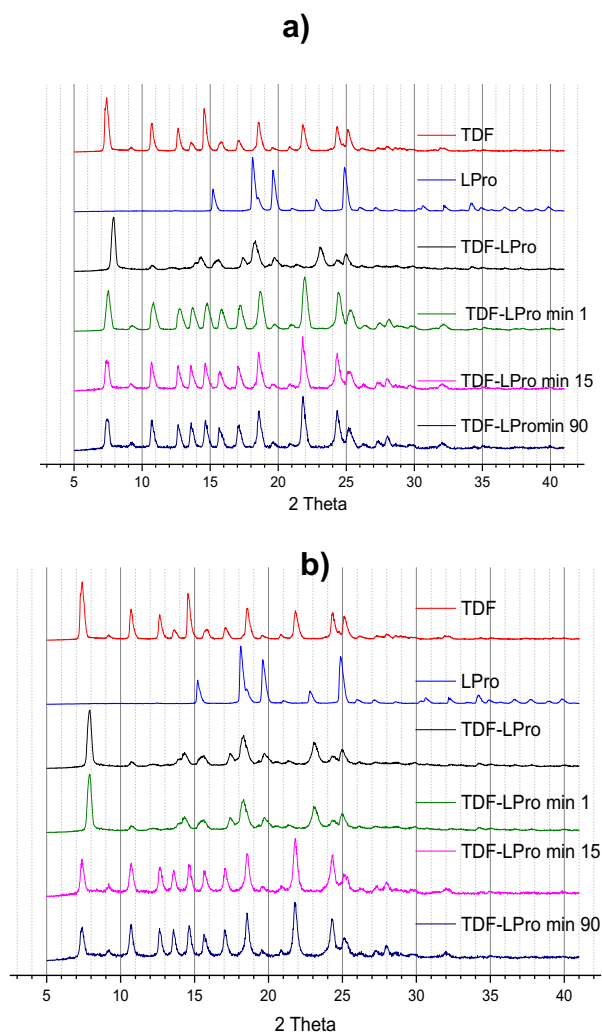


Figura 61. Patrones de DRXPs de TDF-Res obtenidos de la prueba de disolución de polvos con Methocel A15: a) pH 1.6, b) pH 6.5.



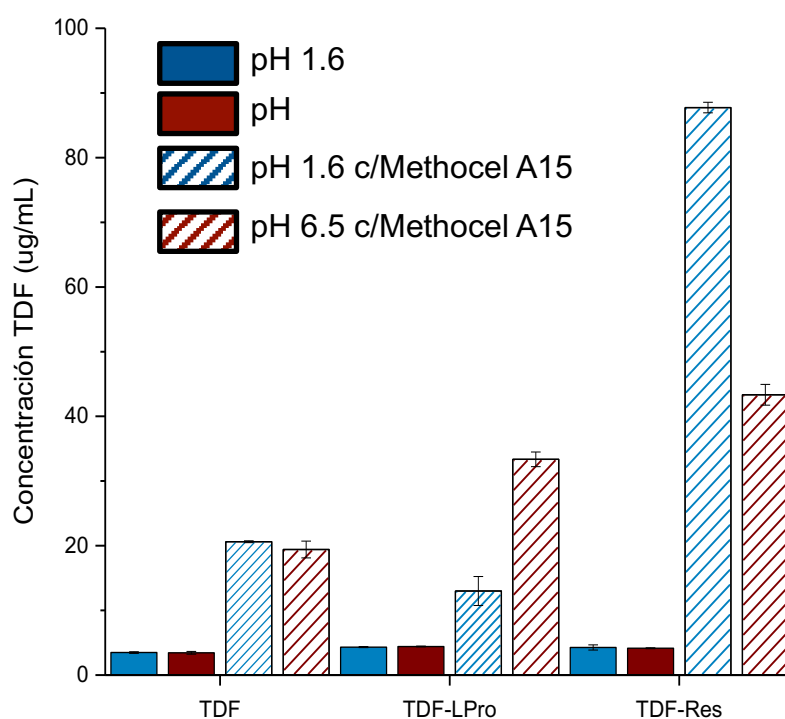
*Figura 62. Patrones de DRXPs de TDF-LPro obtenidos de la prueba de disolución de polvos con Methocel A15. a) pH 1.6, b) pH 6.5.*

Finalmente, se determinó la solubilidad de TDF solo y el proveniente de las NFS en ausencia del polímero, y la solubilidad aparente de este con la presencia del polímero MA 15. Los resultados se muestran en la tabla 16 y en la figura 63; cabe destacar que las tendencias son similares a las de la cuantificación de ABC, y coinciden con las concentraciones obtenidas en disolución de polvos. Mediante este estudio se demostró que la cocrystalización de TDF con Res y LPro, respectivamente, en presencia del polímero Methocel A15 incrementa hasta 26 y 10 veces, respectivamente, la concentración disuelta de TDF. Así mismo se demostró mediante el análisis estadístico por Startgraphics® (Anexo IX), que las diferencias entre los grupos con y sin methocel son diferentes estadísticamente significativos

( $p= 0.016$ ). Lo anteriormente expuesto demuestra que usando estas estrategias se puede mejorar considerablemente la solubilidad del fármaco.

**Tabla 16. Valores promedio de concentración de TDF ( $\mu\text{g/mL}$ ) solo y en las NFS, bajo las diferentes condiciones evaluadas.**

	s/Methocel A15				c/Methocel A15			
	pH 1.6	DE	pH 6.5	DE	pH 1.6	DE	pH 6.5	DE
TDF	3.40	0.13	3.40	0.21	20.60	0.14	19.40	1.34
TDF-LPro	4.32	0.08	4.42	0.06	13.00	2.25	33.35	1.13
TDF-Res	4.20	0.4	4.15	0.07	87.74	0.82	43.34	1.61



*Figura 63. Solubilidad y solubilidad aparente de TDF y las NFS respectivamente, en diferentes medios de disolución, con y sin Methocel A-15 al 0.5%. (media  $\pm$  DE).*

## 10. Conclusiones

Se sintetizaron dos NFS de TDF en combinación con resorcinol (TDF-Res) y L-Proлина (TDF-LPro), respectivamente, con una proporción molar 1:1, mediante la técnica de reacción mecanoquímica utilizando acetona como disolvente. Las NFS se caracterizaron mediante técnicas físicas (DRXP y calorimetría) y espectroscópicas (IR), sugiriendo la formación de cocristales farmacéuticos de TDF. Los estudios de disolución de los cocristales TDF-Res y TDF-LPro muestran la generación de soluciones supersaturadas del IFA, en las cuales se observa una reprecipitación inmediata de TDF. El uso del polímero Methocel A15 en una concentración de 0.5% fue un factor determinante que incrementó y prolongó las concentraciones disueltas de TDF provenientes de los cocristales. El sistema cocrystalino TDF-Res con el polímero fue particularmente efectivo para mantener concentraciones mayores de TDF soluble.

Algunas observaciones adicionales de relevancia, producto de este trabajo de investigación son:

- Las fases de TDF, Res y TDF-Res, no sufren transformación de fase bajo las condiciones de estabilidad indicativa, en contraste, TDF-LPro y L-prolina se transforman en condiciones de alta humedad y temperatura, por lo cual el coformador y la NFS deberán ser almacenados bajo condiciones de humedad y temperatura controladas.
- También se comprobó que ambas fases se transforman rápidamente a materias primas en soluciones de pH 1.6 y 6.5, induciéndose una rápida precipitación del fármaco.
- Se desarrolló un método de HPLC que permite cuantificar a TDF y Res, y se evaluó su adecuabilidad, linealidad, precisión, límite de detección y de cuantificación. El método resultó ser adecuado y lineal para la cuantificación del IFA.



- Se demostró que mediante la cocrystalización de TDF con los coformadores y el polímero adecuados se puede incrementar la solubilidad de TDF por un tiempo prolongado, lo que favorecerá su desarrollo farmacéutico y su desempeño farmacológico.

Finalmente, mediante este trabajo se determinó que la cocrystalización de TDF y el uso de un polímero adecuado, permiten mejorar las propiedades fisicoquímicas de TDF, en particular es notable la capacidad del cocrystal para generar soluciones de TDF con concentraciones mayores a su solubilidad termodinámica (*v.gr.* supersaturación), así como la capacidad del polímero de incrementar el tiempo que permanece el TDF soluble debido a la inhibición de su precipitación.

Dado que TDF no presenta problemas de permeabilidad, se espera que la mejora en solubilización del IFA impacte positivamente en su nivel de absorción y biodisponibilidad.

## **11. Perspectivas**

1. Determinar la estructura cristalina de las NFS TDF-Res y TDF-LPro por difracción de rayos X de monocristal.
2. Realizar estudios de disolución en el aparato I, comparando la formulación de los cocristales TDF-Res y TDF-LPro en conjunto con el polímero MA15 y la formulación comercial de TDF Cialis ®.

## 12. Referencias

- Abdel-Aziz, A. A., Asiri, Y. A., El-Azab, A. S., Al-Omar, M. A., & Kunieda, T. (2011). Tadalafil. *Profiles of drug substances, excipients, and related methodology*, 36, 287-329.
- Aitipamula, S., Banerjee, R., Bansal, A. K., Biradha, K., Cheney, M. L., Choudhury, A. R., ... & Ghogale, P. P. (2012). Polymorphs, salts, and cocrystals: what's in a name? *Crystal growth & design*, 12(5), 2147-2152.
- Almarsson, Ö., Peterson, M. L., & Zaworotko, M. (2012). The A to Z of pharmaceutical cocrystals: a decade of fast-moving new science and patents. *Pharmaceutical patent analyst*, 1(3), 313-327.
- Alvani, A., Jouyban, A., & Shayanfar, A. (2019). The effect of surfactant and polymer on solution stability and solubility of tadalafil-methylparaben cocrystal. *Journal of molecular liquids*, 281, 86-92.
- Baek, J. S., Pham, C. V., Myung, C. S., & Cho, C. W. (2015). Tadalafil-loaded nanostructured lipid carriers using permeation enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, 495(2), 701-709.
- Baek, J. S., & Cho, C. W. (2016). Transdermal delivery of tadalafil using a novel formulation. *Drug delivery*, 23(5), 1571-1577. Pharmaceutical cocrystals: walking the talk. *Chemical communications*, 52(54), 8342-8360.
- Bavishi, D. D., y Borkhataria, C. H. (2016). Spring and parachute: How cocrystals enhance solubility. *Progress in crystal growth and characterization of materials*, 62(3), 1-8.
- Berben, P., Brouwers, J., & Augustijns, P. (2018). Assessment of passive intestinal permeability using an artificial membrane insert system. *Journal of pharmaceutical sciences*, 107(1), 250-256
- Bernardes, C. E., Lopes, M. L. M., Ascenso, J. R., & Piedade, M. E. M. (2014). From molecules to crystals: the solvent plays an active role throughout the nucleation pathway of molecular organic crystals. *Crystal growth & design*, 14(11), 5436-5441

- Bond, A. D. (2011). Fundamental aspects of salts and co-crystals. In *Pharmaceutical Salts and Co-crystals* (pp. 9-28). Royal Society of Chemistry. Edited by: Wouters J. y Quéré L.
- Bou-Chacra, N., Melo, K. J. C., Morales, I. A. C., Stippler, E. S., Kesisoglou, F., Yazdaniyan, M., & Löbenberg, R. (2017). Evolution of choice of solubility and dissolution media after two decades of biopharmaceutical classification system. *The AAPS journal*, 19(4), 989-1001
- Box, K. J., & Comer, J. E. A. (2008). Using measured pKa, LogP and solubility to investigate supersaturation and predict BCS class. *Current drug metabolism*, 9(9), 869-878.
- Brock, G. B., McMahon, C. G., Chen, K. K., Costigan, T., Shen, W., Watkins, V., ... & Whitaker, S. (2002). Efficacy and safety of tadalafil for the treatment of erectile dysfunction: results of integrated analyses. *The Journal of urology*, 168(4), 1332-1336.
- Carlos-Martínez J.G. (2017). Desarrollo farmacéutico de cocristales de Tadalafilo. Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Co-Directores: Dra. Dea Herrera Ruiz y Dr. Hugo Morales Rojas. (*Tesis de Maestría*).
- Carson, C. C., & Lue, T. F. (2005). Phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction. *BJU international*, 96(3), 257-280.
- Chadha, R., Bhalla, Y., Vashisht, M. K., & Chadha, K. (2015). Cocrystallization in nutraceuticals. *Recrystallization in Materials Processing*, 35-50.
- Cheney, M. L., Weyna, D. R., Shan, N., Hanna, M., Wojtas, L., & Zaworotko, M. J. (2011). Cofomer selection in pharmaceutical cocrystal development: a case study of a meloxicam aspirin cocrystal that exhibits enhanced solubility and pharmacokinetics. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(6), 2172-2181.
- Childs, S. L., Kandi, P., & Lingireddy, S. R. (2013). Formulation of a danazol cocrystal with controlled supersaturation plays an essential role in improving bioavailability. *Molecular pharmaceuticals*, 10(8), 3112-3127.

- Coward, R. M., & Carson, C. C. (2008). Tadalafil in the treatment of erectile dysfunction. *Therapeutics and clinical risk management*, 4(6), 1315.
- Curran, M. P., & Keating, G. M. (2003). Tadalafil. *Drugs*, 63(20), 2203-2212.
- DeFelice, S. L. (1997). The Nutraceutical Revolution: What is it?. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, 14(1), 1-4.
- Desiraju, G. R. (2013). Crystal engineering: from molecule to crystal. *Journal of the American Chemical Society*, 135(27), 9952-9967.
- Di, L., Kerns, E. H., & Carter, G. T. (2009). Drug-like property concepts in pharmaceutical design. *Current pharmaceutical design*, 15(19), 2184-2194.
- Di, L., & Kerns, E. H. (2015). *Drug-like properties: concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization*. Academic press
- 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.
- Eardley, I., Donatucci, C., Corbin, J., El-Meliegy, A., Hatzimouratidis, K., McVary, K.... & Lee, S. W. (2010). Pharmacotherapy for erectile dysfunction. *The journal of sexual medicine*, 7(1), 524-540.
- El-Badry, M., Haq, N., Fetih, G., & Shakeel, F. (2014). Solubility and dissolution enhancement of tadalafil using self-nanoemulsifying drug delivery system. *Journal of oleo science*, 63(6), 567-576.
- 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 pharmaceuticals*, 453(1), 88-100.
- Espín, J. C., García-Conesa, M. T., & Tomás-Barberán, F. A. (2007). Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2986-3008.
- Feldman, H. A., Johannes, C. B., Derby, C. A., Kleinman, K. P., Mohr, B. A., Araujo, A. B., & McKinlay, J. B. (2000). Erectile dysfunction and coronary risk factors: prospective results from the Massachusetts male aging study. *Preventive medicine*, 30(4), 328-338.

- Fejős, I., Kazsoki, A., Sohajda, T., Márványos, E., Volk, B., Szente, L., & Béni, S. (2014). Interactions of non-charged tadalafil stereoisomers with cyclodextrins: Capillary electrophoresis and nuclear magnetic resonance studies. *Journal of Chromatography A*, 1363, 348-355.
- Friščić, T., & Jones, W. (2010). Benefits of cocrystallisation in pharmaceutical materials science: an update. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62(11), 1547-1559.
- Food and Drug Administration. (2017). Q3C-Tables and List Guidance for Industry.
- Gao, P., y Shi, Y. (2012). Characterization of supersaturatable formulations for improved absorption of poorly soluble drugs. *The AAPS journal*, 14(4), 703-713.
- Good, D. J., & Rodriguez-Hornedo, N. (2010). Solubility advantage of pharmaceutical cocrystals. *Crystal Growth and Design*, 10(5), 1028-1032.
- Gupta, M., Kovar, A., y Meibohm, B. (2005). The clinical pharmacokinetics of phosphodiesterase-5 inhibitors for erectile dysfunction. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 45(9), 987-1003.
- Hamishehkar, H., Khoshbakht, M., Jouyban, A., & Ghanbarzadeh, S. (2015). The relationship between solubility and transdermal absorption of Tadalafil. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 5(3), 411.
- Hanna, M., Shan, N., Cheney, M. L., & Weyna, D. R. (2013). *U.S. Patent No. 8,586,587*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Healy, A. M., Worku, Z. A., Kumar, D., & Madi, A. M. (2017). Pharmaceutical solvates, hydrates and amorphous forms: A special emphasis on cocrystals. *Advanced drug delivery reviews*, 117, 25-46.
- Herrera-Ruiz, D., Mondragón-Vásquez, K., Morales-Rojas, H., Senosiain-Peláez, J. P., Höpfl H. "Nuevas Formas Sólidas de Inhibidores de Fosfodiesterasa Tipo 5". Concedida en México (MX 357741B) Julio 23, 2018.
- Herrera-Ruiz, D., Mondragón-Vásquez, K., Morales-Rojas, H., Senosiain-Peláez, J. P., Höpfl H. "Nuevas Formas Sólidas de Inhibidores de Fosfodiesterasa Tipo 5". Concedida en Rusia (RU 2634713) Noviembre 3, 2017.

- Herrera-Ruiz, D., Mondragón-Vásquez, K., Morales-Rojas, H., Senosiain-Peláez, J.P., Höpfl H. "Co-crystals of Taladafil and a Hydroxy-substituted Benzoic Acid Coformer as Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors". Concedida en los EEUU (US 9278970 B2) Marzo 8, 2016.
- Herrera-Ruiz, D., Mondragón-Vásquez, K., Morales-Rojas, H., Senosiain-Peláez, J.P., Höpfl H. "Nuevas Formas Sólidas de Inhibidores de Fosfodiesterasa Tipo 5". Concedida en España (ES2530423) Enero 21, 2016.
- Hu, Y., Gniado, K., Erxleben, A., & McArdle, P. (2014). Mechanochemical reaction of sulfathiazole with carboxylic acids: Formation of a cocrystal salt, and coamorphous solids. *Crystal Growth & Design*, 14(2), 803-813.
- Huang, Y., Kuminek, G., Roy, L., Cavanagh, K. L., Yin, Q., & Rodríguez-Hornedo, N. (2019). Cocrystal solubility advantage diagrams as a means to control dissolution, supersaturation, and precipitation. *Molecular pharmaceutics*, 16(9), 3887-3895.
- Huang, L. F., & Tong, W. Q. T. (2004). Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. *Advanced drug delivery reviews*, 56(3), 321-334.
- Ivanisevic, I., McClurg, R. B., & Schields, P. J. (2010). Uses of X-ray powder diffraction in the pharmaceutical industry. *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development, and Manufacturing*, 1-42.
- Jampílek, J., & Dohnal, J. (2012). Investigation of Carbohydrates and Their Derivatives as Crystallization Modifiers. *Carbohydrates-Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*, 81-116.
- Kale, D. P., Zode, S. S., & Bansal, A. K. (2017). Challenges in translational development of pharmaceutical Cocrystals. *Journal of pharmaceutical sciences*, 106(2), 457-470.
- Kavanagh, O. N., Croker, D. M., Walker, G. M., & Zaworotko, M. J. (2019). Pharmaceutical cocrystals: from serendipity to design to application. *Drug Discovery Today*, 24(3), 796-80.

- Kulla, H., Greiser, S., Benemann, S., Rademann, K., & Emmerling, F. (2016). In situ investigation of a self-accelerated cocrystal formation by grinding pyrazinamide with oxalic acid. *Molecules*, *21*(7), 917.
- Kuminek, G., Cavanagh, K. L., da Piedade, M. F. M., & Rodríguez-Hornedo, N. (2019). Posaconazole cocrystal with superior solubility and dissolution behavior. *Crystal Growth & Design*, *19*(11), 6592-660.
- Kwok, K., & Taylor, L. S. (2012). Analysis of counterfeit Cialis® tablets using Raman microscopy and multivariate curve resolution. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *66*, 126-135.
- Laumann, E. O., Paik, A., & Rosen, R. C. (1999). Sexual dysfunction in the United States: prevalence and predictors. *Jama*, *281*(6), 537-544.
- Löbmann, K., Grohgan, H., Laitinen, R., Strachan, C., & Rades, T. (2013). Amino acids as co-amorphous stabilizers for poorly water soluble drugs Part 1: Preparation, stability and dissolution enhancement. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *85*(3), 873-881.
- Lue, T. F. (2000). Erectile dysfunction. *New England Journal of Medicine*, *342*(24), 1802-1813.
- Macrae, C. F., Sovago, I., Cottrell, S. J., Galek, P. T., McCabe, P., Pidcock, E., ... & Wood, P. A. (2020). Mercury 4.0: from visualization to analysis, design and prediction. *Journal of Applied Crystallography*.
- Maheshwari, C., André, V., Reddy, S., Roy, L., Duarte, T., & Rodríguez-Hornedo, N. (2012). Tailoring aqueous solubility of a highly soluble compound via cocrystallization: effect of cofomer ionization, pH max and solute–solvent interactions. *CrystEngComm*, *14*(14), 4801-4811.
- Menczel, J. D., & Prime, R. B. (Eds.). (2009). *Thermal analysis of polymers: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons
- Miclaus, M. O., Kacso, I. E., Martin, F. A., David, L., Pop, M. M., Filip, C., & Filip, (2015). Crystal structure and desolvation behaviour of the tadalafil monosolvates with acetone and methyl ethyl ketone. *Journal of pharmaceutical sciences*, *104*(11), 3782-3788.



- Montague, D. K., Jarow, J. P., Broderick, G. A., Dmochowski, R. R., Heaton, J. P., Lue, T. F., ... & Sharlip, I. D. (2005). The management of erectile dysfunction: an AUA update. *The Journal of urology*, 174(1), 230-239.
- Morales, A. M., & Chicharro, R. V. (2010). Tratamiento de la disfunción eréctil. *Ventana a otras especialidades*, 7(6), 300-303.
- Morissette, S. L., Almarsson, Ö., Peterson, M. L., Remenar, J. F., Read, M. J., Lemmo, A. V., ... & Gardner, C. R. (2004). High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids. *Advanced drug delivery reviews*, 56(3), 275-300.
- Nainar, S., Rajiah, K., Angamuthu, S., Prabakaran, D., & Kasibhatta, R. (2012). Biopharmaceutical Classification System in Invitro/In-vivo Correlation: Concept and Development Strategies in Drug Delivery. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2), 319-329.
- Pandurang, B. D., Bharat, B.B., Sachin, S.S. & Pranay, P.S. "process for preparing tadalafil and its intermediate". Concedida en Estados Unidos (US 7,223,863 B9) 29 de mayo del 2007.
- Pharmacopeia, U. S. (2007). USP 30/NF 25. The United States Pharmacopeial Convention. *Inc. Rockville, USA*.
- Portell, A., Barbas, R., Prohens, R., & Puigjaner, C. (2009). Cocrisales farmacéuticos: el nuevo reto. *EL FARMACÉUTICO*, (419), 2.
- 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.
- Remenar, J. F., Peterson, M. L., Stephens, P. W., Zhang, Z., Zimenkov, Y., & Hickey, M. B. (2007). Celecoxib: nicotinamide dissociation: using excipients to capture the cocrystal's potential. *Molecular pharmaceutics*, 4(3), 386-400.
- Rodríguez, G. F., Corbacho, A. M., & Gómez, M. C. (2003). Disfunción eréctil: abordaje y tratamiento integral desde atención primaria. *FMC-Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, 10(7), 471-483.
- Rojas Camargo, A. P., y Cabeza Zabala, L. Y. (2014). *Estudio comparativo de tecnología DSC e infrarrojo en la identificación de posibles incompatibilidades*

- en mezclas binarias activo-excipientes* (Bachelor's thesis). Universidad de Ciencias Ambientales y Aplicadas.
- Rotella, D. P. (2002). Phosphodiesterase 5 inhibitors: current status and potential applications. *Nature reviews Drug discovery*, 1(9), 674-682.
- Sachan, N. K., Bhattacharya, A., Pushkar, S., & Mishra, A. (2014). Biopharmaceutical classification system: A strategic tool for oral drug delivery technology. *Asian J Pharm*, 3(2).
- Salas-Zúñiga, R., Rodríguez-Ruiz, C., Höpfl, H., Morales-Rojas, H., Sánchez Guadarrama, O., Rodríguez-Cuamatzi, P., & Herrera-Ruiz, D. (2020). Dissolution Advantage of Nitazoxanide Cocrystals in the Presence of Cellulosic Polymers. *Pharmaceutics*, 12(1), 23.
- Sánchez, L. G., Ruiz, L. G. G., Martínez, C. S., & Loveccio, A. M. (2002). Disfunción eréctil en Atención Primaria como posible marcador del estado de salud: actores asociados y respuesta al sildenafil. *Atención primaria*, 30(5), 290-296.
- Santini, A., Cammarata, S. M., Capone, G., Ianaro, A., Tenore, G. C., Pani, L., & Novellino, E. (2018). Nutraceuticals: Opening the debate for a regulatory framework. *British journal of clinical pharmacology*, 84(4), 659-672.
- 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.
- Selvin, E., Burnett, A. L., & Platz, E. A. (2007). Prevalence and risk factors for erectile dysfunction in the US. *The American journal of medicine*, 120(2), 151-157.
- Shah, N., Iyer, R. M., Mair, H. J., Choi, D. S., Tian, H., Diodone, R., ... & Grippo, J. F. (2013). Improved human bioavailability of vemurafenib, a practically insoluble drug, using an amorphous polymer-stabilized solid dispersion prepared by a solvent-controlled coprecipitation process. *Journal of pharmaceutical sciences*, 102(3), 967-981.
- Shamloul, R., & Ghanem, H. (2013). Erectile dysfunction. *The Lancet*, 381(9861), 153-165.

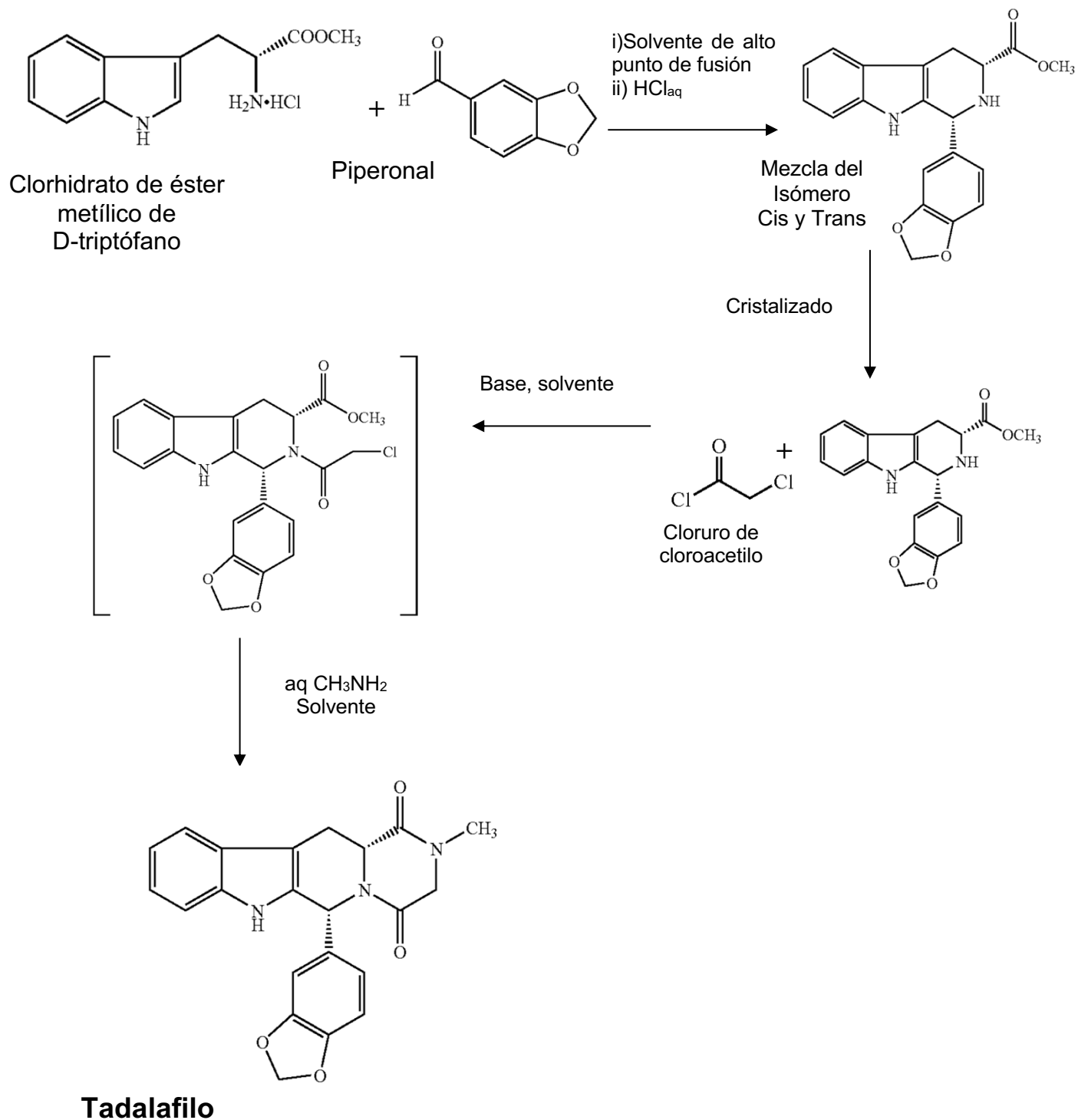
- Shan, N., Toda, F., & Jones, W. (2002). Mechanochemistry and co-crystal formation: effect of solvent on reaction kinetics. *Chemical Communications*, (20), 2372–2373.
- Shan, N., & Zaworotko, M. J. (2008). The role of cocrystals in pharmaceutical science. *Drug Discovery Today*, 13(9-10), 440-446.
- Shimpi, M. R., Alhayali, A., Cavanagh, K. L., Rodríguez-Hornedo, N., & Velaga, S. P. (2018). Tadalafil–malonic acid cocrystal: Physicochemical characterization, pH-solubility, and supersaturation studies. *Crystal Growth & Design*, 18(8), 4378-4387
- Schultheiss, N., Bethune, S., & Henck, J. O. (2010). Nutraceutical cocrystals: utilizing pterostilbene as a cocrystal former. *CrystEngComm*, 12(8), 2436–2442.
- Sinha, A. S., Maguire, A. R., & Lawrence, S. E. (2015). Cocrystallization of nutraceuticals. *Crystal Growth & Design*, 15(2), 984-1009.
- Swapna, B., Maddileti, D., & Nangia, A. (2014). Cocrystals of the tuberculosis drug isoniazid: polymorphism, isostructurality, and stability. *Crystal growth & design*, 14(11), 5991-6005
- Taylor, C. R., & Day, G. M. (2018). Evaluating the energetic driving force for cocrystal formation. *Crystal growth & design*, 18(2), 892-904.
- Thakuria, R., & Sarma, B. (2018). Drug-drug and drug-nutraceutical cocrystal/salt as alternative medicine for combination therapy: a crystal engineering approach. *Crystals*, 8(2), 101.
- Užarević, K., Halasz, I., & Friščić, T. (2015). Real-time and in situ monitoring of mechanochemical reactions: A new playground for all chemists. *The journal of physical chemistry letters*, 6(20), 4129-4140.
- Villeda-Sandoval, C. I., Calao-Pérez, M. B., Herrera-Cáceres, J. O., González Cuenca, E., Rodríguez-Covarrubias, F., & Castillejos-Molina, R. A. (2015). Erectile dysfunction and associated risk factors among young Mexican adults: The importance of partner availability. *Revista Mexicana de Urología*, 75(5), 260-265.

- Vippagunta, S. R., Brittain, H. G., & Grant, D. J. (2001). Crystalline solids. *Advanced drug delivery reviews*, 48(1), 3-26
- Vologzhanina, A. V. (2019). Intermolecular Interactions in Functional Crystalline Materials: From Data to Knowledge. *Crystals*, 9(9), 478.
- Vyas, V., Sancheti, P., Karekar, P., Shah, M., & Pore, Y. (2009). Physicochemical characterization of solid dispersion systems of tadalafil with poloxamer 407. *Acta pharmaceutica*, 59(4), 453-461.
- Wlodarski, K., Sawicki, W., Haber, K., Knapik, J., Wojnarowska, Z., Paluch, M., ...y Tajber, L. (2015). Physicochemical properties of tadalafil solid dispersions Impact of polymer on the apparent solubility and dissolution rate of tadalafil. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 94, 106-115.
- Wlodarski, K., Sawicki, W., Paluch, K. J., Tajber, L., Grembecka, M., Hawelek, L., ... & Paluch, M. (2014). The influence of amorphization methods on the apparent solubility and dissolution rate of tadalafil. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62, 132-140.
- Wood, P. A., Olsson, T. S., Cole, J. C., Cottrell, S. J., Feeder, N., Galek, P. T., ... & Pidcock, E. (2013). Evaluation of molecular crystal structures using Full Interaction Maps. *CrystEngComm*, 15(1), 65-72.
- Wood, P. A., Feeder, N., Furlow, M., Galek, P. T., Groom, C. R., & Pidcock, E. (2014). Knowledge-based approaches to co-crystal design. *CrystEngComm*, 16(26), 5839-5848.
- 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.
- Vyas, V., Sancheti, P., Karekar, P., Shah, M., & Pore, Y. (2009). Physicochemical characterization of solid dispersion systems of tadalafil with poloxamer 407. *Acta pharmaceutica*, 59(4), 453-461
- Weyna, D. R., Cheney, M. L., Shan, N., Hanna, M., Wojtas, L., & Zaworotko, M. J. (2012). Crystal engineering of multiple-component organic solids:

Pharmaceutical cocrystals of tadalafil with persistent hydrogen bonding motifs. *CrystEngComm*, 14(7), 2377-2380.

Wright, P. J. (2006). Comparison of phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors. *International journal of clinical practice*, 60(8), 967-975

**ANEXO I**  
**Ruta de Síntesis de Tadalafilo**  
(Pandurang *et al.*, 2007)



## ANEXO II

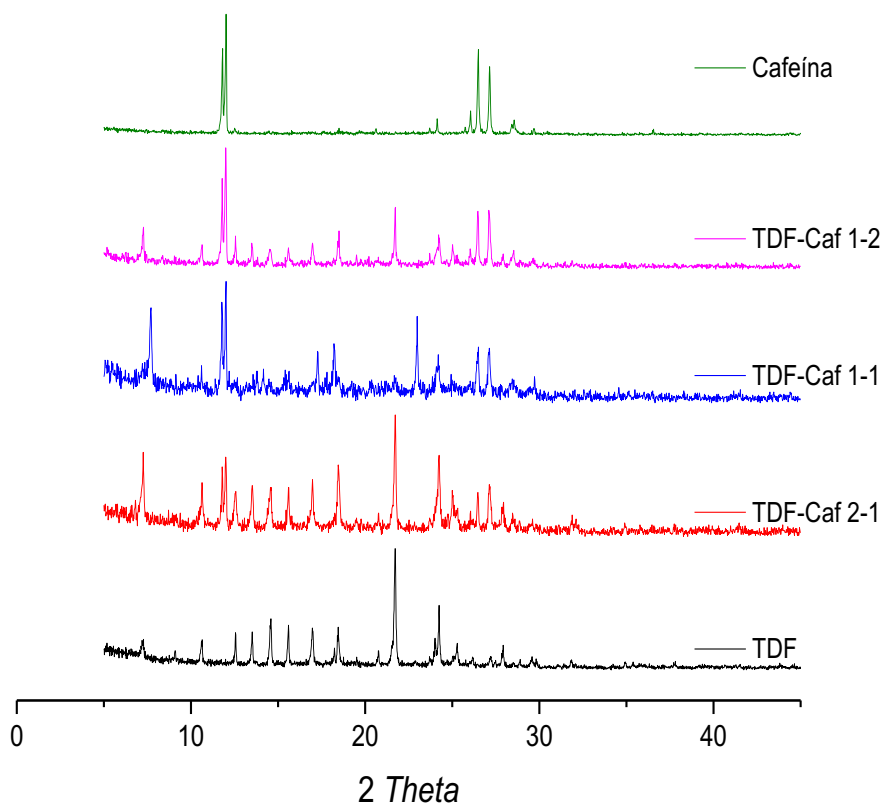


Figura 1. Patrones de DRXPs de Tadalafilo (TDF), Cafeína (Caf), y el sólido TDF-Caf analizado a diferentes relaciones molares.

### ANEXO III

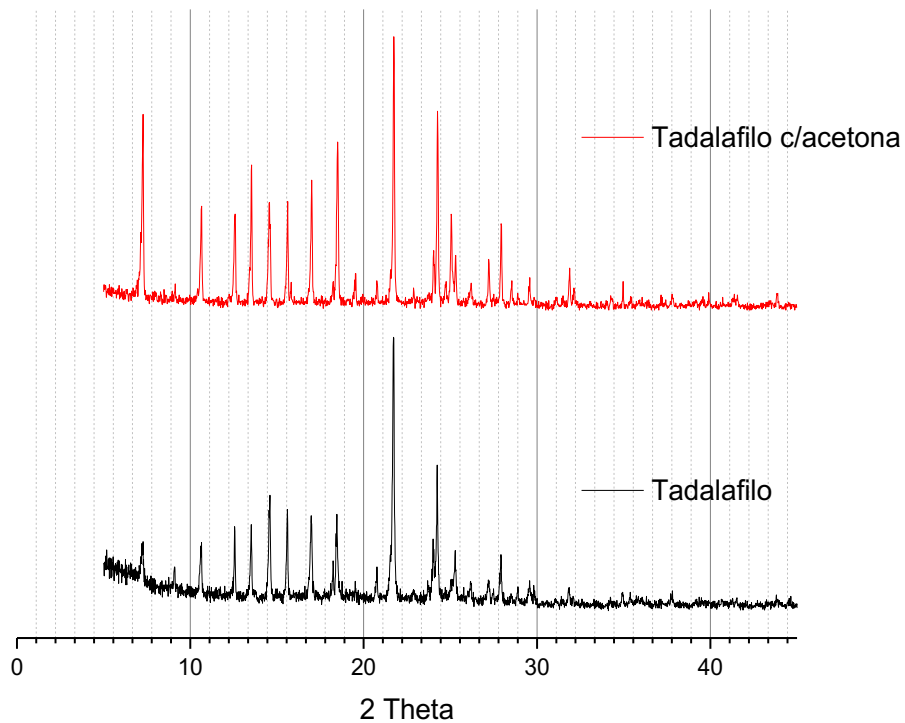


Figura 2. Patrones de DRXPs de Tadalafil, con y sin acetona.

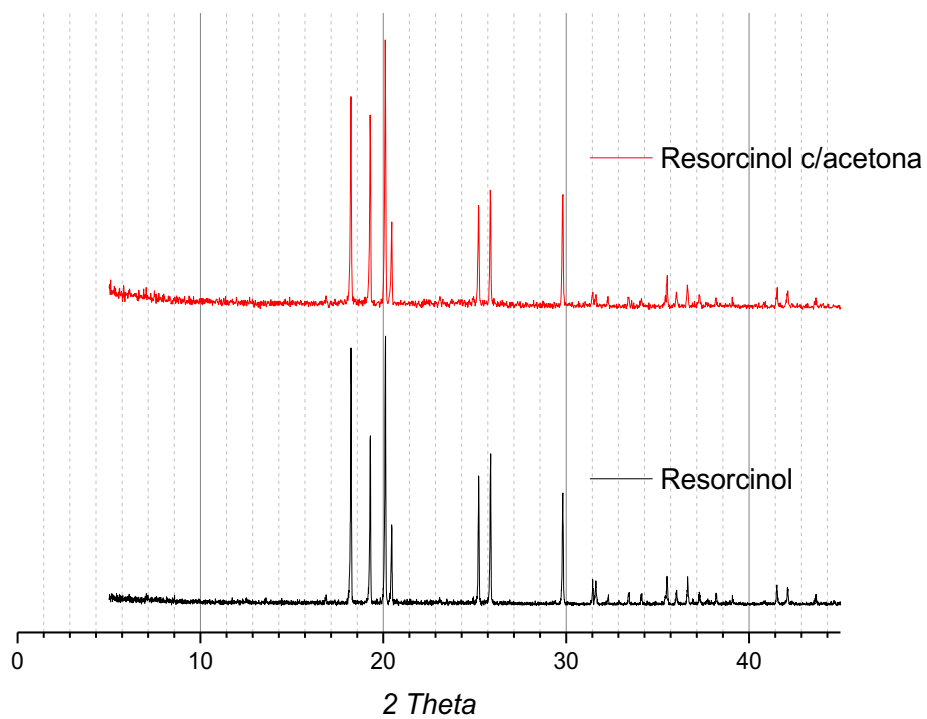


Figura 3. Patrones de DRXPs de Resorcinol, con y sin acetona.



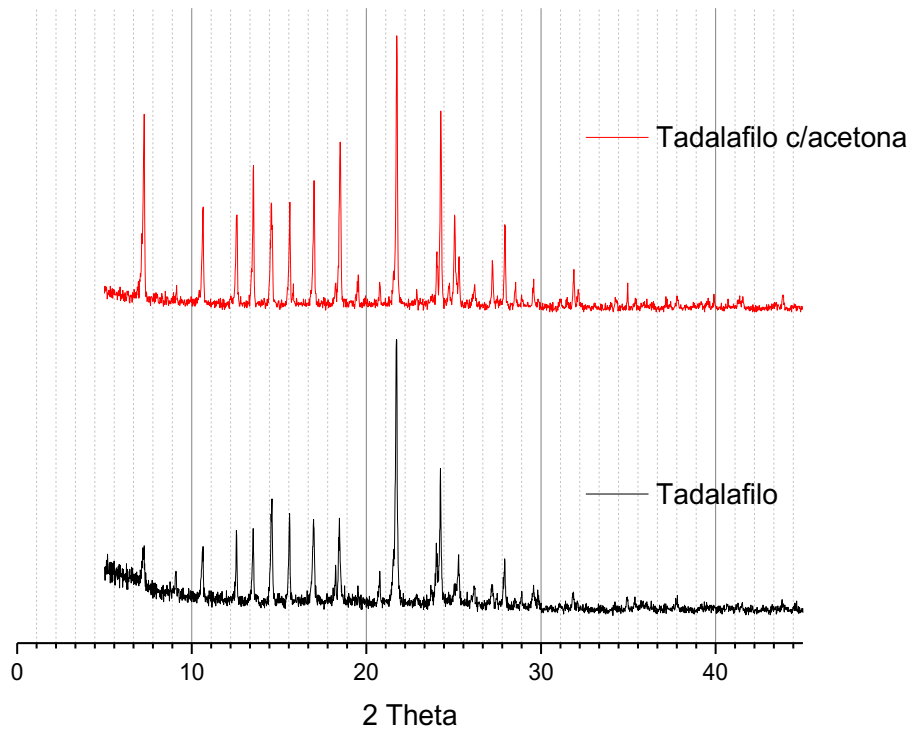


Figura 4. Patrones de DRXPs de L-Prolina, con y sin acetona.

## ANEXO IV

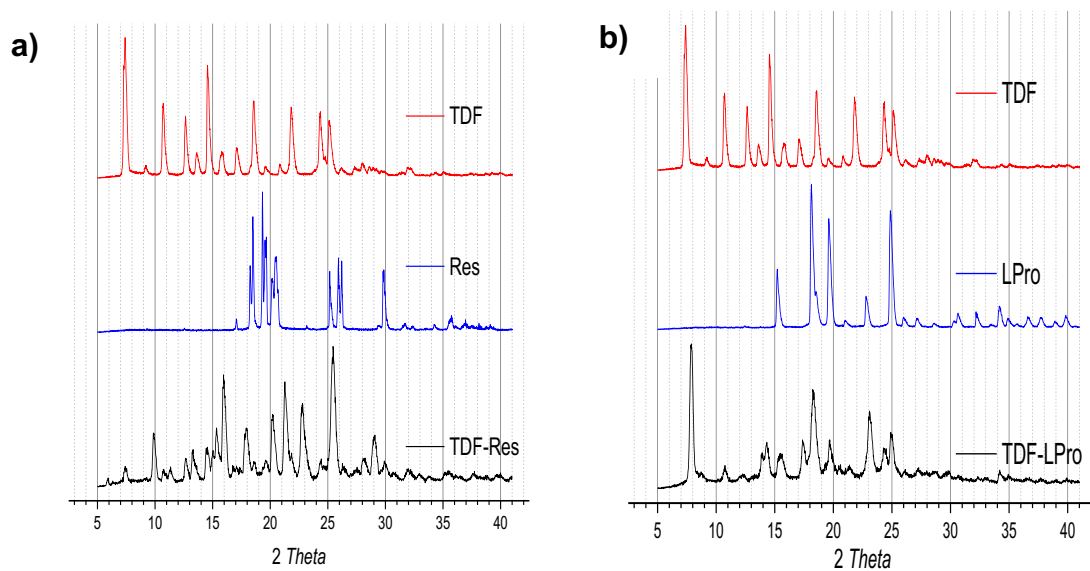


Figura 5. DRXP de NFS: a) TDF-Res y materias primas; b) TDF-LPro y materias primas.

# ANEXO V

## System Suitability Report

Page 1 of 1

Sequence : D:\Result\2. irma\3. STDs\OCTUBRE\std TDF 26mcg adecua.rsl\std TDF 26mcg adecua.rst  
 User : SYSTEM (SYSTEM)  
 Printed : 3/11/2020 1:43:08 PM (GMT -06:00)

Sample ID	Data Filename
std TDF	std TDF 26mcg adecua-Rep1.dat
26mcg adecua	
std TDF	std TDF 26mcg adecua-Rep2.dat
26mcg adecua	
std TDF	std TDF 26mcg adecua-Rep3.dat
26mcg adecua	
std TDF	std TDF 26mcg adecua-Rep4.dat
26mcg adecua	
std TDF	std TDF 26mcg adecua-Rep5.dat
26mcg adecua	

System is Suitable

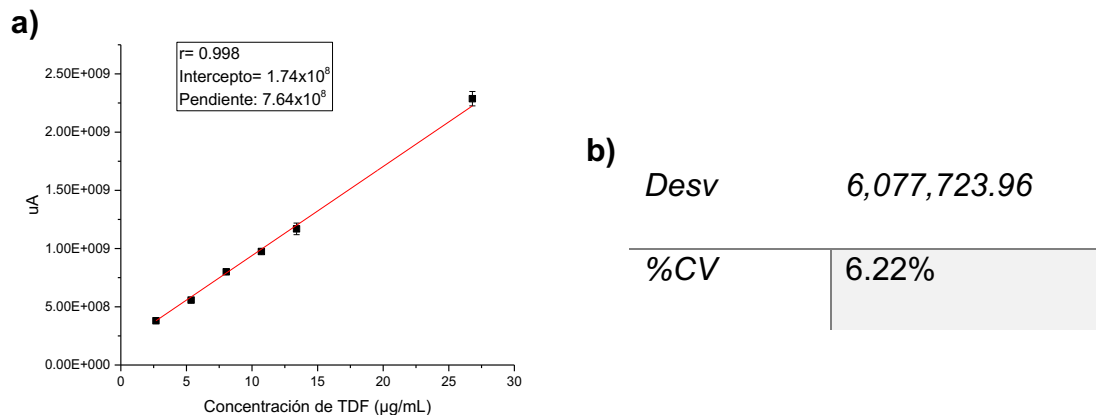
DAD: Signal A, 280.0 nm/Bw:4.0 nm Ref 360.0 nm/Bw:100.0 nm	Compound	Parameter	Min	Max	%RSD
---	----------	-----------	-----	-----	------

	<b>TDF_280</b>	Retention Time			2
		Area			2

Sample ID	Compound	Parameter	Average	Low	High	%RSD	Status
	<b>TDF_280</b>	Retention Time	3.664	3.653	3.667	0.163	
std TDF		3.667					Passed
26mcg adecua							
std TDF		3.653					Passed
26mcg adecua							
std TDF		3.667					Passed
26mcg adecua							
std TDF		3.667					Passed
26mcg adecua							
std TDF		3.667					Passed
26mcg adecua							
		Area	4339289360	4329175867	4351142259	0.197	
std TDF		4335829386					Passed
26mcg adecua							
std TDF		4335978099					Passed
26mcg adecua							
std TDF		4344321188					Passed
26mcg adecua							
std TDF		4329175867					Passed
26mcg adecua							
std TDF		4351142259					Passed
26mcg adecua							

Figura 4. Reporte de adecuabilidad de Tadalafilo para tiempo de retención y área, respectivamente.

## ANEXO VI



Esquema 1. Datos de curva de calibración de TDF: a) Gráfico de linealidad ( $n=3 \pm DE$ ), b) Determinación del %CV según el FR.

<b>Día 1</b>					
<b>(µg/mL)</b>	<b>Área 1</b>	<b>Área 2</b>	<b>Área 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>
2.68	379,497,291.00	389,631,863.00	385,446,661.00	384,858,605.00	5,092,813.05
5.36	569,058,609.00	579,421,841.00	585,204,987.00	577,895,145.67	8,180,738.33
8.04	792,708,565.00	798,998,798.00	798,080,542.00	796,595,968.33	3,397,753.23
10.72	1,019,435,600.00	1,017,469,514.00	1,047,729,440.00	1,028,211,518.00	16,931,577.98
13.4	1,271,532,915.00	1,292,703,478.00	1,197,826,202.00	1,254,020,865.00	49,803,898.41
26.8	2,400,169,073.00	2,522,430,463.00	2,478,321,052.00	2,466,973,529.33	61,915,560.03

<b>FR1</b>	<b>FR2</b>	<b>FR3</b>		
105,231,594.40	103,758,817.54	104,634,123.13	<b>Promedio</b>	97,739,263.30
105,301,235.82	105,767,281.90	105,584,260.07	<b>DE</b>	4,454,540.45
98,252,233.71	98,134,069.03	98,379,465.80	<b>%CV</b>	4.56%
94,804,748.13	94,778,130.60	94,795,430.32	<b>r<sup>2</sup></b>	0.9995
96,321,575.75	96,347,181.72	96,282,124.85	<b>Intercepto</b>	$7 \times 10^7$
93,674,180.78	93,703,183.47	93,963,847.57	<b>Pendiente</b>	$9 \times 10^7$

## Día 2

(µg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	DE
2.68	342,830,753.00	341,514,501.00	344,009,754.00	342,785,002.67	1,248,255.46
5.36	566,454,204.00	568,982,771.00	584,771,333.00	573,402,769.33	9,926,308.11
8.04	799,647,899.00	798,757,015.00	795,510,765.00	797,971,893.00	2,177,448.47
10.72	1,015,216,810.00	1,015,111,700.00	1,017,257,034.00	1,015,861,848.00	1,209,408.95
13.4	1,285,738,657.00	1,290,352,169.00	1,290,110,673.00	1,288,733,833.00	2,596,707.44
26.8	2,500,138,063.00	2,512,230,417.00	2,518,251,049.00	2,510,206,509.67	9,224,544.22

FR1	FR2	FR3		
107,921,922.76	107,430,783.96	108,361,848.51	<b>Promedio</b>	98,166,036.96
105,681,754.48	106,153,502.05	109,099,129.29	<b>DE</b>	5,292,675.74
99,458,693.91	99,347,887.44	98,944,125.00	<b>%CV</b>	5.39%
94,703,060.63	94,693,255.60	94,893,380.04	<b>r<sup>2</sup></b>	0.9994
95,950,646.04	96,294,937.99	96,276,915.90	<b>Intercepto</b>	8x10 <sup>7</sup>
93,288,733.69	93,739,940.93	93,964,591.38	<b>Pendiente</b>	9x10 <sup>7</sup>

**Día 3**

<b>(µg/mL)</b>	<b>Área 1</b>	<b>Área 2</b>	<b>Área 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>
2.68	335,620,673.00	331,673,631.00	334,019,450	353,771,251.33	1,985,191.95
5.36	564,414,624.00	566,912,631.00	565,931,634.00	565,752,963.00	1,258,551.64
8.04	789,947,959.00	788,997,915.00	790,970,905.00	789,972,259.67	986,719.45
10.72	1,016,306,900.00	1,016,021,560.00	1,016,207,013.00	1,016,178,491.00	144,792.46
13.4	1,290,709,115.00	1,291,052,235.00	1,290,180,473.00	1,290,647,274.33	439,158.79
26.8	2,510,468,045.00	2,511,245,317.00	2,518,231,115.00	2,513,314,825.67	4,275,331.98

<b>FR1</b>	<b>FR2</b>	<b>FR3</b>		
111,603,466.79	115,385,023.51	113,823,380.97	<b>Promedio</b>	97,689,102.07
106,167,650.93	108,101,089.74	109,180,034.89	<b>DE</b>	6,077,723.96
98,595,592.66	99,377,959.95	99,263,749.00	<b>%CV</b>	6.22%
95,096,604.48	94,913,200.93	97,735,955.22	<b>r</b>	0.998
94,890,516.04	96,470,408.81	89,390,015.07	<b>Intercepto</b>	1.74x10 <sup>8</sup>
89,558,547.50	94,120,539.66	92,474,666.12	<b>Pendiente</b>	7.64x10 <sup>8</sup>

## ANEXO VII

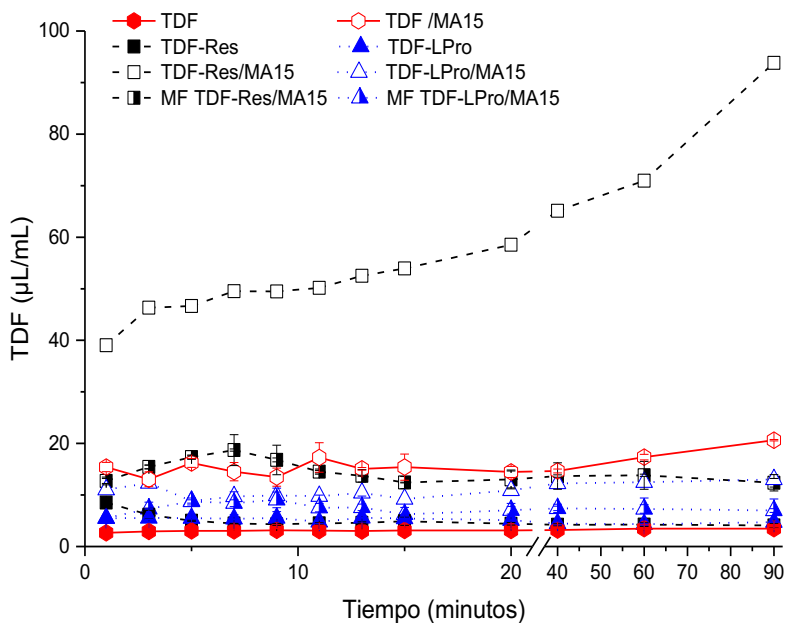


Figura 6. Perfil de disolución de polvos de TDF, NFS y MF en solución HCl 0.1 M pH 1.6 (media  $\pm$  DE).

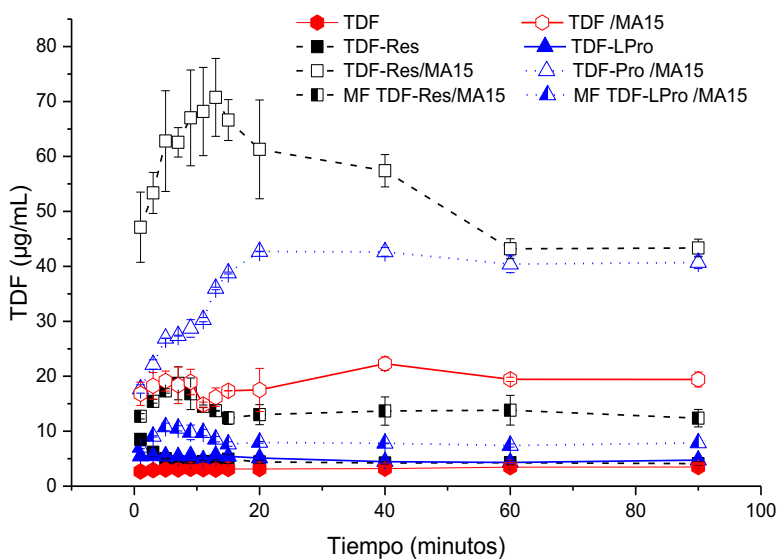


Figura 7. Perfil de disolución de polvos de TDF, NFS y MF en buffer de fosfatos 0.1M pH 6.5 (media  $\pm$  DE).

## ANEXO VIII

### Análisis Estadístico del ABC de TDF y de las NFS

#### 1. Tabla ANOVA comparación entre grupos

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,79365E7	1	1,79365E7	11,36	0,0071
Intra grupos	1,5783E7	10	1,5783E6		
Total (Corr.)	3,37195E7	11			

**El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 11,3644, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables con un nivel del 95,0% de confianza.

#### 2. Verificación de la Varianza

**Verificación de Varianza**

	Prueba	Valor-P
Levene's	5,93764	0,0196789

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
pH 1.6 c/MA15 / pH 1.6 s/MA15	2,37608	67,8994	0,00122459	0,0024
pH 1.6 c/MA15 / pH 6.5 s/MA15	2,37608	68,2373	0,00121249	0,0024
pH 1.6 c/MA15 / pH 6.5 c/MA15	2,37608	2,37608	1,0	1,0000
pH 1.6 s/MA15 / pH 6.5 s/MA15	67,8994	68,2373	0,990121	0,9950
pH 1.6 s/MA15 / pH 6.5 c/MA15	67,8994	2,37608	816,6	0,0024
pH 6.5 s/MA15 / pH 6.5 c/MA15	68,2373	2,37608	824,747	0,0024

**El StatAdvisor**

Los estadísticos mostrados en esta tabla evalúan la hipótesis nula de que las desviaciones estándar dentro de cada una de las 4 columnas son iguales. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza. Esto viola uno de los supuestos importantes subyacentes en el análisis de varianza e invalidará la mayoría de las pruebas estadísticas comunes.

La tabla también muestra una comparación de las desviaciones típicas para cada par de muestras. P-valores por debajo de 0.05, de los cuales hay 4, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dos sigmas al 5% de nivel de significación.

#### 3. Prueba de Múltiples Rangos

**Pruebas de Múltiple Rangos**

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
pH 1.6 c/MA15	3	2,62567	X
pH 6.5 c/MA15	3	2,62567	X
pH 6.5 s/MA15	3	360,333	X
pH 1.6 s/MA15	3	368,333	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
pH 1.6 c/MA15 - pH 1.6 s/MA15	*	-365,708	90,68
pH 1.6 c/MA15 - pH 6.5 s/MA15	*	-357,708	90,68
pH 1.6 c/MA15 - pH 6.5 c/MA15		0	90,68
pH 1.6 s/MA15 - pH 6.5 s/MA15		8,0	90,68
pH 1.6 s/MA15 - pH 6.5 c/MA15	*	365,708	90,68
pH 6.5 s/MA15 - pH 6.5 c/MA15	*	357,708	90,68

\* indica una diferencia significativa.

**El StatAdvisor**

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.



## ANEXO IX

### Análisis Estadístico de la Solubilidad de TDF y las NFS

#### 1. Tabla Anova, comparación de varias muestras

Comparación de Varias Muestras

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3121,48	1	3121,48	8,26	0,0166
Intra grupos	3780,36	10	378,036		
Total (Corr.)	6901,84	11			

#### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón F, que en este caso es igual a 8,25708, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.



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

**Nombre del Alumno:** Irma Delia Pérez Guerrero

**Título de la Tesis:** “Uso concomitante de cocrystalos y polímeros para mejorar el desempeño biofarmacéutico de Tadalafilo”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Julio César Rivera Leyva

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

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones: (Solo en caso de rechazo)**

---

---

---

---

\_\_\_\_\_  
Dr. Julio César Rivera Leyva

6 de noviembre del 2020

Fecha



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

**JULIO CESAR RIVERA LEYVA | Fecha:2020-11-12 11:30:32 | Firmante**

lw3PzT0nNJe0ARGWPNB1sUJY+pYDZGuoPIIMigCOd9U+rHlmo79/dQiGqCAtMnQ9f9fbWlfbsJRsuHkAHFiB5ICG9/2xKVxGs+VbUDHFw8Az0pJ21Rs7MNuh8hNmacWwRc4q  
x+9h1NTAVYNASo8mxpEtqq/+0rqO3yy25y3NI5ruvlefxkhKRE6W16nl2wyYlhAltRcp96TF6hTfdPGhIRDx0R4bXyqJx3zVbcMyfB4uuruthHWE1iHkNuH+pkGJATFTfLU6G/6C/qpGjJ  
6hP3F69B3AY7BnZVEpvi49ZR1jrxROzh7F25bYxgVa6gajFedH2H4vePDvwodCYIj+LQ==

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



8jWNiB

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/7D4SCBuCwFm7mwibvIYcuOkTesUmJdcy>





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

**Nombre del Alumno:** Irma Delia Pérez Guerrero

**Título de la Tesis:** “Uso concomitante de cocrystalos y polímeros para mejorar el desempeño biofarmacéutico de Tadalafilo”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Ángel Daniel Herrera España

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

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones: (Solo en caso de rechazo)**

---

---

---

---

\_\_\_\_\_  
Dr. Ángel Daniel Herrera España

**6 de noviembre del 2020**

Fecha



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

ANGEL DANIEL HERRERA ESPAÑA | Fecha:2020-11-06 15:37:07 | Firmante

TGOULuO0eli1MCb5FvHugC25CVmMij6VgR4e5Phli2+k9BtMzX+EHIZjedUwGZ3w6evMTSK+zI3vaZH4LyDG5dCi5RjmCxmvrJWIQ5lbtkafoxHdj+OBL0aQlu5CZhIsqVFF5qKsV  
XsAU2VOXLf7bErKUxiLNnuoONAK9Z9blmyca5G+NEfc7mXv5Y+uhfrqIZcxkl12kYpKRcHVx1kdOVh5cnKLJF/eEjaDpfA78bWnzYTcKZILivn3HRKrJNZBtxoZ7Gkc6Dp7aQ0dhKia  
6+k1TeqZp1RCH/NgrJmVNnt89jQBksMGZISvL4nH5UsA/tW/hOaoMV5pLQpEo9Opg==

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



[tLWfsh](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/bdjt53OlukXaQQeeJFX7Sam1a49BOlbn>





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

**Nombre del Alumno:** Irma Delia Pérez Guerrero

**Título de la Tesis:** “Uso concomitante de cocrystalos y polímeros para mejorar el desempeño biofarmacéutico de Tadalafilo”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

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

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones: (Solo en caso de rechazo)**

---

---

---

---

\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

09 de noviembre del 2020

Fecha



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

**JUAN GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ | Fecha:2020-11-11 15:15:03 | Firmante**

UafGnC5vB1hHkA1AjvYnG5VWw3GqAtJLuoqIGP700YRI5qPXY3MfQ3NjmY4EiJP2OY0EnoVo5p2OlgxlE29gb3i415kaBNbSPHXhKH1y8YvdfO/GEzeZj7IE5PoKXgPegq+es8i  
NCne5cXQkKRggt1kCiKyl4eWmqhoKqCYVEikP57cgYRv/IsRJS9g0P/AvVQubBoaZWhdQ04LjJhaRe3VIUutqn9L4FE8K4eBmT3SFRDygg2t2RZxr7cQ+uUkw3dpdsNZwEHqhBh  
J8GuExAMpN8mOY0S1JfPPqVLkaFPdmQPAXRp7Oj4xCTSWpBS5aR1ZUSxw2Q7f53EJESEWBw==

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



[cm3whR](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/EKP6dPXlgqjOKQ5j2CjeP7WamKgE1xPO>



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

**Nombre del Alumno:** Irma Delia Pérez Guerrero

**Título de la Tesis:** “Uso concomitante de cocrystalos y polímeros para mejorar el desempeño biofarmacéutico de Tadalafilo”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. José Luis Viveros Ceballos

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

Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones: (Solo en caso de rechazo)**

---

---

---

---

\_\_\_\_\_  
Dr. José Luis Viveros Ceballos

27 de octubre del 2020

Fecha





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

JOSE LUIS VIVEROS CEBALLOS | Fecha:2020-10-28 15:05:05 | Firmante

VRZg3LMgib4pMOx4Kzqz+mU78/elPbDdfWJBTzRg/V9j5XOF/jghe1IujEV95Ckz9+XIPaJ9OsrTCVxkcsdYlqojyH81iLULyZTCbcw4TEHFUV1hj1CfxN7LKTGwpE9FZqlwaDg16QiNrFKU77wPvolBikZEMatP+2xgWCNkKAir/8t18ll4P3z80MSf6ympxlAy0XuV8s8dBCdhLWYocNvyWvS1LdjFLw+X6sDkho19IQXYzCLaoS7OuhEityRBxFxti3LOM3bFyfhEoOzclKrGNjvKTIF6tooi1a68mGV3hxxhYJUbbZh9IMFpXLoPophStDscP1UX1en8xLPb5/nQ==

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



[Fgse8z](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/sqmHWmDLaKOCQN4OY95De20hvtwHmMAu>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

**Nombre del Alumno:** Irma Delia Pérez Guerrero

**Título de la Tesis:** “Uso concomitante de cocrystalos y polímeros para mejorar el desempeño biofarmacéutico de Tadalafilo”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Sergio Alcalá Alcalá

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

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones: (Solo en caso de rechazo)**

---

---

---

---

\_\_\_\_\_  
Dr. Sergio Alcalá Alcalá

27 de octubre del 2020

Fecha



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:2020-10-28 14:11:29 | Firmante**

RvMLAMSjQjRLyikWfb4ts2lAj0qLkhyelvX8GKVEYfIK3CWrlMLMqJtRjGJkrbVTjh8gqWd0JThrDjRE9dC5ZOwDV+PzlQW3JiJx7w2LP3hvBoORZbR8Sg362aY5d37926eXkkmGc/7zcMx41adkhUSpqNOaayODJw9ovP8ZznjtMUWspwSP41JRKGMQ0+ks7mPOW5wVHTSh2N4VaHbCz7Li9/ev7Im3e4WgdjcKJ7nXNZdxsAMFhyzpj4bVG3V89lwFzMiQ1BvyBQmU7zsrF1QxmbLfRyDMUJgFEcK4rh8ACoZtCpRZHXVQ1mnhTEfjlkxCTAf/vJn430AMJuhzFyQ==

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



jmCUXK

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/oX2fJjMwrQ8HznUFV5DRqW3Q6G3VE6dW>

